

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS
HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS
HDAC1, HDAC2 E HDAC6 EM TUMORES MAMÁRIOS
DE CADELAS**

Igor Luiz Salardani Senhorello

Médico Veterinário

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS
HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS
HDAC1, HDAC2 E HDAC6 EM TUMORES MAMÁRIOS
DE CADELAS**

Igor Luiz Salardani Senhorello

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica.

2020

S476a	Senhorello, Igor Luiz Salardani Avaliação do padrão de acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em tumores mamários de cadelas / Igor Luiz Salardani Senhorello. -- Jaboticabal, 2020 78 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Mirela Tinucci Costa 1. Epigenética. 2. Canino. 3. Hipoacetilação. 4. Neoplasmas mamários. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HDAC1, HDAC2 E HDAC6 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

AUTOR: IGOR LUIZ SALARDANI SENHORELLO

ORIENTADORA: MIRELA TINUCCI COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA (Participação Virtual)
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. RENEE LAUFER AMORIM (Participação Virtual)
Depto. de Clínica Veterinária / FMVZ - UNESP

Prof. Dr. PAULO CÉSAR JARK (Participação Virtual)
UNICASTELO / Descalvado/SP

Prof. Dr. HEIDGE FUKUMASU (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP

Jaboticabal, 23 de outubro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Igor Luiz Salardani Senhorello- nasceu em Venda Nova do Imigrante-ES no ano de 1989. Iniciou os estudos na Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio “Sirena Rezende Fonseca” concluindo o ensino fundamental no ano de 2004. Em 2005 iniciou o ensino médio e profissionalizante em técnico em agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Alegre-ES, concluindo em 2007, e no ano seguinte ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Durante a graduação foi aluno de iniciação científica e monitor de diversas disciplinas, concluindo a graduação em 2012. Cumpriu a Residência em Clínica Médica de Pequenos Animais pelo Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública na Universidade Estadual Paulista- UNESP Campus de Jaboticabal de 2013 a 2015, participando durante o período da Associação dos Médicos Veterinários da UNESP-Jaboticabal como tesoureiro no ano de 2013. Realizou mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na área de Clínica Médica Veterinária pela FCAV/UNESP Campus de Jaboticabal de 2015 a 2017, sob orientação da Prof^a. Dr^a Mirela Tinucci Costa e coorientação da Prof^a Dr^a Erika Maria Terra. Em 2017 ingressou no Programa de doutorado pela mesma instituição, sob a mesma orientação. Desde o início da pós-graduação participou voluntariamente do atendimento no Serviço de Oncologia Veterinária no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” na FCAV/UNESP até o momento que ingressou como docente na Universidade Brasil no Campus de Fernandópolis, no segundo semestre de 2019. Atualmente é Professor Assistente na Universidade de Vila Velha/ES.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui.

À minha família (pai, mãe e irmão) meu porto seguro, minha confiança em seguir em frente, sem vocês caminhar não seria possível e também a grande família Salardani.

À minha namorada Camila Goloni, por estar ao meu lado em todos os momentos, me dando forças quando o desânimo aparecia. Você é muito importante para mim.

À minha orientadora Professora Dr^a. Mirela Tinucci-Costa, que desde o começo da minha trajetória na UNESP-Jaboticabal foi sempre uma mãe, me dando apoio em todas as situações. Obrigado infinitamente por toda orientação, carinho e confiança.

A todos os amigos que conquistei em Jaboticabal em especial a família HV por toda parceria, ajuda e motivação para conclusão dessa etapa.

Ao meu grupo de pesquisa e grandes amigos Isabela Canavari, Oscar Sierra e Giovanni Vargas, vocês fazem parte dessa conquista e cada momento que compartilhamos dentro do laboratório foram decisivos obtenção desse título.

Aos meus grandes amigos da República a esclarecer e República Antro do HV vocês fazem parte da minha família.

Ao Serviço de Oncologia e ao de Obstetrícia do Hospital Veterinário e ao Laboratório de Patologia Veterinária da UNESP-Jaboticabal, sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Ao Dr. Roberto Ampuero pelo apoio incondicional para realização das análises estatísticas de trabalho, não medindo esforços para que tudo fosse feito da melhor maneira possível.

À UNESP-Jaboticabal pela oportunidade oferecida.

Ao Laboratório VetPat pela parceria realizada nesse e em outros trabalhos.

À USP-Pirassununga pela parceria realizada nesse trabalho, em especial ao Prof. Dr. Flávio Meireles e a Pesquisadora Dr^a. Cibeles Zinni.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2016 / 00128-5) pela concessão do auxílio regular a pesquisa.

Aos cães que participaram desse trabalho, espero poder retribuir de alguma maneira.

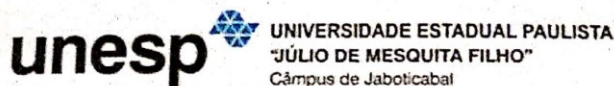
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
CAPÍTULO 1- Considerações gerais	1
1.Revisão de literatura	1
1.1 Introdução	1
1.2 Fatores fisiológicos da epigenética	3
1.3 Epigenética e o câncer	10
1.4 Referências	15
CAPÍTULO 2 - Comparação da expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases HDACs 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos neoplásicos e não neoplásicos	20
1. Resumo e palavras-chaves	20
2. Introdução	21
3. Material e métodos	23
3.1 Seleção dos pacientes e coleta das amostras	23
3.2 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot	25
3.3 Reação imuno-histoquímica para histonas e enzimas desacetilases ..	26
3.4 Avaliação dos resultados das reações imuno-histoquímicas	28
3.5 Análise estatística	29
4. Resultados	30
4.1 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot	31
4.2 Imunoexpressão das histonas acetiladas e isoenzimas desacetilases pela análise univariada	31
4.3 Imunoexpressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases pela análise multivariada	35
5. Discussão	40
6. Declaração de disponibilidade de dados	47
7. Declaração de conflito de interesses	47
8. Referências	48

Capítulo 3- Expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários simples de cadelas	52
1. Resumo e palavras-chaves.....	52
2. Introdução	53
3. Material e métodos.....	55
3.1 Seleção dos pacientes e coleta das amostras	55
3.2 Avaliação de parâmetros clínico-patológicos	56
3.3 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot	56
3.4 Reação imuno-histoquímica	57
3.5 Interpretação dos resultados da imuno-histoquímica.....	59
3.6 Análise estatística	60
4. Resultados	60
4.1 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot	61
4.2 Expressão imuno-histoquímica das histonas acetiladas e enzimas desacetilases e a correlação com as variáveis clínico-patológicas	62
4.3 Correlação entre histonas acetiladas e HDACs com o tempo de sobrevida	64
5. Discussão	69
6. Declaração de disponibilidade de dados.....	73
7. Declaração de conflito de interesses	73
8. Referências	73

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “Avaliação do padrão de acetilação das histonas H3 e H4 e expressão das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em tumores mamários de cadelas”, protocolo nº 016384/17, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Mirela Tinucci Costa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 31 de outubro de 2017.

Vigência do Projeto	11/11/2017 a 01/02/2020
Espécie / Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i> – Cão doméstico
Nº de animais	35
Peso / Idade	Não estabelecido
Sexo	Fêmeas
Origem	Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP

Jaboticabal, 31 de outubro de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

AValiação DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4 E EXPRESSÃO DAS ENZIMAS HDAC1, HDAC2 E HDAC6 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

RESUMO- Modificações epigenéticas assumiram importância na patogênese do câncer a partir de pesquisas que mostraram que mudanças na expressão de proteínas associadas ao DNA podem afetar a expressão gênica e podem ser reversíveis após tratamento. As modificações nas histonas vêm sendo estudadas em larga escala na medicina, particularmente no câncer de mama. O presente estudo será apresentado em três capítulos. No primeiro, descreveremos mecanismos epigenéticos e suas implicações no câncer, apontando estudos já realizados na medicina e na veterinária. No segundo capítulo serão apresentados os resultados da expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos tumorais e saudáveis, a fim de comparar possíveis alterações por expressão dessas proteínas. No terceiro capítulo serão apresentados os resultados da expressão apenas em carcinomas mamários simples de cadelas e sua associação com fatores prognósticos. A imuno-histoquímica foi empregada com o intuito de se pesquisar a expressão das proteínas e a validação dos anticorpos foi conseguida pela técnica de Western Blot em linfonodo canino. Os resultados de expressão imuno-histoquímica foram avaliados semiquantitativamente, levando-se em consideração a intensidade de marcação e a porcentagem de células marcadas. Para análise estatística univariada utilizaram-se os testes de Kruskal Wallis, qui-quadrado e o teste exato de Fischer com nível de significância de 5%. Para determinar o comportamento e associação das histonas e das enzimas HDACs dentro e entre os grupos foram utilizadas estatísticas multivariadas. Especificamente no capítulo dois, houve diferença na expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases entre os grupos experimentais ($p < 0,05$), com menor acetilação de H3 (H3K9Ac) em carcinomas mamários em relação ao tecido mamário normal, além disso, houve menor expressão de HDAC1 e HDAC2 em tecidos mamários neoplásicos em relação ao tecido normal ($p < 0,05$). Em contrapartida, a HDAC6 foi mais expressa em tecidos mamários neoplásicos ($p < 0,05$). Não houve diferença na expressão de H4 acetilada (H4K12Ac) entre os grupos ($p > 0,05$). Pela análise multivariada houve associação positiva entre a expressão de HDAC1 e HDAC2 e associação negativa entre a expressão de H3K9Ac e HDAC6. No capítulo três foi observada associação entre a baixa expressão de HDAC1 e presença de metástase em linfonodos ($p = 0,035$), e alta expressão de HDAC1 associou-se a fatores prognósticos favoráveis pela análise multivariada. Ainda pela análise multivariada a baixa expressão de HDAC6 apresentou relação com baixa expressão de Ki67 e com tumores de menor tamanho, apresentando relação com fatores de melhor prognóstico. A partir desse estudo foi possível observar alterações epigenéticas em tecidos neoplásicos mamários e que existe relação com fatores prognósticos. Além disso, a alta expressão de HDAC6 pode justificar a hipoacetilação de H3 observada em tecidos neoplásicos. Esses resultados abrem perspectivas futuras para novos estudos que confirmem essas alterações e estimulam o desenvolvimento de terapêuticas alvo no tratamento do câncer mamário em cadelas.

Palavras-chave: epigenética, canino, hipoacetilação, neoplasmas mamários

EVALUATION OF THE ACETYLATION PATTERN OF HISTONES H3 AND H4 AND EXPRESSION OF ENZYMES HDAC1, HDAC2 AND HDAC6 IN MAMMARY TUMORS OF BITCHES

ABSTRACT- Epigenetic changes have assumed importance in cancer pathogenesis from research that showed that changes in the expression of proteins associated with DNA can affect gene expression, however, these changes can be reversible after treatment. Histone changes have been studied on a large scale in medicine, particularly in breast cancer. The present study will be presented in three chapters, aiming to describe in the first chapter epigenetic mechanisms and their implications for cancer, pointing out studies already carried out in medicine and veterinary medicine. In the second chapter, the results of the expression of acetylated histones H3 and H4 and of the enzymes deacetylases 1, 2 and 6 in canine tumoral breast and healthy tissues will be presented, in order to compare possible alterations by expression of these proteins. In the third chapter, the results of expression will be presented only in simple mammary carcinomas of bitches and their association with prognostic factors. The tissues were subjected to immunohistochemistry for analysis of protein expression and the validation of antibodies was achieved by the Western Blot technique using canine lymph nodes. The results of immunohistochemical expression were evaluated semiquantitatively, taking into account the labeling intensity and the percentage of labeled cells. For univariate statistical analysis, Kruskal Wallis, chi-square and Fischer's exact tests were used with a 5% significance level and to determine the behavior and association of histones and HDAC enzymes within and between groups, multivariate statistics were used. Specifically in chapter two, there was a difference between the expression of acetylated histones and deacetylase enzymes between the experimental groups ($p < 0.05$), with less H3 acetylation (H3k9Ac) in breast carcinomas compared to normal breast tissue, in addition, there was lower expression of HDAC1 and HDCA2 in neoplastic breast tissues compared to normal tissue ($p < 0.05$). In contrast, HDAC6 was more expressed in neoplastic breast tissues ($p < 0.05$). There was no difference in the expression of acetylated H4 (H4K12Ac) between the groups ($p > 0.05$). Multivariate analysis showed a positive association between the expression of HDAC1 and HDAC2 and a negative association between the expression of H3K9Ac and HDAC6. In chapter three, an association was observed between low HDAC1 expression and the presence of metastasis in lymph nodes ($p = 0.035$), and high HDAC1 expression was associated with favorable prognostic factors by multivariate analysis. Still through multivariate analysis, the low expression of HDAC6 was related to low expression of Ki67 and to smaller tumors, showing a relationship with factors of better prognosis. From this study it was possible to observe epigenetic changes in breast neoplastic tissues and that there is a relationship with prognostic factors. In addition, the high expression of HDAC6 may justify the H3 hypoacetylation observed in neoplastic tissues. These results open future perspectives for new studies that confirm these changes and stimulate the development of target therapies for the treatment of mammary cancer in female dogs.

Keywords: epigenetics, canine, hypoacetylation, mammary tumor

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2- Comparação da expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases HDACs 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos neoplásicos e não neoplásicos

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica para pesquisa da expressão de histonas e histonas desacetilases em amostras de tecido mamário normal e neoplásico de cadelas.....26

Tabela 2. Variáveis clínico-patológicas observadas nos animais com carcinoma mamário simples.....30

Tabela 3. Resultado da análise multivariada exploratória de fatores, teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, da histona acetilada H3 (H3K9), histona acetilada H4 (H4K12) e das enzimas histonas desacetilases (HDAC 1,2,6) em tecido mamário normal (G1), adenoma simples (G2), carcinoma mamário simples (G3) e carcinoma mamário simples metastático (G4) de cadelas.....37

Tabela 4. Resultado da análise exploratória de fatores, ANOVA e curva ROC da histona H3 (H3K9Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC 1,2,6) em tecidos mamários normais (G1), adenomas simples (G2), carcinomas simples (G3) e carcinomas simples metastáticos (G4) de cadelas.....40

CAPÍTULO 3- Expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários simples de cadelas

Tabela 1. Anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica para expressão de histonas acetiladas e enzimas desacetilases.....58

Tabela 2. Variáveis clínico-patológicas observadas nos animais com carcinoma mamário simples.....61

Continua...

...Continuação

Página

Tabela 3. Expressão imuno-histoquímica de H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em 61 amostras de carcinomas mamários simples de cadelas.....64

Tabela 4. Correlação entre os escores obtidos para as histonas acetiladas e enzimas desacetilases e as variáveis clínico-patológicas das amostras de carcinomas mamários simples de cadelas.....66

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

Figura 1. Organização nucleossômica do DNA. A fita de DNA é enrolada em torno de um octâmero de subunidades de histonas e o DNA ligante é estabilizado pela histona H1 (Adaptado, Thankam et al., 2019).....07

Figura 2. A acetilação das histonas é controlada pelas enzimas histonas acetiltransferases (HAT) que adicionam grupos acetil na região N-terminal das histonas ativando a transcrição gênica por favorecer a abertura da cromatina, por sua vez, as enzimas histonas desacetilases (HDAC) são responsáveis pela desacetilação N-terminais das histonas, compactando a cromatina e causando repressão da transcrição gênica (Adaptado, Oronsky et al., 2014).....09

CAPÍTULO 2- Comparação da expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases HDACs 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos neoplásicos e não neoplásicos

Figura 1. Validação da expressão proteica das histonas acetiladas (H3K9 e H4K12) e das enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) pela técnica de Western Blot em linfonodo canino.....31

Figura 2. Representação gráfica dos escores de marcação da H4K12Ac, H3K9Ac, HDAC1 e HDAC2 para os grupos tecido mamário normal (G1), adenoma simples (G2), carcinoma simples (G3) e carcinoma metastático (G4)

Continua...

...Continuação

Página

de cadelas. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística ($p < 0,05$).....32

Figura 3. Fotomicrografia das marcações de histonas acetiladas e isoenzimas HDACs, bem como, os escores de marcação para cada grupo experimental. Imunomarcação predominantemente nuclear das histonas acetiladas H4K12 e H3K9 e das isoenzimas HDAC1 e HDAC2 e marcação citoplasmática da HDAC6 em tecido mamário normal (G1), adenoma mamário simples (G2) carcinoma mamário simples não metastático (G3), carcinoma mamário simples metastático (G4) de cadelas. Reação imuno-histoquímica, X400 34

Figura 4. Análise multivariada de componentes principais para cada grupo experimental, conforme associação entre a expressão das histonas acetiladas (H3K9 e H4K12) e enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6). As cores representam os diferentes anticorpos e estão devidamente identificadas na legenda. 36

Figura 5. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para os subgrupos A e B do grupo G3 (A) e G4 (B) em relação à associação entre imunomarcação identificada pela análise multivariada exploratória dos fatores.....38

Figura 06- Representação gráfica do ponto de corte estabelecidos pela curva ROC para o Fator 1 (A) e Fator 2 (B) baseados a análise exploratória dos fatores. Letras diferentes indicam de houve diferença estatística ($p < 0,05$)....39

Capítulo 3- Expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários simples de cadelas

Figura 1. Validação da expressão proteica das histonas acetiladas (H3K9Ac e H4K12Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) pela técnica de Western Blot em linfonodo canino.....62

Figura 2. Coloração imuno-histoquímica das histonas acetiladas e enzimas desacetilases (HDACs) em carcinomas simples (× 400). (A) H3K9Ac, (B) H4K12Ac, (C) HDAC1, (D) HDAC2 e (E) Ki67 foram expressos nos núcleos das células tumorais. A coloração para (F) HDAC6 foi observada predominantemente no citoplasma.....63

Figura 3. - Análise estatística das variáveis clínico-patológicas e tempo de sobrevida global de cadelas portadoras de carcinomas mamários simples pelo método de Kaplan-Meier.....67

Figura 4. Resultado de expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases em relação ao tempo de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier.....68

Figura 5. Análise de correspondência multivariada das associações entre a expressão das histonas acetiladas (H3K9Ac e H4K12Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC 1, 2 e 6) e as variáveis clínico-patológicas em carcinomas mamários simples de cadelas.....69

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

1.Revisão de literatura

1.1 Introdução

O cão tem figurado como um modelo experimental para várias doenças humanas, inclusive as neoplasias malignas, tornando-os uma espécie atraente como modelo para a investigação do câncer (Lindblad-Toh et al., 2005; Ranieri et al., 2013), há semelhança com as mulheres, porém com uma incidência até três vezes maior em se tratando de neoplasias mamárias (Shafiee et al., 2013). Nas fêmeas caninas adultas e inteiras, as neoplasias mamárias espontâneas são as mais frequentes, sendo 60% destas malignas. Assim, nas últimas décadas as neoplasias mamárias caninas são alvo de muitas pesquisas em medicina veterinária (Brodey et al., 1983; Rodaski e Piekarz, 2008; Peña et al., 2014).

Cadelas com neoplasias mamárias malignas possuem uma sobrevida significativamente curta, quando comparadas àquelas com neoplasias benignas. Uma causa comum de mortalidade por esta enfermidade, tanto nas mulheres quanto nas cadelas, deve-se ao aparecimento de novos tumores e às metástases do tumor primário, principalmente para linfonodos regionais, pulmões, fígado, baço, entre outros órgãos (De Nardi et al., 2008; Klopfleisch e Gruber, 2009).

A sobrevida de dois anos de cadelas com neoplasias mamarias malignas é variável e pode ser influenciada por vários fatores dependendo do tipo e grau histológico do tumor, presença de metástases regionais ou à distância, estágio da doença e tratamento utilizado (Sorenmo, 2003; Sorenmo et al., 2020). Todavia, é sabido que pacientes com neoplasias que possuem o mesmo tipo, grau histológico e

estadiamento nem sempre apresentam a mesma evolução da doença (Eisenberg e Koifman, 2001).

O tratamento inclui, primeiramente, a retirada cirúrgica do tumor que apresenta abordagens diferenciadas, de acordo com cada caso. Entretanto, alguns animais irão se beneficiar de tratamentos adjuvantes com quimioterapia e outros medicamentos, a fim de evitar recidivas e metástases distantes. Nem sempre a evolução do tumor mamário é favorável, mesmo com abordagens mais agressivas de tratamento. O que sugere que outros mecanismos ainda pouco conhecidos possam estar relacionados ao prognóstico e resposta ao tratamento nessas pacientes (Cassali et al., 2014; Sorenmo et al., 2020).

Recentes estudos apontam mecanismos epigenéticos no desenvolvimento do câncer (Wittenburg et al., 2011; Ferraresso et al., 2014; Eckschlager et al., 2017). A epigenética foi definida como uma disciplina há mais de 50 anos e originalmente descreveu alterações no desenvolvimento de organismos que não podiam ser explicadas por mutações no DNA (Huang et al., 2011). As modificações epigenéticas são descritas como alterações hereditárias na expressão gênica, no entanto, sem haver modificação na sequência de DNA. Os padrões epigenéticos podem sofrer influências ambientais, de tal forma que modificações fenotípicas podem ser transmitidas para os descendentes (Feinberg, 2001).

Nos últimos anos ficou clara a influência dessas modificações no desenvolvimento das neoplasias (Momparker, 2003; Guerriero et al., 2017). Modificações químicas das histonas como acetilação e metilação, assim como metilação do DNA são eventos epigenéticos amplamente implicados no desenvolvimento e progressão do câncer, potencialmente reversíveis com

tratamentos medicamentosos, desta forma melhoram o prognóstico do paciente (Kristensen et al, 2009).

Predizer a resposta de um tumor a uma determinada terapia deve ser prioridade na pesquisa oncológica (Marquard et al, 2008). O entendimento de todas essas alterações epigenéticas e sua contribuição para a tumorigênese da mama é muito importante para o progresso no campo do diagnóstico, prognóstico e terapia do câncer de mama de humanos e animais. Existe, portanto, uma necessidade premente de entender o genoma funcional, isto é, as mudanças definidas pelos mecanismos reguladores que cobrem a estrutura genética (Jovanovi et al., 2010).

Este estudo foi concebido com o intuito de identificar possíveis modificações epigenéticas em tumores mamários caninos, e avaliar o padrão de acetilação das histonas H4 e H3 e correlacionar com a expressão das enzimas HDAC1, 2 e 6 nos tecidos mamários caninos, buscando implicações dessas com a severidade e evolução da doença, e com o prognóstico, por meio da avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes.

1.2 Fatores fisiológicos da epigenética

O termo epigenética origina-se do prefixo grego epi, que significa “acima ou sobre algo” (Pray, 2004). As modificações epigenéticas são descritas como alterações hereditárias nos mecanismos de controle da expressão gênica, transmitidas por meiose ou mitose, mas que não alteram as sequências de bases nucleotídicas da molécula de DNA (Egger et al., 2004; Sandoval e Esteller, 2012). Os padrões epigenéticos podem sofrer influências ambientais de tal forma que

alterações fenotípicas podem ser transmitidas para os descendentes e também ocorrer de forma fisiológica e reversível (Feinberg et al., 2001).

Mecanismos epigenéticos atuam para mudar a acessibilidade da cromatina para regulação transcricional, pelas modificações do DNA e pela modificação ou rearranjo de nucleossomos. Estes mecanismos são componentes críticos no desenvolvimento normal e no crescimento das células (Muller e Prado, 2008). As modificações pós-tradução de histonas identificadas até agora incluem acetilação, fosforilação, metilação, monoubiquitinação, sumoilação, ribosilação de ADP, desaminação, propionilação e butirilação (Kouzarides, 2007; Sandoval e Esteller, 2012; Kebede et al., 2015). Escolhemos aqui restringir nossa análise apenas ao estudo sobre os mecanismos de acetilação e desacetilação das histonas, estando em consonância com o objetivo desse trabalho.

Ao contrário do genoma, que é idêntico nos diferentes tipos celulares, o epigenoma é dinâmico e varia de uma célula para outra. Algumas características observadas nos mecanismos epigenéticos distinguem daqueles observados na genética convencional, como a reversibilidade, os feitos de posicionamento, e a habilidade de agir em distâncias não esperadas podendo ser maiores que um único gene (Feiberng et al., 2001).

A reversibilidade é o que confere o dinamismo da cromatina e é controlada por enzimas que agem de forma oposta adicionando ou removendo modificações. Podemos citar como exemplo, histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) que controlam a acetilação das histonas e histonas metiltransferases (HMTs) e desmtilases (HDMs) controlando a metilação das

histonas. É importante ressaltar que enzimas responsáveis por modificações de histonas podem também agir em proteínas não histonas (Sandoval e Esteller, 2012), entretanto não abordaremos essas implicações nessa revisão.

Os dois principais mecanismos envolvidos na epigenética incluem as modificações nas histonas e padrão de metilação do DNA, que envolvem modificações na estrutura das ligações covalentes do DNA (D'Alessio e Szyf, 2007). A partir dessas modificações ocorre maior ou menor acessibilidade da cromatina que regula a transcrição local ou global de genes a partir de modificações no DNA e rearranjos dos nucleossomos (Lund e Lohuizen, 2004). Além desses principais mediadores epigenéticos há também a presença de RNAs não codificadores, que podem atuar interferindo na transcrição de genes (Tang e Ho, 2007).

Nos núcleos de todas as células eucarióticas, o DNA genômico é altamente dobrado, restringido e compactado por proteínas histonas e não histonas em um polímero dinâmico chamado cromatina. As histonas são as principais proteínas de empacotamento do DNA e anteriormente acreditava-se que elas apresentavam apenas essa função estrutural, entretanto, uma visão mais abrangente demonstrou que essas proteínas apresentam papel importante na expressão gênica pós-traducional e estão ligadas diretamente as modificações sofridas em suas estruturas amino-terminais. Histonas são pequenas proteínas básicas constituídas por um domínio globular e um amino-terminal mais flexível e carregado (cauda de histona) que se projeta do nucleossomo (Jenuvien e Allis, 2001).

As modificações na expressão da cromatina estão diretamente ligadas às modificações epigenéticas. Os níveis distintos de organização da cromatina

dependem da estrutura dinâmica de ordem superior dos nucleossomos que consiste em 146 pares de bases de DNA, que representam a unidade de repetição básica da cromatina. Em cada nucleossomo, aproximadamente duas voltas superelicais de DNA envolvem um octâmero de proteínas histonas essenciais formadas por quatro histonas: um tetrâmero de H3 e H4 e dois dímeros de H2A e H2B (Luger et al., 1997). As histonas são responsáveis pela organização e união do nucleossomo. Existe ainda a histona H1 que está associada ao DNA e contribui para sua compactação, entretanto ainda não está claro como as matrizes nucleossômicas que contêm a histona de ligante (H1) torcem e dobram essa fibra da cromatina em filamentos cada vez mais compactados, levando a estruturas de ordem superior definidas (Figura 01) (Muller e Prado, 2008).

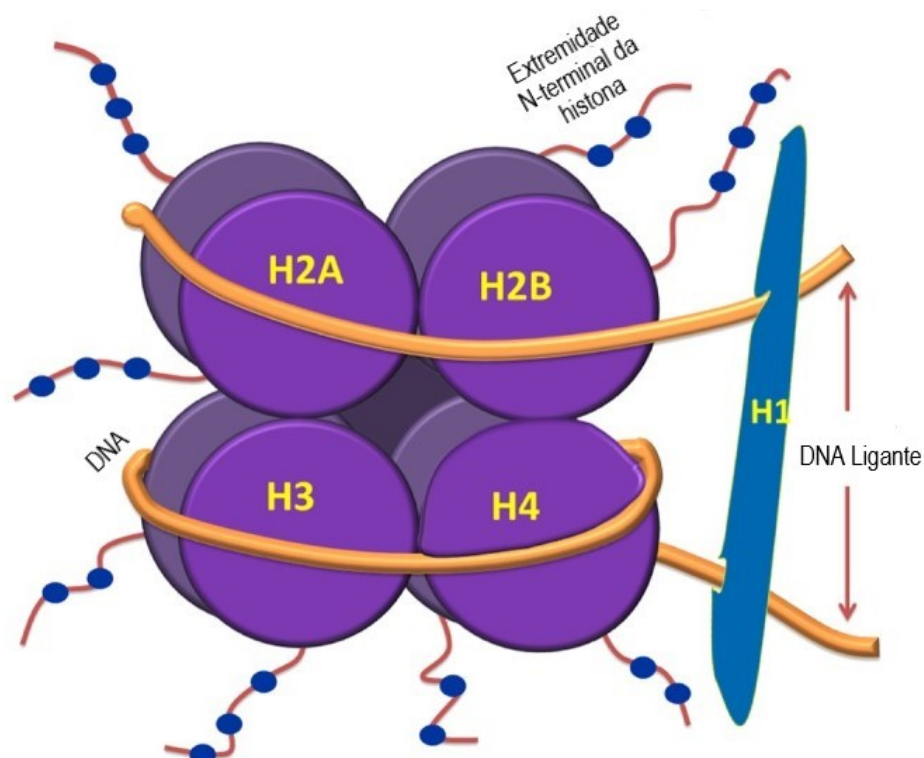


Figura 01- Organização nucleossômica do DNA. A fita de DNA é enrolada em torno de um octômero de subunidades de histonas e o DNA ligante é estabilizado pela histona H1 (Adaptado, Thankam et al., 2019).

As histonas H3 e H4 são passíveis de modificação pós-traducionais, sendo assim, a modificação do grupo N-terminal de lisina em histonas por acetilação ou desacetilação altera a configuração de nucleossomos. A carga positiva em lisinas não acetiladas nas histonas é atraída para o DNA carregado negativamente produzindo um estado de cromatina condensada que inibe a transcrição gênica. Por outro lado, a acetilação das lisinas remove a sua carga positiva e resulta numa estrutura de cromatina aberta, o que facilita a transcrição gênica (Elsheikh et al., 2009; Alberts et al., 2010).

As modificações das caudas de histonas incluem acetilação, metilação, fosforilação, ribosilação entre outros, cada uma das quais pode afetar

significativamente a expressão de genes. As modificações das histonas mais estudadas são acetilação e desacetilação, assim como, metilação e desmetilação (Jenuwein e Allis, 2001; Xavier et al., 2020). Modificações específicas nas caudas das histonas podem levar a silenciamento ou expressão de genes que podem favorecer ou inibir o aparecimento do câncer. Essas modificações podem ser ainda isoladas ou combinadas e isso já está bem documentado na medicina e deu origem ao código das histonas (Sawan e Herceg, 2010; Prakash e Fournier, 2017).

A acetilação das histonas é controlada por duas enzimas: Histonas acetiltransferases (HAT) e Histonas desacetilases (HDAC) (Figura 02). A família HDAC é dividida em enzimas dependentes de zinco (classes I, IIa, IIb e IV, das quais existem 11 subtipos de enzimas) e enzimas independentes de zinco (classe III, também denominadas sirtuinas), que requerem NAD⁺ para seus catalisadores (Cheung et al., 2000; Seto e Yoshida, 2014). As HDACs 1 e 2 compreendem as enzimas de classe I, enquanto, a HDAC 6 pertence à família de classe IIa (Chen et al., 2015).

As HAT são enzimas responsáveis por adicionar o grupo acetil na região amino-terminal das histonas, mais especificamente em lisinas (K). As HDACs por sua vez retiram o grupo acetil localizados nas lisinas amino-terminais, entretanto, essas enzimas não apresentam atuações específicas em determinadas histonas ou regiões amino-terminais, elas podem agir numa variedade de proteínas, inclusive proteínas não histonas (Barneda-Zahonero e Parra 2012; Dell'Aversana et al., 2012; Prakash e Fournier, 2017).

O balanço entre a acetilação das histonas e a sua desacetilação é fundamental para regulação da proliferação das células. O desequilíbrio entre a acetilação e a desacetilação das histonas está associado ao silenciamento de genes supressores de tumores, o que tem permitido compreender melhor a carcinogêneses e progressão do câncer (Menditi e Kang, 2007). O aumento anormal da atividade da HDAC pode resultar na inativação de transcrição de genes supressores tumorais, provocando a inibição de sua transcrição devido a desacetilação das histonas seguida da metilação do DNA, inativando o gene (D'alessio e Szyf, 2006).

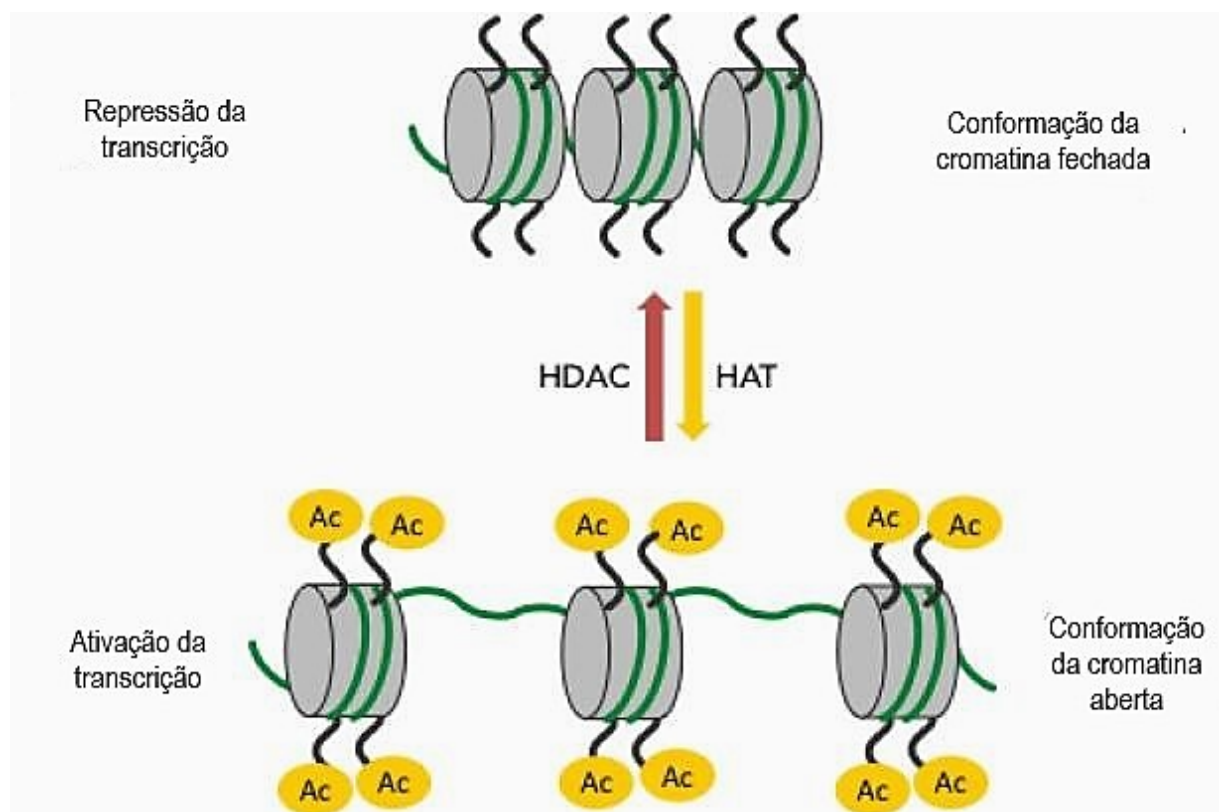


Figura 02- A acetilação das histonas é controlada pelas enzimas histonas acetiltransferases (HAT) que adicionam grupos acetil na região N-terminal das histonas ativando a transcrição gênica por favorecer a abertura da cromatina. Por sua vez, as enzimas histonas desacetilases (HDAC) são responsáveis pela desacetilação N-terminais das histonas, compactando a cromatina e causando repressão da transcrição gênica (Adaptado, Oronsky et al., 2014).

A hiperacetilação das histonas leva a apoptose das células tumorais, diferenciação celular, interrupção do ciclo celular e inibição da angiogênese tumoral. Este conhecimento vem sendo usado para aperfeiçoar o desenvolvimento e aplicação de inibidores das HDAC (iHDAC) como agentes anticâncer, incluindo sua utilização em associação a outros fármacos anti-cancerígenos, com melhora do prognóstico do paciente (Bolden et al, 2006).

1.3 Epigenética e o câncer

Eventos epigenéticos incluindo as modificações de histonas são cruciais para estabelecer a programação correta da expressão dos genes e erros nestes processos podem levar a uma expressão aberrante de genes e a perda de “check-points” anticâncer (Strahl e Allis, 2000). O câncer é um processo em que erros genéticos e epigenéticos se acumulam e transformam uma célula normal em células invasivas ou em células tumorais metastáticas (Rodenhiser e Mann, 2006).

Na medicina humana algumas pesquisas acerca desse tema já foram realizadas e resultados promissores evidenciados, mostrando a importância das alterações epigenéticas na carcinogênese. Um estudo realizado em pacientes humanos com linfoma cutâneo mostrou alta expressão das HDACs 2 nos tipos tumorais mais agressivos comparados aos dos tipos indolentes (Marquard et al., 2008). Também em humanos vários iHDAC aprovados pela FDA, estão sendo usados especificamente para o tratamento de pacientes com linfomas cutâneos refratários, pré-tratados com quimioterapia, aumentando o tempo de sobrevida do paciente (Lansigan e Foss, 2010).

O padrão de acetilação das histonas também foi avaliado em tumores mamários de mulheres. Elsheikh et al. (2009) avaliaram o padrão de acetilação das histonas em tumores mamários de 880 mulheres pela técnica de imuno-histoquímica e observaram um alto nível de acetilação global em tumores com melhor prognóstico e um baixo nível de acetilação em tumores com pior prognóstico. Concluíram então que as alterações na acetilação das histonas, nos diferentes subtipos de carcinoma mamário podem ter relação com o silenciamento de genes supressores tumorais, principalmente naqueles com baixos níveis de acetilação com implicação clínica, uma vez que, a utilização de iHDACs pode reverter a hipoacetilação e tornarem expressos os genes anteriormente silenciados.

Suzuki et al. (2009) também estudaram a expressão de HDACs e a relação com a acetilação das histonas em tumores mamários de mulheres, observando que tumores mais agressivos apresentavam hipoacetilação com alta expressão de HDACs desta forma, justificando o uso dos inibidores de HDACs precocemente em paciente com tumores com essas características.

A expressão de HDAC1 e HDAC3 foi avaliada em tumores de mama de mulheres e a alta expressão de HDAC1 foi correlacionada com melhor prognóstico. A expressão dessas enzimas mostrou ser um marcador prognóstico independente, por correlacionar-se diretamente com um maior tempo de sobrevida das pacientes sem, contudo, correlacionar-se com os marcadores prognósticos clássicos, mostrando ser um marcador prognóstico potencial para decisão de realizar ou não o tratamento das pacientes (Krusche et al., 2005).

Em contrapartida, Muller et al. (2013) evidenciaram em humanos uma alta expressão das isoenzimas 2 e 3 de HDACs em tumores de mama mais agressivos e em pacientes que apresentaram menor tempo de sobrevida. Sabe-se que a hiperacetilação com a utilização de inibidores das HDACs favorecem a apoptose, transformam o microambiente tumoral e diminuem o tamanho do tumor, fato que tem motivado o desenvolvimento de estudos clínicos, já em fase III em mulheres com tumor de mama (Muller et al., 2013; Guerriero et al., 2017).

Em outras neoplasias como o carcinoma de células escamosas de esôfago em humanos, a hipoacetilação das histonas H3 e H4 foi correlacionada com neoplasias em estado avançado de evolução e o aumento da acetilação correlacionando-se com melhor prognóstico (Toh et al., 2004).

Ensaio *in vitro* mostraram efetiva ação dos iHDACs em linhagens de células de tumores mamários, pois houve inibição da proliferação celular em todas as linhagens celulares tratadas com tricostatina A, um inibidor de histonas desacetilases, que levou a hiperacetilação da H4. Nesse mesmo estudo foi avaliada a ação *in vivo* do iHDAC em modelos de carcinoma mamário de ratos. Nos animais tratados foi observado a ocorrência elevada de tumores benignos em comparação aos animais não tratados. Os autores sugeriram que a utilização dos iHDACs apresentam potencial utilização para terapia anticancerígena em tumores mamários (Vigushin et al., 2001; Audia e Campbell, 2016).

A expressão de p16, um gene supressor tumoral foi avaliada *in vitro* em linhagens celulares de linfoma canino de imunofenótipo B. Nesse estudo, uma menor expressão dessa proteína estava correlacionada com a hipoacetilação de H3

nas células tumorais. Uma vez tratadas com o iHDACs TSA as células não só se tornaram hiperacetiladas como passaram a expressar uma maior quantidade de p16, sugerindo que a existe uma relação da alteração epigenética e o silenciamento de genes que é potencialmente reversível com o tratamento medicamentoso (Fujiwara-Igarashi et al., 2016).

Apesar de terem sido aprovados tratamentos com os iHDAC em pacientes humanos com câncer, e terem mostrado respostas terapêuticas satisfatórias, a razão para essa sensibilidade terapêutica ainda não é totalmente elucidada (Marquard et al, 2008).

Baseados em experimentação *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos animais alguns autores descrevem que a hiperacetilação das histonas acarretaria em apoptose das células tumorais, pela expressão de genes supressores tumorais. Se valendo de linhagens celulares de tumores caninos tratadas com iHDACs, pesquisadores evidenciaram aumento da acetilação das histonas em alguns tumores, principalmente em linhagens de linfoma T, mastocitoma, osteossarcoma e sarcoma histiocítico. Estes estudos acrescentam que, além da hiperacetilação houve indução da apoptose e citotoxicidade (Kisseberth et al., 2008). Outros pesquisadores evidenciaram mais recentemente mudanças no microambiente tumoral que favorecem o sistema imunológico (Elsheikh et al. 2009; Audia e Campbell, 2016; Moufarrij et al., 2020).

Estudos avaliando a influência do iHDACs em linhas de tumores caninos também demonstraram resultado animadores (Elshafae et al., 2017; Murahari et al., 2017). Linhagens de tumores prostáticos caninos, um modelo de estudo para

tumores prostáticos humanos, foram avaliadas quanto à influência na proliferação, migração e potencial metastático quando submetidas ao tratamento com iHDACs. Os resultados evidenciaram diminuição na proliferação celular, diferenciação e migração *in vitro* dependente da dose utilizada. Adicionalmente, em modelos animais observaram diminuição no potencial metastático dessas células nos animais tratados com iHDACs (Elshafae et al., 2017).

Estudo semelhante avaliando linhagens celulares de osteossarcoma tratadas com iHDACs AR-2 e SAHA, em combinação ou não com doxorrubicina, mostrou resultado relevante em relação a indução de apoptose das células tumorais, principalmente com a utilização de AR-2 e a combinação de AR-2 e doxorrubicina, concluindo que estas poderiam ser terapias promissoras para essa doença em cães (Murahari et al., 2017).

Eto et al. (2019) avaliaram em carcinomas uroteliais de cães o padrão de acetilação da H3K9 e observaram uma menor acetilação em comparação ao tecido normal. Além disso, essas alterações apresentaram impacto sobre o prognóstico do paciente, culminando num menor tempo livre de doença após a cirurgia. Nesse mesmo estudo, linhagens de carcinoma urotelial foram tratadas com inibidores de HDACs e houve resposta terapêutica anticâncer. Recentemente, um estudo do nosso grupo de pesquisa, com linfoma cutâneo em cães também mostrou alterações epigenéticas importantes. Nesse estudo, além de ter sido evidenciado hipoacetilação de H3K9 nas amostras de linfoma, em comparação com linfonodos normais, foi verificado que a expressão aberrante de H4K12Ac associada a HDAC2 estavam relacionadas a menores tempos de sobrevida nos pacientes (Sierra, 2019).

Tanto na Medicina como na Veterinária, modificações epigenéticas representam um passo importante na patogênese de tumores e tais mudanças poderão determinar terapias-alvo específicas e prognosticar uma resposta ao tratamento.

1.4 Referências

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M., Roberts K, Walter P (2010) **Biologia Molecular da Célula**. 5a. ARTMED, Porto Alegre, p.879-964.

Audia, JE, Campbell, RM (2016) Histone modifications and cancer. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 8(4), a019521.

Barneda-Zahonero B, Parra M. (2012) Histone deacetylases and cancer. **Molecular oncology** 6(6):579-589.

Bolden JE, Peart, MJ Johnstone, RW (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature reviews Drug discovery** 5(9):769-784.

Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel, JR (1983) Canine mammary gland neoplasms. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 19:61-90.

Cassali GD, Lavallo GE et al. (2014) Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology** 7(2):38-69.

Chen, Y, Du, J et al. (2015) Histone deacetylase (HDAC) inhibition improves myocardial function and prevents cardiac remodeling in diabetic mice. *Cardiovascular diabetology*, 14(1):99.

Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. **Cell** 103(2):263-271.

D'Alessio AC, Szyf M (2006) Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochemistry and cell biology** 84(4):463-466.

De Nardi AB, Rodaski S, Rocha NS, Fernandes SC (2008) Neoplasias Mamárias. In: Daleck, C. R.; De Nardi, A. B.; Rodaski, S. (Eds.) **Oncologia em Cães e Gatos**, 1ª Edição. São Paulo: Roca p. 372-383.

Dell'Aversana C, Lepore I, Altucci L (2012) HDAC modulation and cell death in the clinic. **Experimental cell research** 318(11): 1229-1244.

Eckschlager T, Plch, J, Stiborova M, Hrabeta J (2017) Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. **International journal of molecular sciences** 18(7):1414.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature** 429(6990): 457-463.

Eisenberg ALA, Koifman S (2001) Breast cancer: Tumor markers. **Revista Brasileira de Cancerologia** 47:377–388.

Elshafae, SM, Kohart, NA, Altstadt, LA, Dirksen, WP, Rosol, TJ (2017) The effect of a histone deacetylase inhibitor (AR-42) on canine prostate cancer growth and metastasis. **The Prostate**, 77(7):776-793.

Elsheikh SE, Green AR et al. (2009) Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. **Cancer research** 69(9):3802-3809.

Eto S, Saeki K et al. (2019) Anti-tumor effects of the histone deacetylase inhibitor vorinostat on canine urothelial carcinoma cells. **PloS One** 14(6).

Feinberg AP (2001) Cancer epigenetics takes center stage. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 98(2):392-394.

Ferraresso S, Bresolin S et al. (2014) Epigenetic silencing of TFPI-2 in canine diffuse large B-cell lymphoma. **PloS One** 9(4).

Fujiwara-Igarashi, A., Tomiyasu, H., Igarashi, H., Yu, Y., Goto-Koshino, Y., Ohno, K., & Tsujimoto, H. (2016). Regulation of p16 gene expression by histone H3 acetylation in canine lymphoid tumor cell lines. **Japanese Journal of Veterinary Research** 64(4), 257-263.

Guerriero JL, Sotayo A et al. (2017) Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. **Nature** 543(7645):428-432.

Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S (2011) Epigenetics in breast cancer: what's new?. **Breast Cancer Research** 13(6):225.

Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. **Science** 293(5532):1074-1080.

Jovanovic J, RønnebergccJA, Tost J, Kristensen V (2010) The epigenetics of breast cancer. **Molecular oncology** 4(3):242-254.

Kebede AF, Schneider R, Daujat S (2015) Novel types and sites of histone modifications emerge as players in the transcriptional regulation contest. **The FEBS journal** 282(9):1658-1674.

- Kisseberth, W. C., Murahari, S et al. (2008) Evaluation of the effects of histone deacetylase inhibitors on cells from canine cancer cell lines. **American journal of veterinary research** 69(7):938-945.
- Klopfleisch R, Gruber AD (2009) Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. **Research in Veterinary Science** 87(1):91-96.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. **Cell**, 128(4):693-705.
- Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL (2009) Epigenetics and cancer treatment. **European Journal of Pharmacology** 625(1-3):131-142.
- Krusche CA, Wülfing P et al. (2005) Histone deacetylase-1 and-3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. **Breast Cancer Research and Treatment** 90(1):15-23.
- Lansigan F, Foss FM (2010) Current and emerging treatment strategies for cutaneous T-cell lymphoma. **Drugs** 70(3):273-286.
- Lindblad-Toh K, Wade CM et al. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature** 438(7069):803-819.
- Luger K., Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature** 389(6648):251-260.
- Lund AH, van Lohuizen M (2004) Epigenetics and cancer. **Genes & Development** 18(19):2315-2335.
- Marquard L, Gjerdrum LM, Christensen IJ, Jensen PB, Sehested M, Ralfkiaer E (2008) Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. **Histopathology** 53(3):267-277.
- Menditi, KBC, Kang HC (2007) O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia** 53(4):453-460.
- Momparler RL (2003) Cancer epigenetics. **Oncogene** 22(42): 6479-6483.
- Moufarrij S, Srivastava A et al. (2020) Combining DNMT and HDAC6 inhibitors increases anti-tumor immune signaling and decreases tumor burden in ovarian cancer. **Scientific reports** 10(1):1-12.
- Müller BM, Jana L et al. (2013) Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer-overexpression of HDAC2 and HDAC3 is

associated with clinicopathological indicators of disease progression. **BMC cancer** 13(1): 215.

Muller HR, Prado KB (2008) Epigenética: um novo campo da genética. **Rubs** 1(3):61-69.

Murahari, S., Jalkanen, A. L., Kulp, S. K., Chen, C. S., Modiano, J. F., London, C. A., & Kisseberth, W. C. (2017). Sensitivity of osteosarcoma cells to HDAC inhibitor AR-42 mediated apoptosis. **BMC cancer** 17(1):67.

Oronsky, B., Oronsky, N., Knox, S., Fanger, G., & Scicinski, J. (2014). Episensitization: therapeutic tumor resensitization by epigenetic agents: a review and reassessment. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)** 14(8), 1121-1127.

Peña L, Gama A et al. (2014) Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology** 51(1):127-145.

Prakash K, Fournier D (2017) Deciphering the histone code to build the genome structure. **bioRxiv** 217190.

Pray LA (2004) Epigenetics: Genome, meet your environment: as the evidence for epigenetics, researchers reacquire a taste for Lamarckism. **The Scientist** 18(13):14-20.

Ranieri G, Gadaleta CD et al. (2013) A model of study for human cancer: Spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. **Critical reviews in oncology/hematology** 88(1):187-197.

Rodaski S, Piekarz CH (2008) Epidemiologia e Etiologia do Câncer. In: Daleck, CR, De Nardi AB, Rodaski S (Eds.) **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca p. 1-22.

Rodenhiser D, Mann M (2006) Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Cmaj** 174(3):341-348.

Sandoval J, Esteller, M (2012) Cancer epigenomics: beyond genomics. **Current opinion in genetics & development**, 22(1):50-55.

Sawan C, Herceg Z (2010). Histone modifications and cancer. In Advances in genetics. **Academic Press** p.57-85

Seto E, Yoshida M (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 6(4):a018713.

Shafiee R, Javanbakht J et al. (2013). Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistrothological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer Cell International** 13: 79.

Sierra, OMR. Evaluation of acetylated histones 3 and 4 and histone deacetylases 1, 2 and 6 in cutaneous t-cell lymphoma in dogs. 2019. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária na área de Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/191235>>. Acesso em: 27-01-2020.

Sorenmo K (2003) Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 33(3):573-596.

Sorenmo KV, Workey RD, Zappulli V .Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, Vail DM, Thamm D, Liptak J, Page, R. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book. Elsevier Health Sciences, Inc;2020:604-615.

Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. **Nature** 403(6765):41-45.

Suzuki J, Chen YY et al. (2009) Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. **Clinical Cancer Research** 15(9):3163-3171.

Tang WY, Ho SM (2007) Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders** 8(2):173-182.

Thankam, F. G., Boosani, C. S., Dilisio, M. F., & Agrawal, D. K. (2019). Epigenetic mechanisms and implications in tendon inflammation. **International journal of molecular medicine** 43(1):3-14.

Toh Y, Ohga T et al. (2004) Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas. **International Journal of Cancer** 110(3):362-367.

Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, Coombes RC (2001) Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. **Clinical Cancer Research** 7(4):971-976.

Xavier PLP, Müller S, Fukumasu H (2020) Epigenetic Mechanisms in Canine Cancer. **Frontiers in Oncology** 10: 2353.

Wittenburg LA, Bisson L, Rose BJ, Korch C, Thamm DH (2011) The histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes human and canine osteosarcoma to doxorubicin. **Cancer chemotherapy and pharmacology** 67(1): 83-92.

CAPÍTULO 2 - Comparação da expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases HDACs 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos neoplásicos e não neoplásicos

I.L.S. Senhorello¹, O.M.R. Sierra¹, I.C. Canavari¹, G.V. Hernandez², L.A. Anai³, R.A.N Ampuero⁴, J. Passini⁴, C.M.P. Zinni⁵, F.V. Meirelles⁵, R.O Vasconcelos¹ e M. Tinucci-Costa¹

¹ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.

² Departamento de Saude Animal, Universidad Nacional de Colombia - Bogotá, UNAL/Bogotá.

³ Universidade Brasil, Campus de Fernandópolis- SP, Brasil.

⁴ Médico Veterinário Autônomo

⁵ Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA, Universidade de São Paulo, Brasil.

Título curto: Alterações epigenéticas em tecidos mamários caninos

Endereço de e-mail do ILS Senhorello: salardani@hotmail.com

Fontes de suporte:

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2016 / 00128-5. Os autores também agradecem à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, em Jaboticabal, SP, o Laboratório de Patologia Veterinária da UNESP, Jaboticabal, SP e o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP.

1. Resumo e palavras-chaves

Alterações epigenéticas apresentam importância na patogênese do câncer, uma vez que, mudanças na expressão de proteínas associadas ao DNA podem afetar a expressão gênica. Entretanto, essas mudanças podem ser reversíveis após tratamento. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas desacetilases 1, 2 e 6 em tecidos mamários caninos, a fim de identificar possíveis alterações por expressão aberrante dessas proteínas em tecidos neoplásicos. Para isso, as amostras de tecidos mamários de 91 pacientes caninos foram divididas em quatro grupos, G1, tecidos mamários sem alterações histopatológicas (n=11), G2, adenomas mamários simples (n=19), G3, carcinomas mamários simples sem metástase (n=46), G4, carcinomas mamários simples com metástase em linfonodo (n=15). Os tecidos foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para análise da expressão das proteínas. A validação dos anticorpos foi realizada pela técnica de Western Blot utilizando-se linfonodo canino sem alterações histopatológicas. O resultado de expressão dos anticorpos foi avaliado de forma semiquantitativa levando-se em consideração a intensidade de marcação e a porcentagem de células marcadas. As análises univariadas e multivariadas com nível de significância de 5% mostraram que houve diferença entre a expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Menor acetilação de H3 (H3K9Ac) foi

observada em carcinomas mamários em relação ao tecido mamário normal, além disso, houve menor expressão de HDAC1 e HDAC2 em tecidos mamários neoplásicos em relação ao tecido normal ($p < 0,05$). Em contrapartida, a HDAC6 apresentou maior expressão em tecidos mamários neoplásicos ($p < 0,05$). Não houve diferença na expressão de H4 acetilada (H4K12Ac) entre os grupos ($p > 0,05$). A análise multivariada mostrou associação positiva entre a expressão de HDAC1 e HDAC2 e negativa entre H3K9Ac e HDAC6. A partir dessas associações foi possível observar a expressão aberrante nos carcinomas de mama em comparação aos tecidos mamários normais, evidenciando que existem alterações epigenéticas em neoplasias mamárias de cadelas e que a alta expressão de HDAC6 pode justificar a hipoacetilação de H3 observada em tecidos neoplásicos. Em conjunto, pode-se supor que essas modificações são importantes achados e podem, futuramente, ser alvos terapêuticos para o tratamento do câncer mamário em cadelas.

Palavras-chave: epigenética, hipoacetilação, canino, neoplasia mamária

2. Introdução

Entre as fêmeas caninas adultas e inteiras, as neoplasias mamárias malignas espontâneas representam cerca de 60% dos casos clínicos oncológicos, motivo pelo qual têm sido alvo de muitas pesquisas desenvolvidas na medicina veterinária (Brodey et al., 1983; Rodaski e Piekarz, 2008; Peña et al., 2014). Ademais, estas neoplasias mamárias são muito semelhantes às que ocorrem nas mulheres, porém com uma incidência até três vezes mais elevada (Shafiee et al., 2013). Na literatura relata-se que pacientes com neoplasias que possuem o mesmo tipo histológico, grau histológico e estadiamento nem sempre apresentam a mesma evolução da doença fazendo-se necessária a busca por critérios mais acurados para a seleção de pacientes que se beneficiarão de tratamentos mais agressivos (Eisenber e Koifman, 2001; Rasotto et al., 2017).

A mastectomia é o tratamento de eleição, entretanto alguns pacientes irão se beneficiar de quimioterapia adjuvante no pós-operatório, mas a resposta a esse tratamento não é uniformemente eficiente (Sorenmo et al., 2020).

Fatores prognósticos podem ser estabelecidos pelas características clínicas, patológicas, biológicas ou o conjunto destas, sendo estes específicos e individuais. Fatores prognósticos auxiliam a prever a evolução clínica e sobrevida de pacientes após a cirurgia inicial, mas nem sempre a observância destes fatores dá ao oncologista a correta previsão do curso da doença. Portanto, a busca por iniciativas e métodos que auxiliem no diagnóstico, monitoramento e

estabeleçam o prognóstico dos pacientes deve ser constante (Calvantti et al., 2006; Cassali et al., 2014)

Na medicina humana, há muitos anos estudam-se fatores prognósticos, assim como, métodos de diagnóstico e monitoramento que tornaram possível selecionar pacientes para tratamentos específicos e individualizados, com intensidade e eficácia adequadas, fornecendo suporte para prever o comportamento e a evolução clínica dos tumores mamários de mulheres (De Abreu e Koifman, 2002; Marinho et al., 2008).

O epigenoma é um registro biológico das modificações químicas do DNA e das histonas que não induzem alterações na sequência do DNA. Exemplos representativos de alterações epigenéticas incluem metilação do DNA, acetilação de histonas e remodelação da cromatina. Essas modificações epigenéticas desempenham importância na regulação da expressão gênica e do fenótipo celular. Por outro lado, a desregulação epigenética contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer (Kristensen et al., 2009; Jones et al., 2016).

Recentes estudos apontam mecanismos epigenéticos no desenvolvimento do câncer (Ferraresso et al., 2014; Lu et al., 2020; Moufarrij et al., 2020). Em humanos, vários estudos sugeriram que as histonas desacetilases (HDACs) são superexpressas na maioria dos tumores e que a atividade excessiva das HDACs mediará a desacetilação das histonas, diminuindo assim a expressão de genes supressores de tumores (Nakagawa et al., 2007; Xu et al., 2007; Uehara et al., 2012; Eckschlager et al., 2017).

Como a desacetilação de histonas por HDACs é reversível, demonstrou-se que os inibidores de enzimas desacetilases (iHDACs) exercem atividade antitumoral importante em várias linhagens celulares de humanos e de animais, *in vitro* e *in vivo*, por modularem a progressão tumoral agindo até mesmo no microambiente tumoral e em nichos tumorais pré-metastáticos, desta forma melhorando o prognóstico do paciente (Marquard et al., 2009; Eto et al., 2019; Lu et al., 2020; Moufarrij et al., 2020).

Além de representarem alvo terapêutico importante, as modificações epigenéticas exercem influência direta sobre o prognóstico dos pacientes, fato bem documentado na medicina humana, particularmente nas neoplasias mamárias (Krusche et al., 2005; Elsheikh et al., 2009; Muller et al., 2013), e em fase inicial na medicina veterinária (Bryan et al., 2009; Eto et al., 2019; Sierra, 2019).

A hipoacetilação das histonas H3 e H4, além de expressões aberrantes das HDACs 1, 2 e 6 parecem representar um componente importante na desregulação epigenética humana, e o mesmo parece se repetir entre os animais (Taunton et al., 1996; Kouzarides, 2007; Jones et al., 2016; Eto et al., 2019; Sierra, 2019). Estudo acerca desse tema em neoplasias mamárias de cadelas são escassos e envolvem outros mecanismos epigenéticos, entretanto, demonstram existir alterações epigenéticas nas células tumorais (Liu et al., 2014).

Diante do desafio em se estabelecer o prognóstico mais preciso e seguro para cadelas com tumores de mama, somado a possibilidade de se encontrarem alvos terapêuticos que melhorem o tempo de sobrevivência dos pacientes caninos, a condução de estudos sobre modificações de histonas pode contribuir com essas finalidades. Sendo assim, concebeu-se este estudo com o propósito de se avaliar o padrão de acetilação das histonas H3 e H4 e a expressão das enzimas HDACs 1, 2 e 6 em tecidos mamários neoplásicos e não neoplásicos de cadelas, a fim de encontrar possíveis modificações epigenéticas que possibilitem antever, futuramente, ferramentas adicionais para aperfeiçoar de forma mais acurada o prognóstico, bem como, a possibilidade de se conseguir possíveis alvos terapêuticos no tratamento dessa neoplasia em cadelas.

3. Material e métodos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal (protocolo nº 016384/17), e os tutores que aderiram ao projeto foram orientados e assinaram um termo de consentimento livre esclarecido.

3.1 Seleção dos pacientes e coleta das amostras

Neste estudo foram selecionadas 61 cadelas que apresentaram diagnóstico de carcinomas mamários simples (papilar, tubular e sólido), sem predileção de raça e idade, atendidas no Serviço Obstetrícia Veterinária e no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da FCAV/UNESP Campus de Jaboticabal, Brasil e submetidas ao estadiamento clínico das neoplasias, mediante exame físico detalhado, exames laboratoriais e de imagem (ultrassonografia abdominal e radiografia torácica em três projeções).

Amostras dos tumores foram coletadas durante o procedimento de mastectomia total unilateral, durante o qual foi retirado o linfonodo regional (inguinal e axilar), para avaliação histopatológica, de acordo com o protocolo cirúrgico praticado no Hospital Veterinário. De cada cadela foi avaliado apenas um nódulo; animais que apresentavam mais de um nódulo permanecerem no estudo, entretanto, foi considerado aquele com pior prognóstico que compreendia um carcinoma simples (papilar, tubular ou sólido), a fim de determinar o tempo de sobrevida global das pacientes. Cadelas com carcinomas de subtipos especiais, carcinomas em tumor misto e sarcomas mamários foram excluídas do experimento (Cassali et al., 2014; Rasotto et al., 2017).

Após análise histopatológica, as amostras foram separadas em grupos, de acordo com o diagnóstico firmado. Adicionalmente as 61 amostras de carcinomas simples, 19 amostras de adenoma mamário simples e 11 amostras de tecido mamário histologicamente sem alterações, ambas provenientes do banco de dados do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP, foram também empregadas na análise.

As amostras foram divididas em quatro Grupos:

- Grupo 1 (G1), (controle) composto por 11 mamas sem alterações histológicas;
- Grupo 2 (G2), composto por 19 amostras de adenomas mamários simples;
- Grupo 3 (G3), composto por 46 amostras de carcinomas mamários simples sem metástase, conforme estadiamento clínico;
- Grupo 4 (G4), foi composto por 15 amostras de carcinomas mamários simples com metástase em linfonodo regional, detectado pela avaliação histológica.

Todas as amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% por um período de 24 a 48 horas e, em seguida, armazenadas em álcool 70% até o momento do processamento. Posteriormente, as amostras foram processadas, incluídas em parafina, cortadas na espessura de 4 μ e coradas em hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica e para realização da técnica de imuno-histoquímica.

As cadelas que apresentaram metástase à distância no momento do diagnóstico foram excluídas do projeto. Todavia, aquelas que desenvolveram metástase durante o acompanhamento e após a mastectomia permaneceram dentro do estudo.

Para determinação do tempo de sobrevida global (TSG) levou em consideração o dia do diagnóstico até a data de morte. Nos casos em que o animal permanecia vivo ao final dos 3 anos (tempo mínimo de acompanhamento do último animal), estes eram classificados como censurados, as informações foram atualizadas ao final do período experimental por meio de ligações telefônicas aos tutores e registradas nos prontuários.

3.2 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot

Para a análise do Western Blot (WB), foram selecionadas 6 amostras de carcinomas mamários simples congeladas em nitrogênio líquido, duas amostras de cada subtipo (papilar, tubular e sólido). Os tecidos foram homogeneizados a 4°C em tampão RIPA (pH 7,4), contendo Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, 1% NP-40, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS a 0,1% e coquetel inibidor de protease (# P8310 - Sigma). O homogenato foi centrifugado a 14000g a 4°C durante 20 min. Os níveis de proteína do sobrenadante foram determinados pelo método de Lowry usando albumina bovina (BSA) como padrão. O sobrenadante foi misturado com tampão de amostra (20% de glicerol, 125 mM de Tris-HCl, 4% de SDS, 100 mM de ditiotreitol, 0,2% de azul de bromofenol, pH 6,8) e a mistura foi fervida e submetida à análise de SDS-PAGE a 10% em géis de poliácridamida. A seguir, as proteínas foram transferidas do gel para as membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com albumina a 5% por 4 h e incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários para acetil Histona H4 [Ac-Lys12] (1: 1000, anti-coelho, Sigma-Aldrich), HDAC1 (1: 1000, anti-coelho, Sigma-Aldrich), HDAC2 (1: 2000, anti-camundongo, SigmaAldrich), acetil Histona H3 [Ac-Lys9] (1: 1000, anti-camundongo, Sigma Aldrich) e HDAC6 (1: 3000, anti-coelho, Sigma-Aldrich). GAPDH (1: 1000, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA) e β -actina (1: 5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) foram utilizados como controle de carregamento. O anticorpo primário foi detectado usando anticorpo secundário conjugado com peroxidase e visualizado usando reagentes ECL. A documentação do gel e a quantificação do sinal foram realizadas usando o Bio-Image Analysis do sistema Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA). Os resultados foram normalizados usando GAPDH e B-actina para H3Ac, HDAC6 e H4Ac, HDAC1, HDAC2, respectivamente. As bandas de marcação foram evidenciadas e as amostras quantificadas a título de validação dos anticorpos em tecido canino.

3.3 Reação imuno-histoquímica para histonas e enzimas desacetilases

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas para avaliar as expressões das histonas acetiladas H3 lisina 9 (H3K9Ac) e H4 lisina 12 (H4K12Ac) e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 nas amostras de tecido mamário saudável e neoplásico, nos diferentes grupos experimentais. Para isso, foram cortados os blocos com as amostras parafinizadas na espessura de 3µm e estendidas em lâminas de vidro silanizadas. Inicialmente, as lâminas foram desparafinadas e reidratadas, como realizado rotineiramente e as seções foram submetidas à recuperação antigênica em micro-ondas, perfazendo 3 ciclos de 4 minutos cada e incubação com o anticorpo primário conforme descrito na Tabela 1. Para a detecção, foi utilizado um sistema comercial de detecção de polímeros (polímero Novolink DS, Leika Byosystems) em todas as reações. Finalmente, as amostras foram contra coradas com hematoxilina de Harris e montadas após a desidratação em concentrações graduadas de álcool e xilol. Como controle das reações, utilizou-se amostra de mama humana gentilmente cedida pelo laboratório VETPAT (Campinas, SP) e como controle positivo nas amostras de tecidos neoplásicos, utilizou-se como base o tecido mamário saudável adjacente. Como controle negativo das reações de imuno-histoquímica os anticorpos primários foram substituídos por diluentes de anticorpo.

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica para pesquisa da expressão de histonas e histonas desacetilases em amostras de tecido mamário normal e neoplásico de cadelas.

Anticorpo*	Clone	Origem	Tipo	Diluição	Recuperação Antigênica
Anti-Acetil Histona H3 (Ac-Lys9)	AH3-120	Camundongo	Monoclonal	1:100	Tampão Citrato (pH 6,0)
Anti-Acetil Histona H4 (Ac-Lys12)	SAB42000353	Coelho	Fração de IgG	1:200	Tampão Citrato (pH 6,0)
Anti-HDAC1	AV38530	Coelho	Fração de IgG	1:75	Tampão EDTA± (pH 9,0)
Anti-HDAC2	HDAC2-62	Camundongo	Monoclonal	1:500	Tampão Citrato (pH 6,0)
Anti-HDAC6	AV31451	Coelho	Isolado	1:500	Tampão Citrato (pH 6,0)

* Sigma-Aldrich; ± Ácido etilenodiamino tetra-acético; Todos os anticorpos foram incubados por duas horas a temperatura de 22 C°.

3.4 Avaliação dos resultados das reações imuno-histoquímicas

A confirmação da expressão nuclear em seções imunocoradas para H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1 e HDAC2 foi por meio da visibilização de tonalidades do marrom difusas nos núcleos das células das amostras que compuseram os diferentes grupos experimentais e semelhantes às expressões observadas nos controles positivos. A interpretação dos resultados da imuno-histoquímica foi analisada obtendo-se um escore de marcação. Para essa finalidade, adotou-se o seguinte protocolo: cinco campos aleatórios (de cada amostra) foram fotografados em aumento de 400 vezes, usando o microscópio Novel (BM2100) acoplado a câmera Biotika (CMOS-HD) e realizada a contagem manual de 100 células por campo utilizando a ferramenta "Contador de células" do programa Image J software (v. 1.44p.), com posterior extração da média aritmética desses valores. O campo de células foi ranqueado por porcentagem de células positivas (negativo= 0; 1-25%=1; 26-50% =2; 51-75% =3; 76-100% =4) e pela intensidade de marcação, que foi avaliada de forma cega por dois observadores (negativo=0; fraca=1; moderada= 2 e intensa =3). Por fim, os dois ranques (porcentagem e intensidade de marcação) foram multiplicados e o escore de marcação obtido foi utilizado para as análises estatísticas entre os grupos (Zhao et al, 2016).

Particularmente, para as reações com o anticorpo HDAC6, um método diferente foi utilizado devido à sua expressão citoplasmática e impossibilidade de contar células separadamente. A expressão positiva foi caracterizada pelo aparecimento de tonalidades de marrom no citoplasma das células, considerando-se a área marcada. A porcentagem total de área positiva para HDAC6 foi calculada obtendo-se imagens com aumento de 400 vezes de cinco campos aleatórios, da mesma forma que para os demais anticorpos e conforme descrito anteriormente (Withers et al., 2019). Primeiro, a área celular total foi determinada e medida para cada imagem e as áreas não celulares foram excluídas pela seleção manual. Depois disso, uma área positiva foi selecionada manualmente e limiarizada para destacar apenas as células positivas. A área selecionada foi medida e o resultado foi dividido pela área celular total dessa imagem e multiplicada por 100. Assim, uma porcentagem foi calculada para cada imagem. Uma porcentagem final foi estimada a partir da média das cinco imagens para cada amostra.

3.5 *Análise estatística*

Para comparar a expressão das histonas (H4K12Ac, H3K9Ac) e das histonas desacetilases (HDAC 1 e 2) dentro e entre os diferentes grupos (G1, G2, G3, G4) foi realizado o teste de Kruskal Wallis e posteriormente o teste de Dunn's. Para a HDAC6, por ter sido analisada em porcentagem de células marcadas, apenas a comparação entre os grupos foi realizada não participando da análise comparativa entre as histonas dentro dos grupos experimentais.

Para determinar o comportamento e associação das histonas e das enzimas HDAC dentro e entre grupos, foram utilizadas análises estatísticas multivariadas. Primariamente, foi realizada análise de agrupamento pelo método hierárquico para procurar pacientes (subgrupos) diferentes dentro de cada grupo experimental. Este método foi usado nos quatro grupos e cada subgrupo encontrado foi denominado aleatoriamente como A e B.

Secundariamente, foi realizada análise de componentes principais com o intuito de se obter a interação entre os subgrupos (A e B) e variáveis latentes, denominadas componentes principais (CP1, CP2). Posteriormente foi realizada análise exploratória de fatores para se determinar os processos (fatores) que explicariam a variância total dos dados. Para determinar o número de fatores foram considerados os dois primeiros autovalores (segundo o critério de Kaiser e rotação de fatores Varimax), marcados como relevantes as variáveis que apresentaram cargas absolutas maiores a 0,5. A seguir, os fatores (F1 e F2) foram comparados nos subgrupos A e B utilizando o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Com intuito de diferenciar os grupos foram selecionados apenas os valores de H3K9Ac, HDAC2, HDAC1 e HDAC6 por apresentarem maior carga na análise exploratória de fatores. Foram considerados os dois primeiros autovalores, como mencionado anteriormente. Com os valores de cada fator (F1, F2) foram realizadas curvas ROC entre os grupos (G2, G3, G4) e G1 determinando especificidade, sensibilidade e ponto de corte.

Para determinar as curvas de sobrevida foram utilizadas a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida global, comparadas pelo teste de Long-rank.

Para as análises utilizaram-se os programas R e Statistica adotando um nível de significância de 0,05.

4. Resultados

O carcinoma papilar (Cassali et al., 2014) foi o tipo histológico, mais frequentemente diagnosticado (27/61; 44,26%), seguido do carcinoma tubular (24/61; 39,34%) e do carcinoma sólido (10/61; 16,40%). Com relação à frequência das raças, os animais sem raça definida (SRD) foram à maioria (20/61; 33%) e a idade variou de 5 a 15 anos (média de $10 \pm 2,42$) (Tabela 02). As variáveis clínico-patológicas das cadelas portadoras de carcinomas mamários simples estão apresentadas na tabela 02.

Tabela 2. Variáveis clínico-patológicas observadas nos animais com carcinoma mamário simples.

Variável Clínica		No. de cães	Porcentagem	Média (intervalo)
Raça	SRD	20	33%	
	Poodle	6	10%	
	York Shire Terrier	6	10%	
	Pinscher	5	8%	
	Pitbull	4	6%	
	Outros	20	33%	
Idade (anos)				10 (5-15)
Estágio	I	36	59%	
	II	8	13%	
	III	2	3%	
	IV	15	25%	
Tamanho (maior eixo)	<3 cm	42	69%	
	≥ 3 cm	19	31%	
Grau histológico	I	28	46%	
	II	21	34%	
	III	12	20%	
Índice mitótico	0-9	40	66%	
	>9	21	34%	

SRD: Sem raça definida; <3 cm: menor do que três centímetros; ≥ 3 cm: maior ou igual a três centímetros; Índice mitótico segundo Santos et al. (2013).

As variáveis clínico-patológicas da presença de necrose e ulceração não foram incluídas na tabela diante da baixa frequência encontrada nesse estudo.

4.1 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot

A expressão proteica foi detectada pela técnica de Western Blot em carcinomas mamários simples de cão frente aos anticorpos testados (Figura 01). Os resultados comprovaram a imunorreatividade dos anticorpos humanos com o tecido canino, validando, desta forma, as reações imuno-histoquímicas.

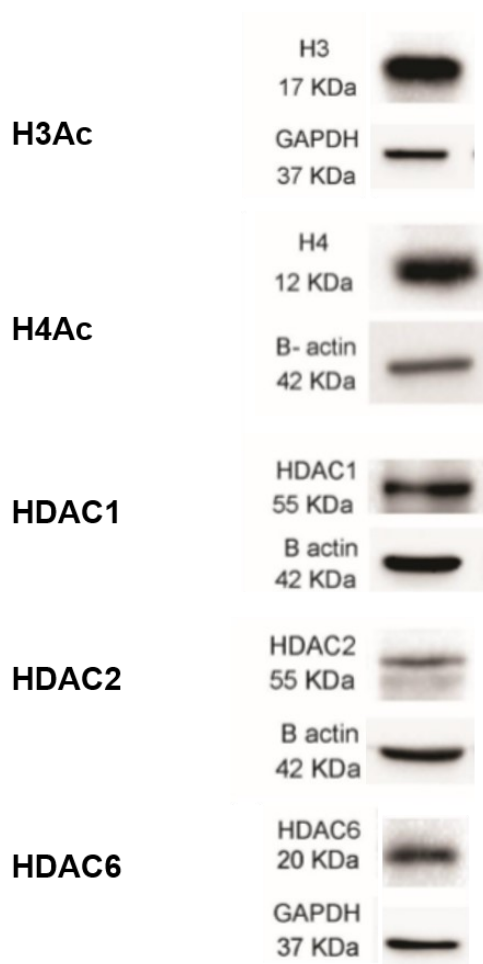


Figura 1- Validação da expressão proteica das histonas acetiladas (H3K9Ac e H4K12Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) pela técnica de Western Blot em carcinomas mamários simples de cadelas.

4.2 Imunoexpressão das histonas acetiladas e isoenzimas desacetilases pela análise univariada

A marcação dos anticorpos ocorreu em todos os grupos analisados. Quando comparados os padrões de marcação com o controle positivo, foram observadas semelhanças, pois a

H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1 e HDAC2 tiveram marcação predominantemente nuclear e a HDAC6 marcação predominantemente citoplasmática (Figura 03).

Pela a análise univariada dentro dos grupos experimentais no G1 não houve diferença entre a expressão dos anticorpos ($p>0,05$), todavia, no G2 houve diferença entre a expressão da HDAC2 e HDAC1 ($p=0,0001$) e entre H4K12Ac e HDAC1 ($p=0,0004$), como maior expressão de HDAC2 e H4K12Ac em relação a HDAC1. No G3 foi observada diferença entre H4K12Ac e H3K9Ac ($p<0,0001$) e H4K12Ac e HDAC1 ($p=0,0001$), entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre os demais anticorpos ($P>0,05$). Da mesma forma para o G4 houve diferença entre H4K12Ac e H3K9Ac ($p=0,0004$) e H4K12Ac e HDAC1 ($p=0,0001$). De modo geral para os grupos G3 e G4 houve maior expressão de H4K12Ac comparado com as expressões de H3K9Ac e HDAC1 (Figura 2).

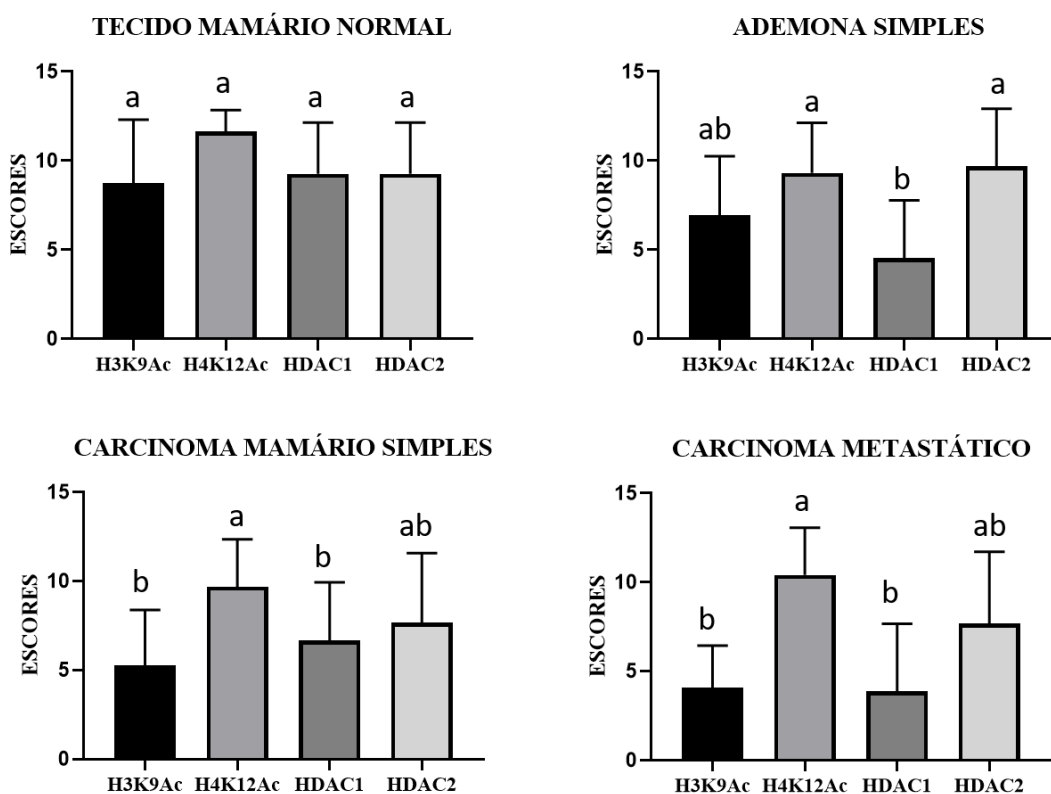


Figura 2- Representação gráfica dos escores de marcação da H4K12Ac, H3K9Ac, HDAC1 e HDAC2 para os grupos tecido mamário normal (G1), adenoma simples (G2), carcinoma simples (G3) e carcinoma metastático (G4) de cadelas. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística ($p<0,05$).

Na análise estatística entre os grupos foi encontrada diferença no teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) para os escores dos anticorpos HDAC1, HDAC2 e H3K9Ac entre os grupos e para a porcentagem de marcação da isoenzima HDAC6, sem, contudo ter sido observada diferença significativa para o escore de marcação do anticorpo H4K12Ac ($p > 0,05$) entre os grupos.

Foi observada diferença estatística para H3K9Ac entre os grupos G1 e G3 ($p = 0,0223$), G1 e G4 ($p = 0,00227$) e G2 e G4 ($0,0289$). Avaliando a expressão da HDAC1 foi observada diferença nos escores de marcação entre os grupos G1 e G2 ($p = 0,0018$), G1 e G4 ($p = 0,0004$) e G3 e G4 ($p = 0,0106$) com uma maior expressão no tecido mamário normal em relação aos adenomas simples e carcinomas agressivos. Ademais, também foi encontrada diferença significativa na expressão semiquantitativa de HDAC2 para os grupos G1 e G3 ($p = 0,0066$), G1 e G4 ($p = 0,0356$), havendo menor expressão de HDAC2 em carcinomas mamários em relação ao tecido normal.

Por fim, a imunomarcação de HDAC6 também apresentou diferença significativa entre os grupos, havendo diferença na porcentagem de área positiva entre os grupos G1 e G3 ($p = 0,0054$) e G1 e G4 ($p = 0,0455$), para essa isoenzima há maior expressão em carcinomas mamários comparado com os tecidos mamários normais. Os resultados da análise de marcação dos anticorpos nos grupos G1, G2, G3 e G4 estão representados na figura 03.

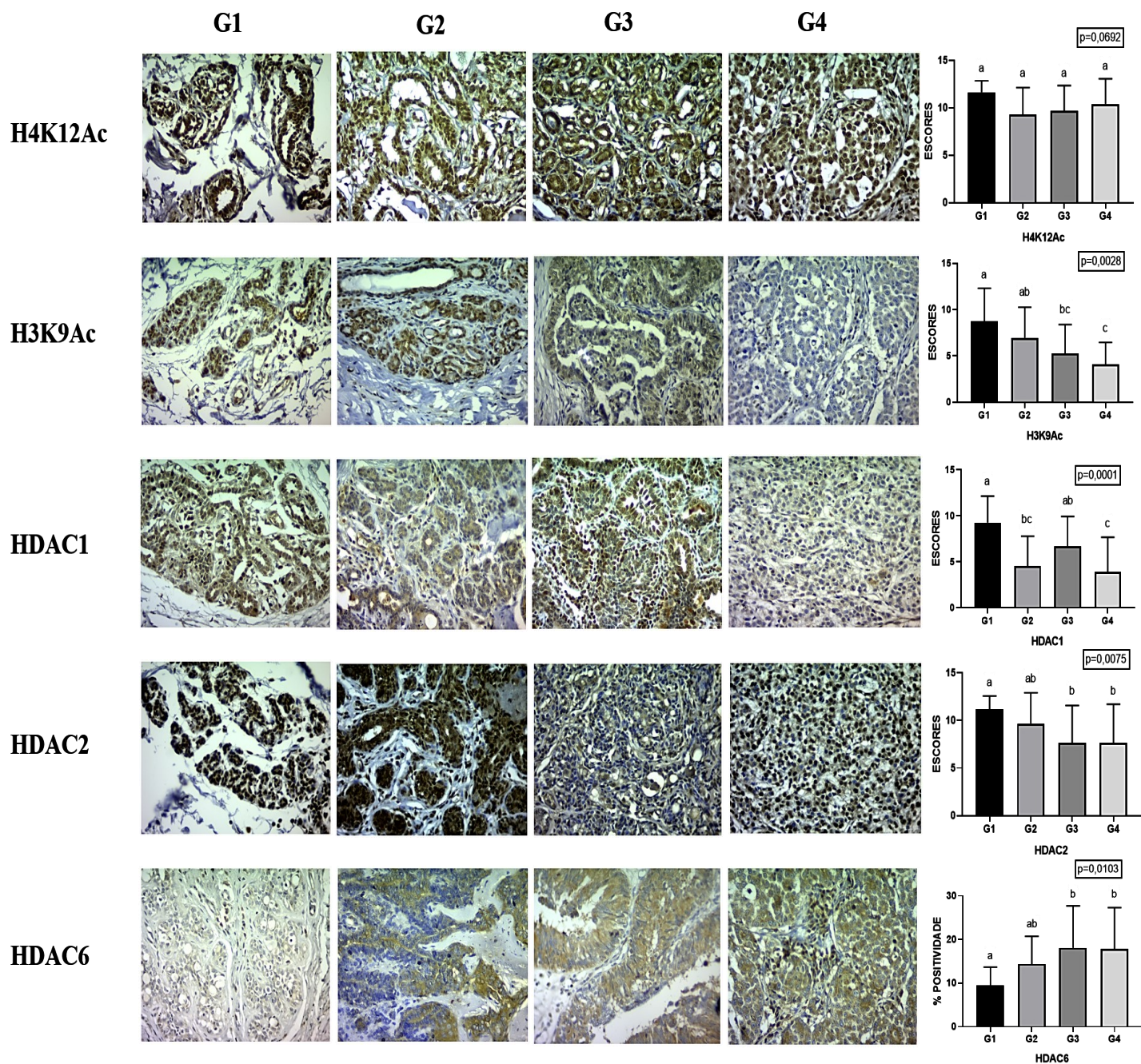


Figura 03: Fotomicrografia das marcações de histonas acetiladas e isoenzimas HDACs, bem como, os escores de marcação para cada grupo experimental. Imunomarcação predominantemente nuclear das histonas acetiladas H4K12 e H3K9 e das isoenzimas HDAC1 e HDAC2 e marcação citoplasmática da HDAC6 em tecido mamário normal (G1), adenoma mamário simples (G2) carcinoma mamário simples não metastático (G3), carcinoma mamário simples metastático (G4) de cadelas. Reação imuno-histoquímica, X400.

4.3 Imunoexpressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases pela análise multivariada

Vale ressaltar que houve uma associação positiva pela análise exploratória dos fatores no G1 para a expressão de H3K9Ac e HDAC6, enquanto a associação para a expressão desses mesmos anticorpos foi negativa para os grupos G3 e G4. Associação semelhante foi observada entre os grupos G2 e G3 para expressão das H4K12Ac e H3K9Ac e entre os grupos G3 e G4 para expressão de HDAC1 e HDAC2, em ambos os casos foi observada associação positiva. Não houve semelhança no padrão de associação da expressão dos anticorpos entre G1 e os demais grupos.

Na comparação entre os subgrupos A e B em cada grupo experimental no grupo G1 houve diferença entre os subgrupos A e B para a expressão associada positivamente de H3K9Ac e HDAC6 ($p=0,0006$), para o G2 houve diferença significativa entre os subgrupos para associação negativa entre HDAC1 e HDAC6 ($p=0,005$). Analisando os grupos com carcinomas mamários, ambos grupos G3 e G4 apresentaram diferença significativa entre os subgrupos para associação positiva da HDAC1 e HDAC2 ($p<0,05$). Podemos notar com esses resultados que dentro dos grupos com neoplasia maligna existem padrões de expressão diferentes, podendo dicotomizar os subgrupos A e B.

Após confirmarmos que existe uma dicotomização real das amostras dos grupos G3 e G4 baseado na expressão associada de histonas queríamos saber se essa subdivisão teria impacto prognóstico nos animais. Entretanto, não foi observada diferença significativa no TSG dos animais A e B do grupo G3 ($p=0,59$), nem tão pouco, diferença entre os animais subdivididos A e B do grupo G4 ($p=0,90$) (Figura 5)

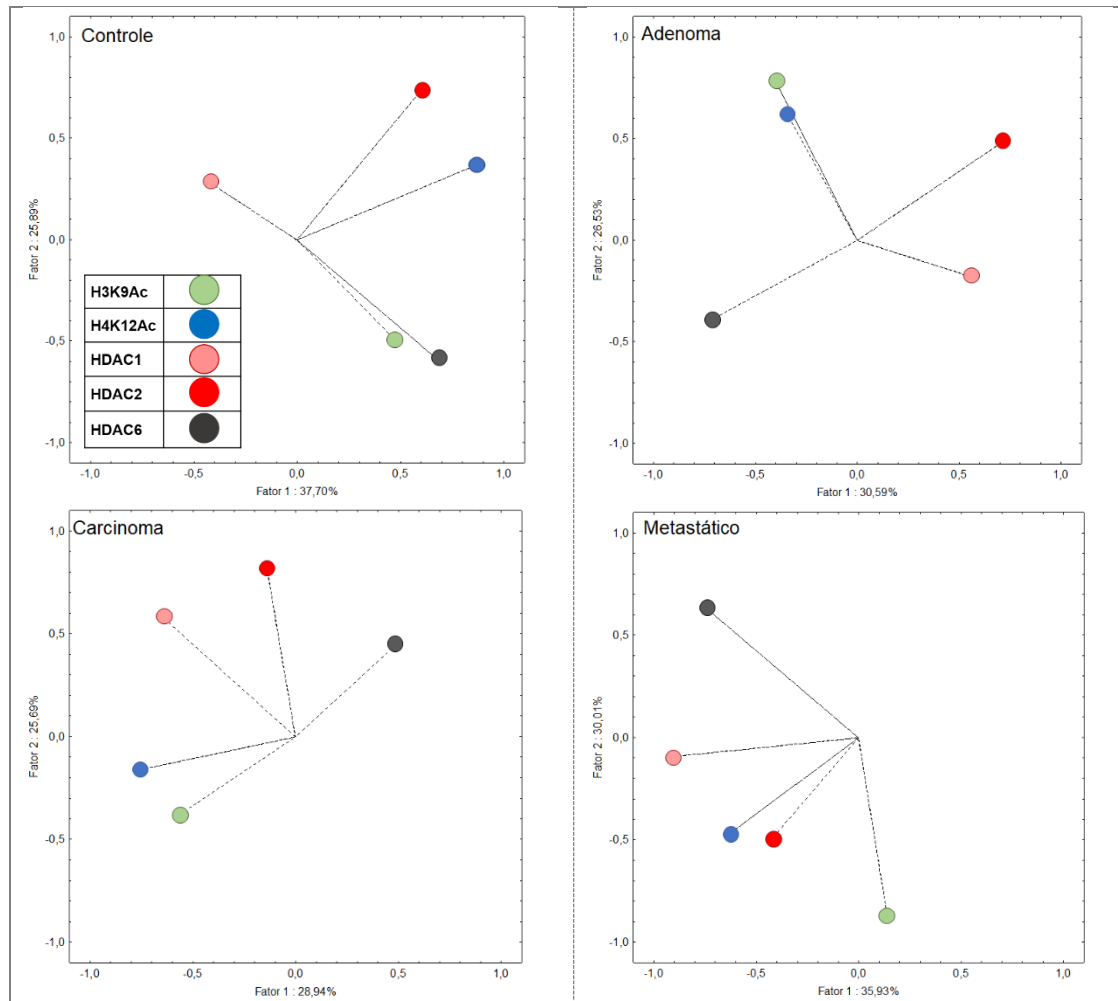


Figura 4- Análise multivariada de componentes principais para cada grupo experimental, conforme associação entre a expressão das histonas acetiladas (H3K9 e H4K12) e enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6). As cores representam os diferentes anticorpos e estão devidamente identificadas na legenda.

Tabela 3: Resultado da análise multivariada exploratória de fatores, teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, da histona acetilada H3 (H3K9), histona acetilada H4 (H4K12) e das enzimas histonas desacetilases (HDAC 1,2,6) em tecido mamário normal (G1), adenoma simples (G2), carcinoma mamário simples (G3) e carcinoma mamário simples metastático (G4) de cadelas.

Anticorpo		G1		G2		G3		G4	
		F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
H3K9Ac		0,10	0,68	0,04	0,85	0,73	-0,06	0,29	0,79
H4K12Ac		0,86	0,31	0,01	0,68	0,58	0,20	0,58	0,09
HDAC1		0,91	-0,12	0,82	0,05	0,30	0,80	0,79	-0,34
HDAC2		-0,10	-0,45	0,38	-0,42	-0,24	0,77	0,75	0,21
HDAC6		0,09	0,88	-0,79	0,01	-0,61	0,15	0,32	-0,87
Variância (%)		32	31	29	27	28	26	35	30
Interpretação		H4K12Ac	H3K9Ac	HDAC1	H4K12Ac	H3K9Ac	HDAC1	HDAC1	H3K9Ac
		HDAC1	HDAC6	HDAC6	H3K9Ac	HDAC6	HDAC2	HDAC2	HDAC6
Teste Wilcoxon-Mann-Whitney p valor		0,41	<0,001	0,005	0,067	0,051	<0,001	<0,001	0,082
Subgrupo	A	-0,01 a	-0,69 a	0,70 a	-0,50 a	-0,09 a	-0,70 a	-0,53 a	0,32 a
	B	-0,01 a	1,20 b	-0,51 b	0,36 a	0,10 a	0,77 b	1,05 b	-0,63 a

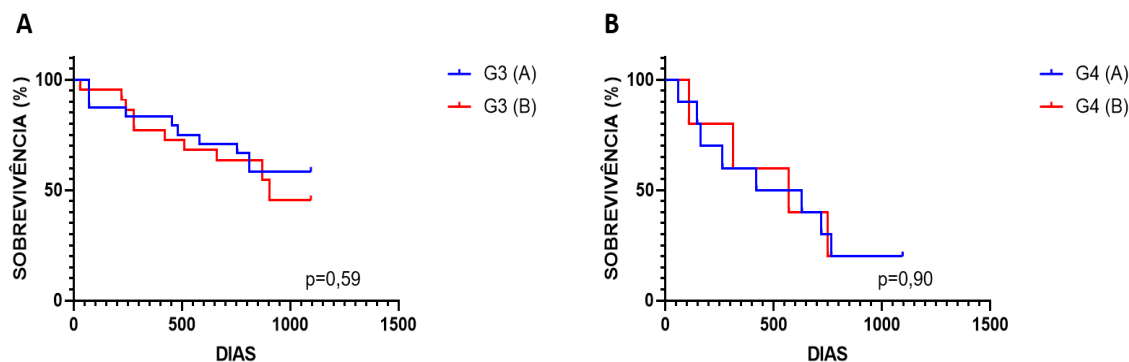


Figura 5- Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para os subgrupos A e B do grupo G3 (A) e G4 (B) em relação à associação entre imunomarcacão identificada pela análise multivariada exploratória dos fatores.

Após terem sido feitas as análises multivariadas dentro de cada grupo experimental, realizou-se a análise multivariada entre os grupos. Identificados dois fatores (Fator 1 e Fator 2) que explicam 61,89% da variância entre os grupos. Pelo Fator 1 houve associação positiva entre a expressão da HDAC2 e HDAC1 e pelo Fator 2 houve associação negativa entre a expressão da H3K9Ac e HDAC6 (Tabela 4).

Após definidos os fatores foram realizadas as comparações entre os grupos pelo teste ANOVA levando em conta o índice gerado após análise exploratória dos fatores, observamos diferença entre os grupos para o Fator 1 ($p=0,02$) e para o Fator 2 ($p=0,0002$). Foi observada diferença significativa para o Fator 1 entre o G1 e os demais grupos, não havendo diferença estatística entre os demais grupos. Para o Fator 2 houve diferença significativa entre os grupos G1 e G3 e G1 e G4, não havendo diferença na comparação para os outros grupos (Tabela 4). Com isso, podemos observar um padrão de expressão diferente para a associação positiva entre HDAC1 e HDAC2 entre o tecido mamário normal e os tecidos neoplásicos. Para a associação negativa entre H3K9Ac e HDAC6 uma diferença entre o tecido mamário normal e os tecidos mamários com neoplasia maligna.

Com o objetivo de elucidar ainda melhor essa diferença no padrão de expressão epigenética nos diferentes tecidos e mensurar o quanto essa diferença seria sensível e específica para diferenciar tecidos normais de neoplásicos, os valores dos índices obtidos após análise exploratória dos fatores foram submetidos à análise da área sob a curva (ROC) para definição de um ponto de corte e cálculo de especificidade e sensibilidade. Dentre os

principais resultados podemos destacar uma alta sensibilidade para diferenciação entre tecidos mamários normais e adenomas simples (100%) e tecidos mamários normais e carcinomas simples (90,9%) e uma alta especificidade entre tecidos mamários normais e carcinomas metastáticos (90,9%) para o Fator 1. Já para o Fator 2 podemos destacar uma alta especificidade entre tecidos mamários normais e carcinomas simples (91,3%) e uma alta sensibilidade entre tecidos mamários normais e carcinomas metastáticos (93,3%). Os resultados estão descritos na tabela 5 e analisados graficamente na figura 6.

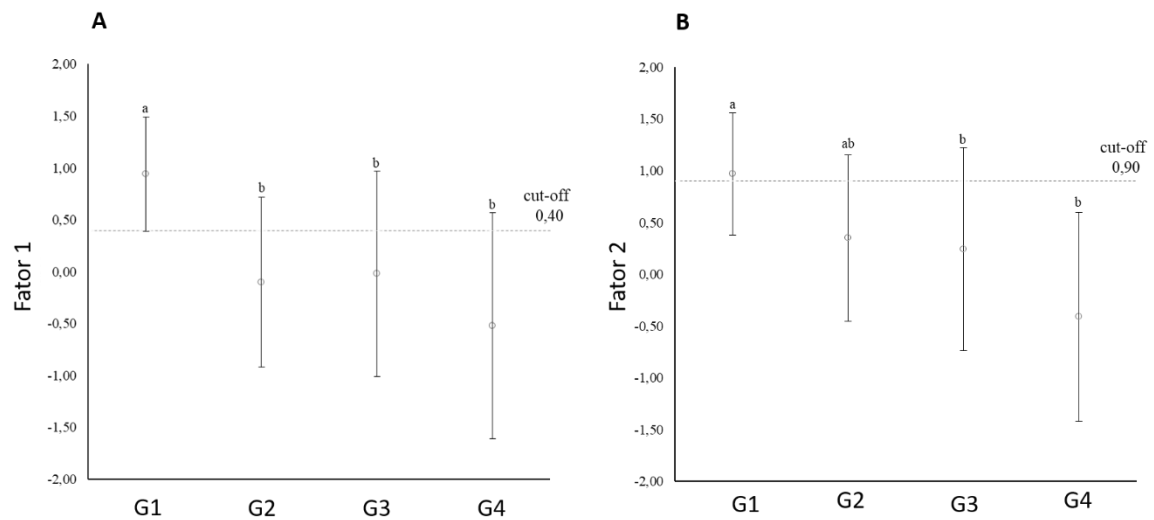


Figura 6- Representação gráfica dos pontos de corte estabelecidos pela curva ROC para o Fator 1 (A) e Fator 2 (B) baseados a análise exploratória dos fatores. Letras diferentes indicam de houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Resultado da análise exploratória de fatores, ANOVA e curva ROC da histona H3 (H3K9Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC 1,2,6) em tecidos mamários normais (G1), adenomas simples (G2), carcinomas simples (G3) e carcinomas simples metastáticos (G4) de cadelas.

	Fator 1	Fator 2
H3K9Ac	0,13	0,76
HDAC1	0,80	0,05
HDAC2	0,77	0,05
HDAC6	0,01	-0,80
Variância (%)	31,15	30,74
Interpretação	HDAC2 e HDAC1	H3K9Ac e HDAC6
ANOVA	0,002	0,0002
Significância estatística		
Comparações múltiplas das médias por grupo		
	n	
Controle (G1)	11	0,94 ± 0,55_a
Adenoma (G2)	19	-0,10 ± 0,82_b
Carcinoma Simples (G3)	46	-0,02 ± 0,99_b
Carcinoma Metastático (G4)	15	-0,52 ± 1,09_b
Análise ROC	Valor de corte (Sp/ Se)	
G2 vs G1	0,1 (68,4/ 100,0)	0,9 (73,7/ 72,7)
G3 vs G1	0,4 (73,9/ 90,9)	0,9 (91,3/ 72,7)
G4 vs G1	0,4 (90,9/ 80,0)	0,9 (72,7/ 93,3)

Sp: especificidade; Se: sensibilidade

5. Discussão

Esse é o primeiro estudo que investigou alterações epigenéticas, por meio da avaliação das histonas acetiladas H3 e H4 e enzimas desacetilases (HDAC 1, 2 e 6), comparando as respectivas expressões entre tecidos mamários normais, neoplasias mamárias benignas e neoplasias mamárias malignas de cadelas.

As alterações epigenéticas vêm sendo alvo de estudos na oncologia nos últimos anos, por apresentarem relação com a progressão tumoral e impacto no prognóstico dos pacientes

(Zhang et al., 2004; Elsheikh et al., 2009; Derr et al., 2014; Zhao et al., 2016). Ainda existem poucos estudos a cerca desse tema na medicina veterinária (Bryan et al., 2009; Eto et al., 2019; Sierra, 2019).

As técnicas de Western Blot, bem como, a imunomarcação imuno-histoquímica confirmaram a reatividade dos anticorpos utilizados em tecidos mamários caninos. Outros estudos do nosso grupo de pesquisa também evidenciaram a reatividade imuno-histoquímica com os mesmos anticorpos em linfoma cutâneo (Sierra, 2019) e linfoma difuso de grandes células B em cães (dados não publicados). O padrão de marcação observado em tecidos mamários caninos foi semelhante ao observado em tecidos mamários humanos em diversos estudos, bem como, nos tecidos do grupo controle do nosso estudo, com marcação predominantemente nuclear para a H4K12Ac, H3K9Ac, HDAC1, HDAC2 e marcação citoplasmática para HDAC6. (Zhang et al., 2004; Elsheikh et al., 2009; Müller et al., 2013).

Quando foram analisadas as expressões das histonas acetiladas e enzimas desacetilases nos grupos experimentais, observou-se que o tecido mamário normal apresentou expressões semelhantes de todas as proteínas e esse comportamento diferiu do adenoma apenas na expressão de HDAC1. Todavia, a expressão dos anticorpos nos tecidos mamários com neoplasia maligna exibiu um padrão semelhante de marcação, de forma geral houve menor imunomarcação de H3K9AC e HDAC1 em comparação a H4K12Ac.

Pode-se observar com esses resultados que existe um padrão de expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases para cada grupo. Adenomas e carcinomas, com ou sem metástases mantiveram um padrão de marcação com os anticorpos testados. Resultados mostrados por Suzuki et al. (2013), que avaliaram a expressão de H4K12Ac, HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em tecidos mamários normais e neoplásicos de mulheres foram semelhantes aos encontrados no estudo em tela.

Um resultado interessante acerca da expressão de H3K9Ac na comparação entre os grupos em que houve uma menor acetilação global de H3K9 em carcinomas se comparada ao grupo de tecidos mamários normais e ainda uma menor acetilação de H3K9 em carcinomas metastáticos em relação aos adenomas simples. Esse resultado vai ao encontro do reportado na literatura. Autores citam que um dos mecanismos de silenciamento de genes supressores tumorais está relacionado com a desacetilação de histonas, portando havendo uma menor acetilação em tecidos neoplásicos, correlacionando-se com um pior prognóstico da neoplasia

(Taunton et al., 1996; Kouzarides 2007; Jones et al., 2016). Outros estudos puderam comprovar essa teoria. Elsheikh et al. (2009) observaram uma menor acetilação da H3K9, avaliando amostras de 880 mulheres com tumor de mama e puderam demonstrar essa alteração em carcinomas de pior prognóstico, assim como nesse estudo. Da mesma forma, Webber et al. (2017) evidenciaram hipoacetilação da H3K9 em tumores de cavidade oral em humanos e esse evento estava relacionado com pior prognóstico.

Em cães um estudo recente avaliando o grau de acetilação da H3K9 foi realizado em carcinomas uroteliais, e os pesquisadores evidenciaram uma menor acetilação em tecidos neoplásicos em comparação a bexiga normal e que essas alterações apresentaram impacto sobre o prognóstico do paciente culminando num menor tempo livre de doença após a cirurgia (Eto et al., 2019). Fatores prognósticos não foram considerados na análise em nosso estudo, entretanto, o fato de observarmos hipoacetilação em neoplasias malignas, se comparada a tecidos mamários normais traz esperanças de encontrarmos relação com fatores prognósticos, bem como, essa alteração ser potencial alvo terapêutico no futuro.

Em relação à avaliação da H4K12Ac não foram observadas diferenças na acetilação dessa histona nos diferentes grupos e a princípio ela mantém uma alta expressão em todos os tecidos caninos analisados. Na literatura destaca-se que além da acetilação em lisina 12 existem outras marcas de acetilação das histonas que também estão envolvidas na expressão de genes transcricionalmente ativos como H4K16, H4K8 e H4K5 (Bernstein et al., 2005; Fraga et al., 2005; Pokholok et al., 2005). Além disso, as pesquisas mostram que a hipoacetilação tende a começar em H4K16, seguindo para H4K12 e assim por diante, de acordo com a progressão tumoral (Fraga et al., 2005).

O fato de não encontrarmos alterações globais em H4K12Ac abre margem para estudos posteriores analisando outras marcas de acetilação em tumores mamários de cadelas, até mesmo pensarmos que talvez diante dessa avaliação ainda não tenha sido possível encontrar alterações em H4K12. Em humanos, uma pesquisa mostrou alterações na acetilação em H4K12 nos tumores mamários, principalmente relacionados com o grau do tumor, algo que em nosso estudo não foi analisado, entretanto, eles observaram também uma maior alteração na acetilação da H4K16 estando hipoacetilada e relacionando-se com vários fatores prognósticos desfavoráveis (Elsheikh et al., 2009).

Considerando-se que as enzimas desacetilases participam diretamente do processo de modificação de histonas pós-traducionais e de proteínas não-histonas e sua desregulação foi detectada em vários tumores (Suzuki et al., 2009; Marquard et al., 2008; Muller et al., 2013; Zhao et al., 2016), ao analisarmos a expressão de HDAC1, uma enzima desacetilase classe I (Sharma et al., 2010), encontramos diferenças no escore de expressão entre os grupos experimentais. A HDAC1 está mais expressa em tecidos mamários normais e menos expressa em adenomas e principalmente em carcinomas simples com metástase em linfonodos. Essa alteração também foi evidenciada por Suzuki et al. (2009) onde após comparar a expressão em tecidos mamários humanos normais e neoplásicos observaram uma redução na expressão nos tecidos neoplásicos.

Em contrapartida, Muller et al. (2013) relataram expressões de intermediária a alta de HDAC1 em tumores mamários humanos, entretanto, nesse trabalho não houve comparação dessa expressão com tecidos mamários normais. Da mesma forma, Marquard et al. (2008) e Marquard et al. (2009) também encontraram em humanos uma alta expressão de HDAC1 em linfomas difusos de grandes células B e linfomas cutâneos de imunofenótipo T, todavia, não houve comparação dessa expressão com tecidos normais. O fato de encontrarmos alterações na expressão dessa enzima, particularmente uma menor expressão em tumores agressivos pode sugerir que a baixa expressão seja um fator prognóstico negativo e merece estudos complementares para confirmar essa alteração.

Resultados ainda não publicados por nosso grupo de pesquisa reforçam essa tese, pois quando analisamos essa enzima pela técnica de WB observamos baixa quantificação de HDAC1 em carcinomas mamários simples e carcinomas mamários metastáticos de cães, tal como identificamos na imuno-histoquímica no presente estudo.

Da mesma forma, observamos diferença no escore de expressão da HDAC2, uma isoenzima também de classe I (Glozak et al., 2010) e foi identificado que carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos exibiram menor expressão de HDAC2 em relação ao grupo controle, sugerindo uma diminuição de expressão dessa isoenzima em neoplasias malignas de mama. Esses achados, mais uma vez, são discordantes de alguns estudos em humanos, pois nessa espécie a alta expressão de HDAC2 foi notada em tumores mamários e apresentou relação com fatores prognósticos, além de ter figurado como um fator prognóstico independente (Weichert et al., 2008).

Por outro lado, também em humanos, realizando a comparação da expressão de HDAC2 em tecidos mamários normais e neoplásicos Derr et al., (2014) não observaram diferença na expressão dessa isoenzima. Ainda em humanos, Marquard et al. (2008) também puderam observar altas expressões de HDAC2 em dois tipos de linfomas. Esses resultados conflitantes podem demonstrar que a expressão de HDAC2 em tumores mamários de cadelas se comporta diferente do que observado em humanos (Weichert et al., 2008; Muller et al., 2013; Zhao et al., 2016). Ademais, muitos estudos não realizaram a comparação entre tecidos normais e neoplásicos, o que dificulta essa afirmação.

A análise univariada mostrou que a imunomarcagem de HDAC6, uma isoenzima de classe II também envolvida na desacetilação das histonas (Glozak et al., 2007) apresenta uma dinâmica diferente da exibida para HDAC1 e HDAC2. Neoplasias malignas apresentaram maior positividade para HDAC6 em comparação ao tecido normal, sem, contudo, demonstrar diferença em relação aos adenomas que também não apresentaram diferença do tecido normal. Essa maior porcentagem de positividade em tecidos neoplásicos também foi constatada por Hou et al. (2015) em adenocarcinomas prostáticos humanos, uma alta expressão foi observada nesses tecidos em comparação a tecidos não neoplásicos.

Resultados conflitantes, entretanto, foram relatados por Zhang et al. (2004) em carcinomas mamários, os pesquisadores observaram uma maior intensidade de marcação de HDAC6 em carcinomas pouco agressivos, todavia, não houve a comparação da intensidade com tecidos mamários normais e o método de avaliação para esse estudo foi diferente daquele empregado em nosso estudo, onde apenas a porcentagem de marcação foi computada para comparação entre os grupos de acordo com o descrito por Withers et al. (2019).

Quando se pesquisou a associação entre as histonas acetiladas e enzimas desacetilases, mediante formação hierárquica por cluster e componentes principais, buscando explicar a variância entre os subgrupos, foi observada uma associação positiva entre H3K9Ac e HDAC6 para formação dos subgrupos nos tecidos mamários normais. Já nos subgrupos de carcinomas metastáticos ou simples, essa associação foi negativa.

Esse resultado merece atenção se pensarmos que a provável desacetilação da H3K9 observada na análise univariada possa ser provocada pela alta expressão de HDAC6 em tumores mamários. Essa mesma relação não foi observada em tecidos não malignos, o que pode favorecer a teoria de que esse padrão de associação possa estar ligado a carcinogênese,

ou até mesmo ser uma consequência do tumor o que poderia comprometer a expressão de genes pós-traducionais (Glozak et al., 2007; Sharma et al., 2010).

Apesar de encontrarmos associação negativa entre a expressão de H3K9Ac e HDAC6 nos grupos G3 e G4, não houve diferença entre os subgrupos A e B, portanto essa associação, a princípio, apesar de presente dentro dos grupos não separa de maneira estatisticamente significativa os animais em subgrupos diferentes, o que não exclui a importância desse achado pela análise multivariada.

Comprovando os resultados encontrados na análise univariada em que houve semelhança no comportamento de HDAC1 e HDAC 2, uma associação positiva entre elas foi observada nos grupos G3 e G4 para a formação dos subgrupos A e B. Nesses mesmos grupos pudemos observar também diferença entre os subgrupos A e B, em que a expressão associada acontece de maneira diferente em duas populações de tumores. Mesmo observando essa diferença, não houve relação entre o prognóstico e o tempo de sobrevivência global dos animais.

Vários fatores podem afetar o prognóstico de cadelas com tumores mamários entre eles, o subtipo do tumor, tamanho do tumor, grau histológico, tratamentos realizados além de outros (Cassali et al., 2014; Rasotto et al., 2017). O fato de encontrarmos expressões aberrantes dessas enzimas em neoplasias mamárias caninas nos encoraja a pesquisar outras associações relacionadas com o prognóstico e alterações epigenéticas.

Após demonstrarmos que existem expressões aberrantes em neoplasias mamárias e que existem associações dessas expressões dentro dos grupos experimentais, foi realizada a análise exploratória de fatores com o intuito de diferenciar os grupos pela associação das histonas acetiladas e/ou enzimas desacetilases. Os grupos foram avaliados simultaneamente e os autovalores obtidos em F1 e F2 demonstraram novamente que houve associação positiva entre a HDAC1 e HDAC2 e associação negativa entre H3K9Ac e HDAC6. Esses eventos explicariam a maior parte da variância encontrada na diferenciação entre os grupos.

Os tecidos neoplásicos malignos e benignos apresentaram expressão aberrante em relação ao tecido normal para o F1, visto que, o índice obtido após análise exploratória diferencia estatisticamente esses grupos pela expressão conjunta das isoenzimas HDAC1 e HDAC2. Se compararmos com o resultado da univariada, podemos observar que elas estão menos expressas nas neoplasias. Para o F2 a associação negativa entre H3K9Ac e HDAC6

diferenciou os tecidos mamários normais dos carcinomas mamários metastáticos ou não, esses achamos apenas confirmaram o que havíamos encontrado nos resultados anteriores.

Além disso, a fim de confirmar essa diferença a curva ROC, bem como, sensibilidade e especificidade foram obtidas para F1 e F2 através do índice gerado pela associação das variáveis. Diante dos resultados demonstramos que associação dessas enzimas proporcionou uma alta sensibilidade e especificidade para diferenciar tecidos normais de neoplásicos nas duas situações.

De forma geral, observamos expressão semelhante entre as isoenzimas de classe I (HDAC1 e HDAC2) as quais demonstraram baixa expressão em tecidos neoplásicos. em contrapartida, a isoenzima de classe II (HDAC6) apresentou maior expressão em tecidos neoplásicos. Como essas enzimas são classificadas de acordo com sua homologia espera-se que enzimas da mesma classe apresentem comportamentos semelhantes (Chen et al., 2015). Zhao et al., (2016) também evidenciaram uma associação positiva entre HDAC1 e HDAC2 em tumores mamários de mulheres. Entretanto, resultados divergentes em relação ao aumento ou diminuição dessas enzimas nos diferentes tumores também foram observados, por meio de meta-análise em diferentes tipos de tumores humanos (Weichert et al., 2009). Contudo, sabe-se que há diferença na expressão dessas enzimas nos diferentes tecidos mamários caninos.

A expressão aberrante da H3K9Ac, bem como das enzimas HDAC1, 2, 6, além da associação de expressões que diferenciam tecidos normais de neoplásicos, ganha importância para estudos futuros em relação a terapias alvo moleculares, uma vez que pelo olhar da medicina veterinária comparada é sabido que 50% dos cânceres humanos apresentam alterações em enzimas envolvidas no arranjo da cromatina (Jones et al., 2016). Com isso, a exemplo da medicina também podemos observar evidências de que as alterações pós-traducionais acontecem nos animais (Eto et al., 2019; Sierra, 2019) e especialmente demonstrado com esse trabalho no câncer da glândula mamária em cadelas.

Em complemento, estudos utilizando inibidores de HDACs já foram realizados em linhagens de tumores mamários humanos, bem como, em outras neoplasias como linfoma cutâneo e carcinomas renais e apresentam resultados animadores *in vitro* e em relação a melhor resposta terapêutica em camundongos. Há evidências claras de silenciamento de genes supressores tumorais em decorrência de alterações epigenéticas principalmente pela hipoacetilação das histonas e hipermetilação do DNA que modulam resposta de nichos pré-metastáticos

(Lansigan et al, 2010; Fang et al., 2015; Lu et al., 2020). Na medicina veterinária estudos clínicos de fase I avaliando a toxicidade de iHDACs começaram a ser realizados e apresentaram resultados promissores em relação a toxicidade observada, sugerindo um potencial uso em cães (Zhang et al., 2016).

Os nossos resultados demonstraram que a baixa expressão de H3K9Ac associada à alta expressão de HDAC6 pode ser o caminho para a terapia alvo molecular em tumores mamários caninos e merecem novos estudos que comprovem essas alterações. Os inibidores de HDAC6 já estão sendo utilizados em câncer de ovário humano com bons resultados em relação à modulação do microambiente tumoral e melhora na reposta imunológica contra o tumor (Moufarrij et al., 2020).

Linhagens celulares de diversos tipos de câncer de cães já foram objeto de estudo com os iHDACs e os resultados revelaram resposta antitumoral desses fármacos (Kisseberth et al., 2008; Elshafae et al., 2017; Murahari et al., 2017), como isso, estudar a dinâmica dessas expressões aberrantes nos diversos tecidos neoplásicos complementa os resultados *in vitro* e ajuda a selecionar os pacientes que realmente poderão se beneficiar dessas terapias.

Em conclusão podemos ressaltar que existem diferenças entre a expressão das histonas e enzimas desacetilases em tecidos mamários normais e neoplásicos de mamas de cadelas, com uma maior evidência em neoplasias malignas. Os resultados encontrados dão suporte a novas pesquisas para o emprego de terapias alvo moleculares para HDACs de classe II em tumores mamários em cadelas. Ademais, o estudo representou um passo importante para compreensão das alterações epigenéticas envolvendo acetilação de histonas e enzimas desacetilases em neoplasia mamária de cadelas.

6. Declaração de disponibilidade de dados

Os dados que sustentam as conclusões deste estudo estão disponíveis com o autor, mediante solicitação pertinente.

7. Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

8. Referências

- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. 2005;120(2):169-181.
- Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel, JR. Canine mammary gland neoplasms. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1983;19:61-90.
- Bryan JN, Jabbes M, Berent, LM, et al. Hypermethylation of the DLC1 CpG island does not alter gene expression in canine lymphoma. *BMC genetics*. 2009;10(1):73.
- Cassali GD, Lavallo GE et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2014;7(2):38-69.
- Cavalcanti MF, CASSALI G, CARDOSO S, FERREIRA E, GOBBI H. Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: estadiamento TNM e sistema de Nottingham [MS thesis]. *Prática Hospitalar*. 2006;8(44):97-97.
- Chen, Y, Du J, Zhao YT, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibition improves myocardial function and prevents cardiac remodeling in diabetic mice. *Cardiovascular diabetology*. 2015;14(1):99.
- De Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer de mama feminino. *Rev. Bras. Cancerol.* 2002;48:113-31.
- Derr RS, van Hoesel AQ, Benard A, et al. High nuclear expression levels of histone-modifying enzymes LSD1, HDAC2 and SIRT1 in tumor cells correlate with decreased survival and increased relapse in breast cancer patients. *BMC câncer*. 2014;14(1):604.
- Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(7):1414.
- Eisenberg ALA, Koifman S. Breast cancer: Tumor markers. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2001;47:377–388.
- Elshafae, S. M., Kohart, N. A., Altstadt, L. A., Dirksen, W. P., & Rosol, T. J. (2017). The effect of a histone deacetylase inhibitor (AR-42) on canine prostate cancer growth and metastasis. *The Prostate*, 77(7), 776-793.
- Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer research*. 2009;69(9):3802-3809.
- Eto S, Saeki K, Yoshitake R, et al. Anti-tumor effects of the histone deacetylase inhibitor vorinostat on canine urothelial carcinoma cells. *PloS one*. 2019;14(6).

- Fang C, Jian ZY, Shen XF, et al. Promoter methylation of the retinoic acid receptor beta2 (RAR β 2) is associated with increased risk of breast cancer: A prisma compliant meta-analysis. *PloS one*. 2015;10(10).
- Ferraresso S, Bresolin S et al. Epigenetic silencing of TFPI-2 in canine diffuse large B-cell lymphoma. *PloS One*. 2014;9(4).
- Fraga M, Ballestar E, Villar-Garea BM, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*. 2005;37:391-400.
- Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*. 2007;26(37):5420-5432.
- Hou H, Zhao L, Chen W, et al. Expression and significance of cortactin and HDAC 6 in human prostatic foamy gland carcinoma. *International journal of experimental pathology*. 2015;96(4):248-254.
- Jones PA, Issa JPJ, Baylin. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(10):630.
- Kisseberth, W. C., Murahari, S., London, C. A., Kulp, S. K., & Chen, C. S. (2008). Evaluation of the effects of histone deacetylase inhibitors on cells from canine cancer cell lines. *American journal of veterinary research*, 69(7), 938-945.
- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
- Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *European Journal of Pharmacology*. 2009;625(1-3):131-142.
- Krusche CA, Wülfing P et al. Histone deacetylase-1 and-3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2005;90(1):15-23.
- Lansigan, F, Foss F. Current and Emerging Treatment Strategies for Cutaneous T-cell Lymphoma. *Drugs*. 2010;70(3):273-286.
- Liu D, Xiong H, Ellis AE, et al.. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer research*. 2014;74(18):5045-5056.
- Lu Z, Zou J, Li S, et al. Epigenetic therapy inhibits metastases by disrupting premetastatic niches. *Nature*. 2020;579(7798):284-290.
- Marinho VFZ, Metze K, Sanches FSF, Rocha G FS, Gobbi H. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2008;54(3):203-207.
- Marquard L, Gjerdrum LM, Christensen IJ, Jensen PB, Sehested M, Ralfkiaer E. Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. *Histopathology*. 2008;53(3):267-277.

- Marquard L, Poulsen CB, Gjerdrum LM, et al. Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B-and T-cell lymphomas. *Histopathology*. 2009;54(6):688-698..
- Moufarrij S, Srivastava A, Gomez S, et al. Combining DNMT and HDAC6 inhibitors increases anti-tumor immune signaling and decreases tumor burden in ovarian cancer. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-12.
- Müller BM, Jana L, Kasajima A, et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer-overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC câncer*. 2013;13(1):215.
- Murahari S, Jalkanen AL, Kulp SK, et al.. Sensitivity of osteosarcoma cells to HDAC inhibitor AR-42 mediated apoptosis. *BMC cancer*. 2017;17(1):67.
- Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncology reports*. 2007;18(4):769-774.
- Peña L, Gama A et al. (2014) Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 2014;51(1):127-145.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, et al. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. 2005;122(4):517-527.
- Rasotto R, Berlatto D, Goldschmidt MH, Zappulli, V. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of 229 cases. *Veterinary pathology*. 2017;54(4):571-578.
- Rodaski S, Piekarczyk CH. Epidemiologia e Etiologia do Câncer. In: Daleck, CR, De Nardi AB, Rodaski S (Eds.) *Oncologia em Cães e Gatos*. São Paulo: Roca. Inc; 2008:1-22.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(4):a018713.
- Shafiee R, Javanbakht J et al. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell International*. 2013;13:79.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36.
- Sierra, OMR. Evaluation of acetylated histones 3 and 4 and histone deacetylases 1, 2 and 6 in cutaneous t-cell lymphoma in dogs. 2019. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária na área de Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/191235>>. Acesso em: 27-01-2020.

Sorenmo KV, Workey RD, Zappulli V. Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, Vail DM, Thamm D, Liptak J, Page, R. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book. Elsevier Health Sciences, Inc;2020:604-615.

Suzuki J, Chen YY, Scott GK, et al. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(9):3163-3171.

Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*.1996;272(5260):408-411.

Uehara N, Yoshizawa K, Tsubura A. Vorinostat enhances protein stability of p27 and p21 through negative regulation of Skp2 and Cks1 in human breast cancer cells. *Oncology reports*. 2012;28(1): 105-110.

Webber LP, Wagner VP, Curra M, et al. Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology*. 2017;71(2):278-286.

Weichert W, Röske A, Niesporek S. Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(6):1669-1677.

Weichert W. Expressão de HDAC e prognóstico clínico em neoplasias malignas humanas. *Cartas de câncer*. 2009;280 (2):168-176.

Withers SS, Skorupski KA, York D, et al. Association of macrophage and lymphocyte infiltration with outcome in canine osteosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*. 2019;17(1):49-60.

Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 2007;26(37):5541-5552.

Zhang X, Zhang X, Yuan B, et al. Subchronic toxicities of HZ1006, a hydroxamate-based histone deacetylase inhibitor, in beagle dogs and sprague-dawley rats. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(12):1190.

Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et a. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(20):6962-6968.

Zhao H, Yu Z, Zhao L, et al. HDAC2 overexpression is a poor prognostic factor of breast cancer patients with increased multidrug resistance-associated protein expression who received anthracyclines therapy. *Japanese journal of clinical oncology*. 2016;46(10):893-902.

Capítulo 3- Expressão das histonas acetiladas H3 e H4 e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários simples de cadelas

I.L.S. Senhorello¹, O.M.R. Sierra¹, I.C. Canavari¹, G.V. Hernandez², L.A. Anai³, R.A.N Ampuero⁴, J. Passini⁴, C.M.P. Zinni⁵, F.V. Meirelles⁵, R.O Vasconcelos¹ e M. Tinucci-Costa¹

¹ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP, Brazil.

² Departamento de Saude Animal, Universidad Nacional de Colombia - Bogotá, UNAL/Bogotá.

³ Universidade Brasil, Campus de Fernandópolis- SP, Brasil.

⁴ Médico Veterinário Autônomo

⁵ Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA, Universidade de São Paulo, Brasil.

Título curto: Alterações epigenéticas em tecidos mamários caninos

Endereço de e-mail do ILS Senhorello: salardani@hotmail.com

Fontes de suporte:

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2016 / 00128-5. Os autores também agradecem à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, em Jaboticabal, SP, o Laboratório de Patologia Veterinária da UNESP, Jaboticabal, SP e o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP.

1. Resumo e palavras-chaves

A desacetilação de histonas é um importante mecanismo envolvido na tumorigênese do câncer de mama em humanos e estudos recentes na oncologia veterinária também demonstram essa mesma relação em algumas neoplasias caninas. A utilização de inibidores de HDACs *in vitro* e *in vivo* demonstrou ação antitumoral para diversas linhagens de cânceres humanos e animais. A proposta do presente estudo foi a de correlacionar as expressões de H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários simples de cadelas com parâmetros clínico-patológicos e tempo de sobrevida global. Para isso, foram analisadas 61 amostras de carcinomas mamários simples pela técnica de imuno-histoquímica e posteriormente realizada a validação dos anticorpos por Western Blot. As expressões foram obtidas de forma semiquantitativa atribuindo-se escores e de acordo com a pontuação obtida, subdivididas em alta ou baixa expressão, exceto para HDAC6 na qual a porcentagem de marcação foi considerada e subdividida em alta e baixa expressão pela mediana dos valores. Para análise estatística utilizou-se o teste de qui-quadrado ou o exato de Fischer como análise univariada e a análise de correspondência como teste multivariado, além da análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. As proteínas que exibiram maiores frequências de alta expressão nas amostras foram H4K12Ac (88,5%), HDAC2 (65,6%) e HDAC6 (56,7%) e as com maiores frequências de baixa expressão foram H3K9Ac (73,8%) e HDAC1 (54,1%). À

análise univariada foi observada associação entre a baixa expressão de HDAC1 e presença de metástase em linfonodos ($p=0,035$), e a alta expressão de HDAC1 associou-se a fatores prognósticos favoráveis, como ausência de metástase em linfonodos e baixo índice mitótico pela análise multivariada. Ainda pela análise multivariada a baixa expressão de HDAC6 apresentou relação com baixa expressão de Ki67 e com tumores de menor tamanho, apresentando relação com fatores de melhor prognóstico. A expressão das proteínas não se relacionou ao tempo de sobrevida global das pacientes ($p>0,05$). As altas expressões de HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários de cadelas podem ser informações úteis para pesquisas envolvendo alvos terapêuticos com iHDACs, uma vez que a inibição dessas enzimas favorece hiperacetilação e a transcrição de genes supressores tumorais.

Palavras-chave: epigenética, prognóstico, cães, neoplasmas mamários

2. Introdução

As alterações epigenéticas tem se tornado um importante foco de pesquisas oncológicas, desde quando os perfis de acetilações de histonas e metilações do DNA começaram a ser relacionadas à tumorigênese (Oronsky et al., 2014; Lu et al., 2020; Moufarrij et al., 2020).

As enzimas histonas desacetilases (HDACs) são responsáveis pela retirada dos grupos acetil nas histonas o que leva a uma hipoacetilação dessas proteínas e uma maior interação entre elas e o DNA, mantendo-o compactado. Dessa forma, a acessibilidade as regiões codificantes é prejudicada levando a supressão de genes transcricionalmente ativos (Jenuwein e Allis, 2001; Muller e Prado, 2008). Portanto, a desacetilação de histonas causada pela superexpressão de HDACs leva a proliferação celular, migração celular e inativação de genes supressores tumorais e, desta forma, favorecendo a tumorigênese (Nakagawa et al., 2007; Xu et al., 2007; Uehara et al., 2012; Eckschlager et al., 2017).

Dentre as histonas passíveis de modificações em suas regiões amino-terminais, as H3 e H4 são as mais importantes (Elsheikh et al., 2009; Alberts et al., 2010). Quanto as HDACs, existem pelo menos 18 enzimas conhecidas (Cheung e Allis, 2000; Seto e Yoshida, 2014), e as HDACs 1, 2 e 6 estão entre as mais estudadas em câncer de mama em humanos (Zhang et al., 2004; Krusche et al., 2005; Müller et al., 2013; Derr et al., 2014; Zhao et al. 2016).

Recentes estudos demonstram que a utilização de inibidores de HDACs (iHDACs) *in vitro* e *in vivo* induzem a apoptose, diminuem a migração celular e prejudicam a diferenciação celular em várias linhagens de cânceres humanos e animais, exercendo atividade antitumoral importante (Murahari et al., 2017; Eto et al., 2019; Lu et al., 2020; Moufarrij et al., 2020).

Modificações nas histonas e expressões aberrantes de HDACs foram relacionadas com fatores prognósticos em tumores humanos e animais (Elsheikh et al., 2009; Müller et al., 2013; Bryan et al., 2009; Eto et al., 2019; Sierra, 2019).

A neoplasia mamária em cadelas é a principal neoplasia entre as fêmeas caninas não castradas, sendo os carcinomas mamários o tipo histológico mais comum, semelhante ao que ocorre nas mulheres (Shafiee et al., 2013; Cassali et al., 2014; Sorenmo et al., 2020). Ademais, desde a publicação do genoma canino sabe-se que o cão é um modelo experimental para várias doenças que acometem os humanos, assim como, o comportamento biológico do câncer em humanos se assemelha ao que ocorre em cães. Neste quesito, os tumores de mama são particularmente semelhantes entre as duas espécies (Lindblad-Toh et al., 2005; Ranieri et al., 2013; Shafiee et al., 2013).

Vários fatores prognósticos consagrados auxiliam na determinação da abordagem clínica das pacientes caninas com tumores de mama. Entretanto, alguns animais que embora apresentem as mesmas características clínico-patológicas da neoplasia não evoluem da mesma forma o que sugere a existência de diferentes mecanismos envolvidos na tumorigênese (Calvanti et al., 2006; Santos et al., 2013; Cassali et al., 2014; Rasotto et al., 2017).

Na medicina humana, o conhecimento de alterações epigenéticas em neoplasias está permitindo a utilização de inibidores das histonas desacetilases (iHDACs). Estes iHDACs já foram aprovados para uso em linfomas cutâneos e estão com ensaios clínicos avançados para o emprego em tumores de mama (Weichert et al., 2009; Guerriero et al., 2017). Ademais, conhecer a relação entre alterações epigenéticas com o prognóstico favorece o melhor entendimento do comportamento biológico do tumor, permitindo, desta forma, a seleção de pacientes que se beneficiariam com tratamentos individualizados (Muller et al., 2013; Qiao et al., 2018; Eto et al., 2019; Sierra, 2019).

Considerando a semelhança em muitos aspectos entre os tumores mamários nas mulheres e nas cadelas, este estudo teve como objetivo analisar a expressão de H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em carcinomas mamários simples de cadelas e correlacionar as variáveis clínico-patológicas e o significado prognóstico com a expressão dessas proteínas.

3. Material e métodos

3.1 Seleção dos pacientes e coleta das amostras

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal (protocolo nº 016384/17), e os tutores que aderiram ao projeto assinaram orientação e um termo de consentimento livre esclarecido.

Foram selecionadas 61 cadelas, sem predileção de raça e idade acometidas por neoplasias mamárias atendidas no Serviço Obstetrícia Veterinária e no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da FCAV/UNESP Campus de Jaboticabal. Todas foram submetidas ao estadiamento tumoral mediante exame físico detalhado, exames laboratoriais e de imagem.

Com o intuito de normatizar, foram empregadas apenas as cadelas que receberam o diagnóstico de carcinoma simples, que incluem os subtipos papilar, tubular e sólido. Cada cadela foi doadora de apenas um nódulo; aquelas que apresentavam mais de um nódulo, o nódulo selecionado foi o que estava associado ao pior prognóstico de acordo com o grau e estadiamento clínico (Rasotto et al., 2017). Paciente que apresentaram carcinomas em tumor misto, carcinomas de subtipos especiais e sarcomas mamários (Cassali et al., 2014) foram excluídas do estudo, assim como aquelas que apresentaram metástase a distância no momento do diagnóstico. Todavia, aquelas que desenvolveram metástase durante o acompanhamento e após a mastectomia permaneceram dentro do estudo.

Todos os pacientes foram submetidos à anestesia geral, de acordo com o protocolo empregado no hospital veterinário para a coleta do material. Os tumores mamários foram coletados durante a mastectomia total, uni ou bilateral, de acordo com a indicação para cada caso (Cassali et al., 2014), durante a qual foi retirado o linfonodo regional (inguinal e/ou axilar) para avaliação histopatológica.

Todas as amostras coletadas foram fixadas em formalina tamponada a 10% por um período de 24 a 48 horas e, em seguida, armazenadas em álcool 70% até o momento do processamento. Posteriormente, as amostras foram processadas e incluídas em parafina, cortadas na espessura de 4µ para análise histopatológica (Cassali et al., 2014) e para realização da técnica de imuno-histoquímica.

3.2 Avaliação de parâmetros clínico-patológicos

Dos animais foram avaliadas individualmente as informações clínico-patológicas, tais como raça, idade, tipo histológico, tamanho do tumor, grau histológico, metástase em linfonodos regionais, índice mitótico e a sobrevida global (SG). Com relação ao grau, os grupos foram divididos em graus I, II e III, seguindo a classificação histopatológica adotada por Elston e Elis (1998).

Para obtenção do tamanho do tumor mensurou-se a medida de seu maior diâmetro, em centímetros (cm), com auxílio de um paquímetro digital (Yamagami et. al., 1996). O índice mitótico foi classificado em baixo (até 9 figuras em 10 campos de grande aumento (cga), microscópio Novel (BM2100) e objetiva 40X) e moderado a alto (>9 figuras em 10 cga) conforme realizado por Santos et al. (2013).

3.3 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot

Para o WB, foram selecionadas 6 amostras de carcinomas mamários simples de cadelas e homogeneizadas a 4° C em tampão RIPA (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, 1% NP-40, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS a 0,1%), pH 7,4 e coquetel inibidor de protease (# P8310 - Sigma). O homogenato foi centrifugado a 14 000g a 4° C durante 20 min. A concentração de proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. O sobrenadante foi misturado com tampão de amostra (20% de glicerol, 125 mM de Tris-HCl, 4% de SDS, 100 mM de ditiotreitol, 0,2% de azul de bromofenol, pH 6,8) e a mistura foi fervida e submetida à análise eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e as proteínas transferidas do gel para as membranas de nitrocelulose.

As membranas foram bloqueadas com albumina a 5% por 4h e incubadas durante a noite a 4° C com os anticorpos primários acetil Histona H4 [Ac-Lys12] (1: 1000, anti-coelho, Sigma-Aldrich), HDAC1 (1: 1000 , anti-coelho, Sigma-Aldrich), HDAC2 (1: 2000, anti-camundongo, SigmaAldrich), acetil Histona H3 [Ac-Lys9] (1: 1000, anti-camundongo, Sigma Aldrich) e HDAC6 (1: 3000, anti-coelho, Sigma-Aldrich). GAPDH (1: 1000, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA) e β -actina (1: 5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) foram utilizados como controle de carregamento. Para detecção empregou-se o anticorpo secundário conjugado com peroxidase e visualizado usando o reagente ECL. A documentação

do gel e a quantificação do sinal foram obtidas usando o Bio-Image Analysis do sistema Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA). Os resultados foram normalizados usando GAPDH e B-actina para H3Ac, HDAC6 e H4Ac, HDAC1, HDAC2, respectivamente. As bandas de marcação foram evidenciadas e as amostras quantificadas a título de validação dos anticorpos em tecido canino.

3.4 Reação imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram empregadas para detecção das histonas acetiladas H3 lisina 9 (H3K9Ac) e H4 lisina 12 (H4K12Ac) e das enzimas histonas desacetilases HDAC1, HDAC2, HDAC6 e do marcador de proliferação celular Ki67 nas amostras de tecido neoplásico. Nas reações com o Ki67 (clone MIB-1, Dako; 1:100) foi utilizado o protocolo descrito anteriormente por Sierra et al. (2018).

Para os demais anticorpos empregou-se o método de detecção utilizando um sistema comercial de polímeros (polímero Novolink DS, Leica Byosystems), conforme descrito na Tabela 1. Como controle das reações foi empregada amostra de mama humana gentilmente cedida pelo laboratório VETPAT (Campinas, SP), e como controle negativo substituíram-se os anticorpos primários por diluentes dos anticorpos. As amostras foram contracoradas com hematoxilina de Harris.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica para expressão de histonas acetiladas e enzimas desacetilases.

Anticorpo*	Clone	Origem	Tipo	Diluição	Recuperação Antigênica
Anti-Acetil Histona H3 (Ac-Lys9)	AH3-120	Camundongo	Monoclonal	1:100	Tampão Citrato (pH 6,0)
Anti-Acetil Histona H4 (Ac-Lys12)	SAB42000353	Coelho	Fração de IgG	1:200	Tampão Citrato (pH 6,0)
Anti-HDAC1	AV38530	Coelho	Fração de IgG	1:75	Tampão EDTA± (pH 9,0)
Anti-HDAC2	HDAC2-62	Camundongo	Monoclonal	1:500	Tampão Citrato (pH 6,0)
Anti-HDAC6	AV31451	Coelho	Isolado	1:500	Tampão Citrato (pH 6,0)

* Sigma-Aldrich; ± Ácido etilenodiamino tetra-acético; Todos os anticorpos foram incubados por duas horas em temperatura de 22 C°.

3.5 Interpretação dos resultados da imuno-histoquímica

A confirmação da expressão nuclear em seções imunocoradas para H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1 e HDAC2 foi por visibilização de tonalidades do marrom difusas nos núcleos das células das amostras de carcinoma mamário simples, concordantes às expressões observadas nos controles positivos.

A interpretação dos resultados das reações imuno-histoquímicas foi baseada na adoção de escores de marcação. Para essa finalidade, adotou-se o seguinte protocolo: cinco campos aleatórios (de cada amostra) foram fotografados em magnificação de 400X, em microscópio Novel (BM2100) acoplado a câmera Bioptika (CMOS-HD). A seguir procedeu-se a contagem manual de 100 células por campo utilizando a ferramenta "Contador de células" do programa Image J software (v. 1.44p.), com posterior extração da média aritmética desses valores. O campo de células foi ranqueado por porcentagem de células positivas (negativo= 0; 1-25%=1; 26-50% =2; 51-75% =3; 76-100% =4) e pela intensidade de marcação. Esta última foi avaliada de forma cega por dois observadores (negativo=0; fraca=1; moderada= 2 e intensa =3). Por fim, os dois ranques (porcentagem e intensidade de marcação) foram multiplicados e o escore de marcação obtido foi classificado em baixa expressão (escore 0-6) e alta expressão (escore 8-12) e submetidos, a seguir, a análise estatística (Zhao et al, 2016).

Particularmente, para as reações com o anticorpo HDAC6, um método diferente foi utilizado devido à sua expressão citoplasmática, o que impossibilitou a contagem individual das células. A expressão positiva foi caracterizada pela observação de tonalidades de marrom no citoplasma das células, considerando-se a área marcada. A porcentagem total de área positiva para HDAC6 foi calculada obtendo-se imagens com amplificação de 400 vezes de cinco campos aleatórios usando o microscópio Novel (BM2100) acoplado a câmera Bioptika (CMOS-HD) e o programa Image J software (v. 1.44p.), conforme descrito anteriormente (Withers et al., 2019). Primeiramente, a área celular total foi determinada e medida para cada imagem e as áreas não celulares foram excluídas por seleção manual. Na sequência, uma área positiva foi selecionada manualmente e limiarizada com a finalidade de se destacar apenas as células positivas. A área selecionada foi então medida e o resultado foi dividido pela área celular total dessa imagem e multiplicada por 100. Assim, uma porcentagem foi calculada para cada imagem. Uma porcentagem final foi estimada a partir da média das cinco imagens para cada amostra. Para esse anticorpo foi estabelecido um ponto de corte, dado pelo cálculo

da mediana dos valores de positividade de marcação para se classificar a expressão da enzima no tecido como baixa ou alta.

Para a avaliação das reações com o anticorpo Ki67, cinco campos em 400x de magnificação e contendo áreas com maiores proporções de células positivas foram fotografados, empregando-se os mesmos sistemas de obtenção de imagens descritos. Contabilizadas manualmente 200 células, totalizando 1000 células (De Matos, et al., 2006; Kadthur et al., 2011). Obteve-se desse valor a porcentagem de células positivas e para categorizá-las em alta e baixa expressão utilizou-se a mediana dos valores de todas as amostras.

3.6 Análise estatística

Para a análise de proporções e multivariada de correspondência foram elaboradas as tabelas de contingências com as variáveis categóricas (grau histológico, tipo histológico, tamanho tumoral, presença de metástase em linfonodos, índice mitótico e expressão de Ki67) e as variáveis contínuas (H4K12Ac, H3K9Ac e HDAC 1, 2 e 6) categorizadas em alta e baixa expressão. As proporções foram comparadas usando o teste de qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher.

Para determinar as curvas de sobrevida foram utilizadas a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida global, comparadas pelo teste de Long-rank. A sobrevida global (SG) foi definida como o tempo decorrido desde o dia do diagnóstico até a data de morte. Nos casos em que o animal permanecia vivo ao final dos 3 anos, estes eram classificados como censurados, as informações foram atualizadas ao final do período experimental por meio de ligações telefônicas aos tutores e registradas nos prontuários.

Foram utilizados os programas estatísticos R, SPSS e Statistica adotando um nível de significância de 5%

4. Resultados

O carcinoma papilar (Cassali et al., 2014) foi o tipo histológico, mais frequentemente diagnosticado (27/61; 44,26%), seguido do carcinoma tubular (24/61; 39,34%) e do carcinoma sólido (10/61; 16,40%). Com relação à frequência das raças, os animais sem raça definida (SRD) foram à maioria (20/61; 33%) com idades que variaram de 5 a 15 anos (média

de $10 \pm 2,42$) (Tabela 02). As variáveis clínico-patológicas das cadelas portadoras de carcinomas mamários simples estão apresentadas na tabela 02.

Tabela 02. Variáveis clínico-patológicas observadas nos animais com carcinoma mamário simples.

Variável Clínica		No. de cães	Porcentagem	Média (intervalo)
Raça	SRD	20	33%	
	Poodle	6	10%	
	York Shire Terrier	6	10%	
	Pinscher	5	8%	
	Pitbull	4	6%	
	Outros	20	33%	
Idade (anos)		10 (5-15)		
Tamanho (maior eixo)	<3 cm	42	69%	
	≥ 3 cm	19	31%	
Grau histológico	I	28	46%	
	II	21	34%	
	III	12	20%	
Índice mitótico/10 cga	0-9	40	66%	
	>9	21	34%	
Ki67*	<18%	32	52%	
	>18%	29	48%	

SRD: Sem raça definida; <3 cm: menor do que três centímetros; ≥ 3 cm: maior ou igual a três centímetros; cga: campo de grande aumento; *Ki67: ponto de corte dado pela mediana dos valores.

As variáveis clínico-patológicas sobre necrose e ulceração não foram incluídas na tabela diante da baixa frequência apresentada nesse estudo.

4.1 Validação dos anticorpos pela técnica de Western Blot

A expressão proteica detectada pela técnica de Western Blot em linfonodo de cão comprovou a imunorreatividade dos anticorpos humanos com o tecido canino, validando, desta forma, as reações imuno-histoquímicas (Figura 01).

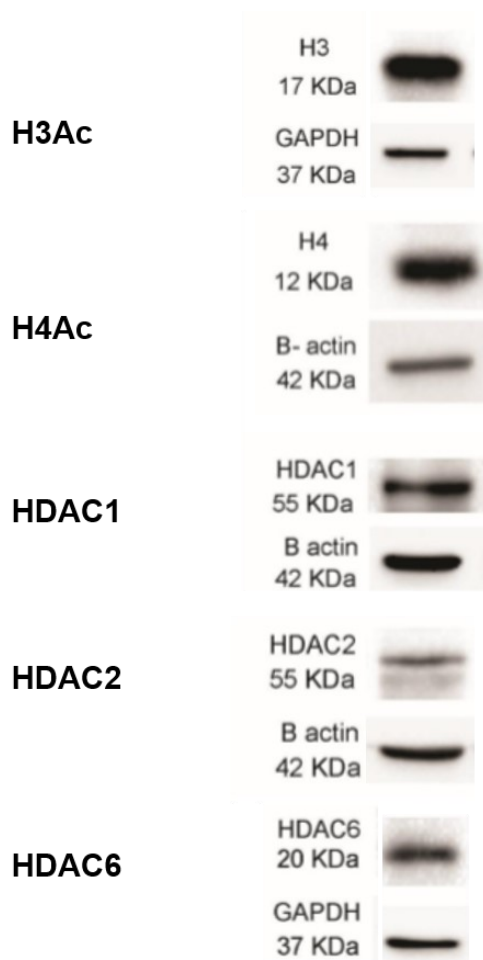


Figura 01- Validação da expressão proteica das histonas acetiladas (H3K9Ac e H4K12Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC1, HDAC2 e HDAC6) pela técnica de Western Blot em carcinomas mamários simples de cadelas.

4.2 Expressão imuno-histoquímica das histonas acetiladas e enzimas desacetilases e a correlação com as variáveis clínico-patológicas

A marcação dos anticorpos ocorreu em todos os grupos analisados. Quando comparados os padrões de marcação com o controle positivo, foram observadas semelhanças tendo em vista que a H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1 e HDAC2 tiveram marcação predominantemente nuclear, exceto para HDAC6 que foi predominantemente citoplasmática. Para o Ki67 a marcação também foi observada dentro do núcleo (Figura 02), como esperado.

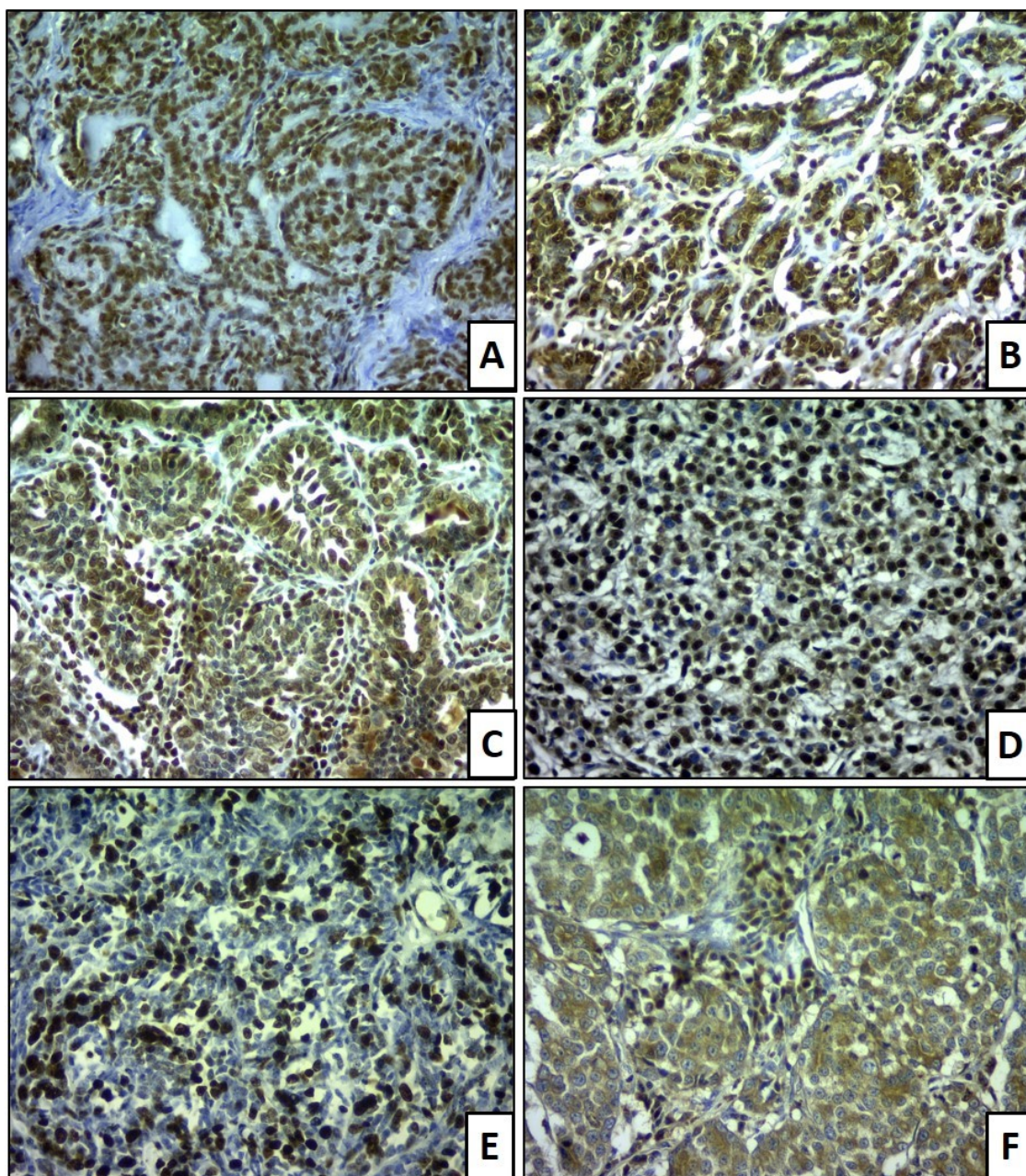


Figura 02. Coloração imuno-histoquímica das histonas acetiladas e enzimas desacetilases (HDACs) em carcinomas simples ($\times 400$). (A) H3K9Ac, (B) H4K12Ac, (C) HDAC1, (D) HDAC2 e (E) Ki67 foram expressos nos núcleos das células tumorais. A coloração para (F) HDAC6 foi observada predominantemente no citoplasma.

Todas as amostras de carcinoma mamários simples expressaram as proteínas e os escores médios obtidos nas reações imuno-histoquímicas para H3K9Ac, H4K9Ac, HDAC1, HDAC2 foram 4,96, 9,86, 5,98, 7,67, respectivamente. Para HDAC6, a mediana dos valores de área positiva foi de 18,7%. Esse mesmo valor foi o ponto de corte usado para categorizar as

amostras em baixa e alta expressão. As proteínas que apresentaram maior frequência de escores com alta expressão nas amostras analisadas foram H4K12Ac (54/88,5%), HDAC2 (40/65,6%) e HDAC6 (34/55,7%). Em contrapartida, as que apresentaram maiores frequências de baixa expressão foram H3K9Ac (45/73,8%) e HDAC1(33/54,1%), e esses resultados estão descritos na tabela 03.

Tabela 03- Expressão imuno-histoquímica de H3K9Ac, H4K12Ac, HDAC1, HDAC2 e HDAC6 em 61 amostras de carcinomas mamários simples de cadelas.

Proteína	Baixa expressão	Alta expressão
	Nº (%)	Nº (%)
H3K9Ac	45 (73,8)	16 (26,2)
H4K12Ac	7 (11,5)	54 (88,5)
HDAC1	33 (54,1)	28 (45,9)
HDAC2	21 (34,4)	40 (65,6)
HDAC6	27 (44,3)	34 (55,7)

Na análise do teste de qui-quadrado de Pearson foi observada baixa expressão de HDAC1 em amostras de carcinoma nas cadelas com metástase em linfonodos ($p=0,035$). As demais variáveis clínico-patológicas não apresentaram diferença significativa em relação a expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases conforme apresentado na tabela 04.

Quando avaliamos as variáveis clínico-patológicas e suas associações com a expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases pela análise de correspondência multivariada observamos associação entre a alta expressão de HDAC1, ausência de metástase e baixo índice mitótico. Também houve associação entre a baixa expressão de HDAC6, tumores com baixa expressão de Ki67 e de tamanho menor que 3,0 cm (Figura 5).

4. 3 Correlação entre histonas acetiladas e HDACs com o tempo de sobrevida

Entre os parâmetros clínico-patológicos avaliados, fatores prognósticos tradicionais como tamanho do tumor ($p=0,008$), índice mitótico ($p=0,0002$) e metástase em linfonodos ($p=0,0084$) apresentaram diferença significativa no tempo de sobrevida global (Figura 3). Não houve diferença para as variáveis grau histológico ($p=0,282$), tipo histológico ($p=0,917$) e expressão de Ki67 ($p=0,096$).

Em relação a expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases não houve diferença na SG para H3K9Ac ($p=0,8542$), H4K12Ac ($p=0,3480$), HDAC1 ($p=0,9091$), HDAC2 ($p=0,2234$), HDAC6 ($p=0,4419$) (Figura 04).

Tabela 4- Correlação entre os escores obtidos para as histonas acetiladas e enzimas desacetilases e as variáveis clínico-patológicas das amostras de carcinomas mamários simples de cadelas.

Parâmetros	Total	H3K9Ac			H4K12Ac			HDAC1			HDAC2			HDAC6		
	Nº	Alta	Baixa	p	Alta	Baixa	p	Alta	Baixa	p	Alta	Baixa	p	Alta	Baixa	p
Grau histológico				0,640			0,862			0,121			0,734			0,943
I	28	6 (21,4)	22 (78,6)		25 (89,3)	3 (10,7)		14 (50,0)	14 (50,0)		18(64,29)	10 (35,71)		16 (57,1)	12 (42,9)	
II	21	7 (33,3)	14 (66,7)		18 (85,7)	3 (14,3)		10 (47,6)	11 (52,4)		15 (71,43)	6 (28,57)		13 (72,2)	8 (27,8)	
II	12	3 (25,0)	9 (75,0)		11 (91,7)	1 (8,3)		4 (33,3)	8 (66,7)		7 (58,33)	5 (41,67)		7 (58,3)	5 (41,7)	
Tipo histológico				0,511			0,621			0,121			0,08			0,773
Papilar	27	6 (22,2)	21 (77,8)		24 (88,9)	3 (11,1)		12 (44,4)	15 (55,6)		17 (62,96)	10 (37,04)		17 (63,0)	10 (37,0)	
Tubular	24	8 (33,3)	16 (66,7)		22 (91,7)	2 (8,3)		14 (58,3)	10 (41,7)		19 (79,17)	5 (20,83)		14 (58,33)	10 (41,7)	
Sólido	10	2 (20,0)	8 (80,0)		8 (80,0)	2 (20,0)		2 (20,0)	8 (80,0)		4 (40,00)	6 (60,00)		5 (50,0)	5 (50)	
Tamanho				0,363			0,707			0,284			0,786			0,424
<3cm	42	9 (21,4)	33 (78,6)		36 (85,7)	6 (14,3)		21 (50,0)	21 (50,0)		26 (61,90)	16 (38,10)		23 (54,8)	19 (45,2)	
≥3cm	19	7 (33,3)	14 (66,7)		19 (90,5)	2 (9,5)		7 (33,3)	14 (66,7)		14 (66,67)	7 (33,33)		14 (66,7)	7 (33,3)	
Índice mitótico				0,768			0,404			0,426			0,778			1
0-9/10 cga	40	10 (25,0)	30 (75,0)		34 (85,0)	6 (15,0)		20 (50,0)	20 (50,0)		27 (67,50)	13 (32,50)		24 (60)	16 (40,0)	
>9/10 cga	21	6 (28,6)	15 (71,4)		20 (95,2)	1 (4,8)		8 (38,10)	13 (61,9)		13 (61,50)	8 (38,10)		12 (57,1)	9 (42,9)	
%Ki67				0,56			0,428			1			0,602			0,435
<18%	32	7 (21,9)	25 (78,1)		27 (84,4)	5 (15,6)		15 (46,8)	17 (53,1)		22	10		17 (53,1)	15 (46,9)	
≥18%	29	9 (31,0)	20 (69,0)		27 (93,1)	2 (6,9)		13 (44,8)	16 (55,2)		18	11		19 (65,5)	10 (34,5)	
Metástase				0,312			0,670			0,035			0,074			1
Ausente	46	14 (30,4)	32 (69,6)		40 (87,0)	6 (13,0)		25 (54,4)	21 (45,6)		31 (67,39)	15 (32,61)		27 (58,7)	19 (41,3)	
Presente	15	2 (13,3)	13 (86,7)		14 (93,3)	1 (6,7)		3 (20,0)	12(80,0)		6 (40,00)	9 (60,00)		9 (60,0)	6 (40,0)	

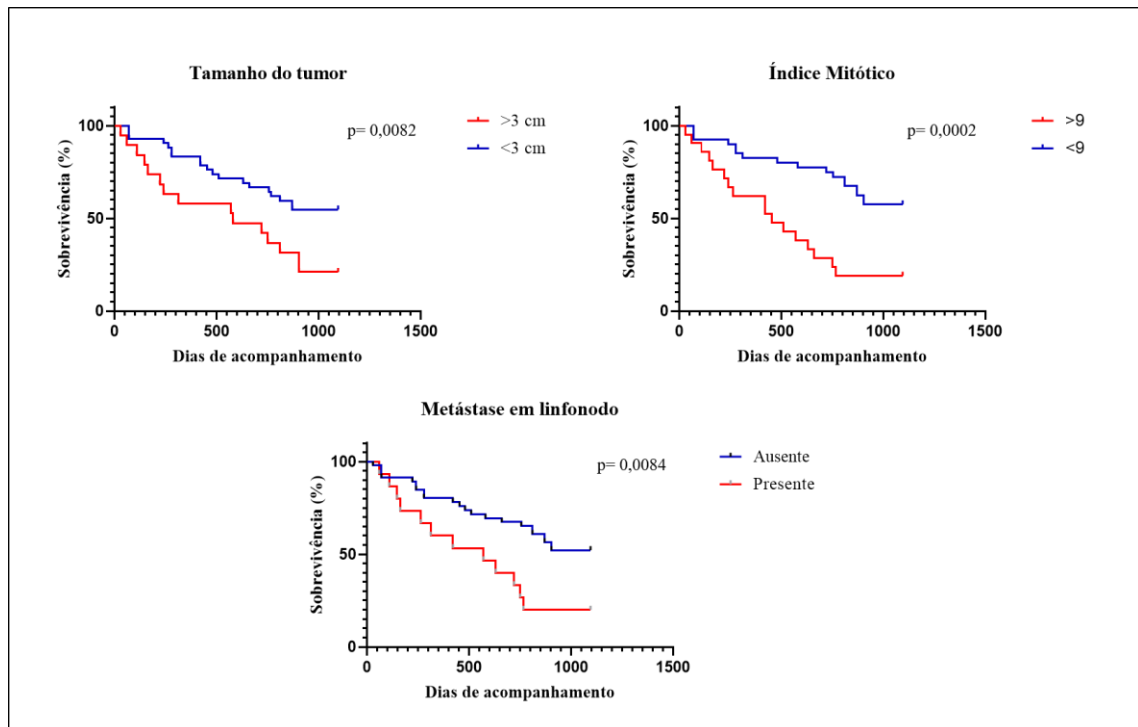


Figura 03- Análise estatística das variáveis clínico-patológicas e tempo de sobrevida global de cadelas portadoras de carcinomas mamários simples pelo método de Kaplan-Meier.

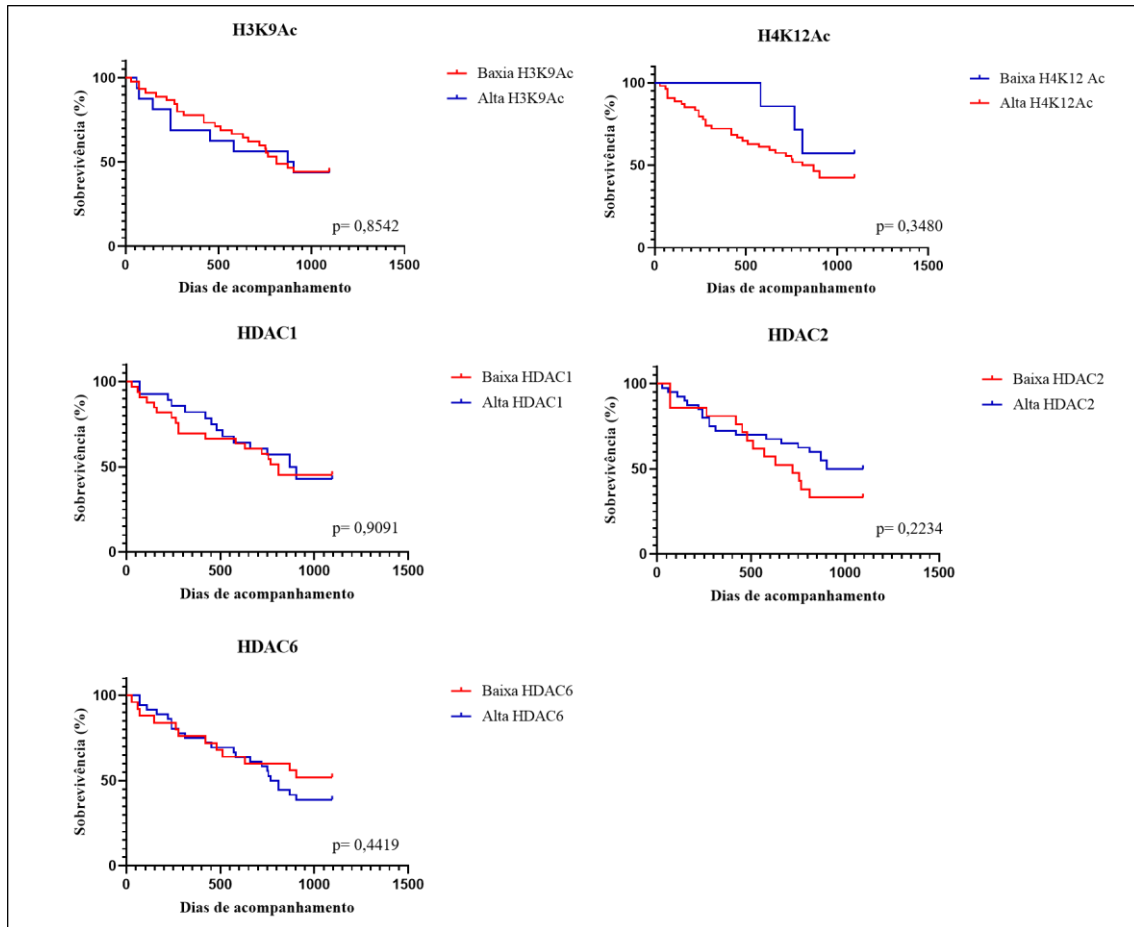


Figura 04- Resultado de expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases em relação ao tempo de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier.

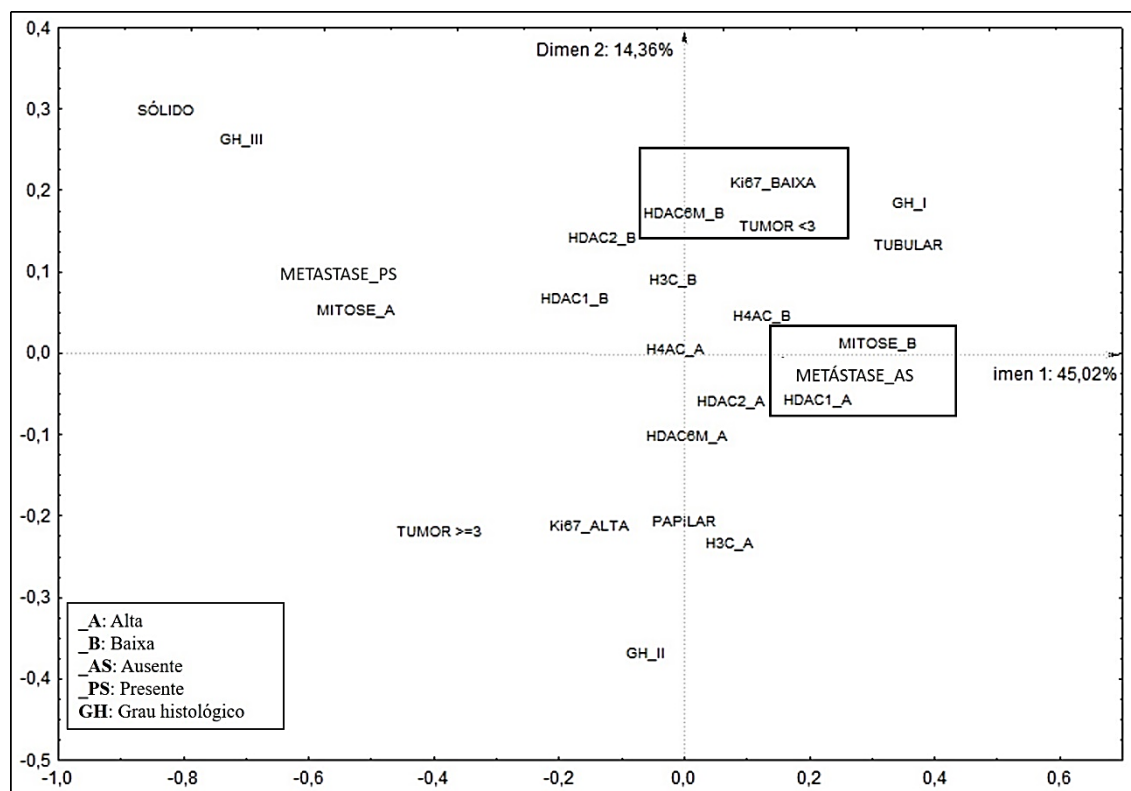


Figura 05- Análise de correspondência multivariada das associações entre a expressão das histonas acetiladas (H3K9Ac e H4K12Ac) e das enzimas desacetilases (HDAC 1, 2 e 6) e as variáveis clínico-patológicas em carcinomas mamários simples de cadelas.

5. Discussão

A avaliação de alterações epigenéticas pela expressão de histonas acetiladas e enzimas desacetilases em tumores mamários de mulheres tem sido investigada e os resultados mostraram que há correlação com prognóstico (Zhang et al., 2004; Elsheikh et al., 2009; Derr et al., 2014; Zhao et al., 2016). Entretanto, pouco se sabe sobre o comportamento de histonas acetiladas e enzimas desacetilases em tumores mamários e sua relação com o prognóstico, particularmente em carcinomas mamários simples de cadelas, sendo este o primeiro estudo a investigar.

Nosso grupo de pesquisa também está avaliando a expressão de histonas acetiladas e enzimas desacetilases em carcinomas mamários simples e em tecidos mamários não neoplásicos de cadelas (dados ainda não publicados), sugerindo haver expressões aberrantes de algumas

delas nos tecidos neoplásicos em comparação aos tecidos mamários sem alterações histopatológicas. Esses resultados confirmaram que, da mesma forma que em humanos, alterações epigenéticas também são identificadas em tumores mamários de cães. Em nosso estudo, 88,5% das amostras analisadas exibiram alta expressão para H4K12Ac, em comparação a um estudo realizado anteriormente em carcinomas mamários de mulheres. No referido estudo, foram avaliados 880 carcinomas mamários de mulheres e os pesquisadores observaram que 45,1% das amostras analisadas apresentaram alta expressão de H4K12Ac (Elsheikh et al., 2009). Outros pesquisadores também observaram hipoacetilação em H4K12Ac em carcinomas ductais invasivos (Suzuki et al., 2009). O fato de não encontrarmos hipoacetilação da H4K12Ac abre margem para estudos futuros com o intuito de avaliar outras marcas de acetilação de histonas que podem estar envolvidas na transcrição gênica, como as H4K16Ac, H4K8Ac e H4K5Ac (Bernstein, et al., 2005; Fraga et al., 2005; Pokholok et al., 2005). Da mesma forma, comparar com tecidos saudáveis e deste modo, melhor compreender a importância desse achado.

Ainda para H4K12Ac também não encontramos associações entre a sua expressão e as variáveis clínico-patológicas consideradas fatores prognósticos, nem tão pouco houve relação a sobrevida global das pacientes. Entretanto, em carcinomas ductais de mulheres a alta expressão de H4K12Ac está associada a tipos histológicos de melhor prognóstico e a baixa expressão tem relação com tumores de alto grau, mostrando assim, uma associação entre a acetilação e os fatores prognósticos (Elsheikh et al., 2009).

Em relação as enzimas desacetilases (HDAC2 e HDAC6) observamos maiores porcentagens de amostras com alta expressão pela análise imuno-histoquímica. Esses resultados vão ao encontro do observado por Seo et al. (2014) em 300 amostras de carcinomas mamários de mulheres. Da mesma forma, expressões moderadas e altas de HDAC2 também foram mais frequentemente observadas em carcinomas mamários de mulheres (Muller et al., 2013), como também a HDAC6 em carcinomas prostáticos humanos (Hou et al., 2015). Esses resultados apontam para uma semelhança entre a expressão dessas enzimas em carcinomas mamários simples de cadelas e carcinomas em humanos e essas informações podem servir para futuras pesquisas com alvos terapêuticos utilizando iHDACs.

Pela análise de correspondência multivariada encontramos associação entre a baixa expressão de HDAC6 e fatores prognósticos como baixa expressão de Ki67 e tumores menores do que

3,0 cm. A associação entre a baixa expressão de Ki67 com tumores de menor tamanho representam fatores de melhor prognóstico (Gizinski et al., 2003; Santos et al., 2013; Nowak et al., 2015), tendo ainda o tamanho do tumor como fator prognóstico independente (Sorensen, 2003; Cavalcanti et al., 2006). A associação da expressão de HDAC6 com os fatores mencionados sugere que sua expressão tem relação com prognóstico em cadelas com carcinomas mamários simples e pode ser um anticorpo útil no painel prognóstico de cadelas com essa neoplasia.

As relações com fatores prognósticos para HDAC2 e HDAC6 não foram observadas pela análise univariada, como também não observamos impacto na sobrevida global pela expressão dessas enzimas. Alguns estudos que avaliaram o tempo de sobrevida global em relação a expressão de HDAC2 em carcinomas mamários de mulheres também não observaram diferença significativa do tempo de sobrevida das pacientes (Muller et al., 2013; Derr et al., 2014), assim como em nosso estudo. Todavia, outros estudos em humanos conseguiram associar a expressão de HDAC2 com alguns fatores prognósticos como grau histológico, presença de metástase em linfonodos e estágio clínico do tumor (Muller et al., 2013; Zhao et al., 2016). Em geral, a alta expressão de HDAC2 estava associada a fatores prognósticos negativos e apresentou impacto na sobrevida global (Zhao et al., 2016).

Dentre as proteínas que apresentaram menores expressões nos tecidos neoplásicos figuraram a H3K9Ac e HDAC1 com mais da metade das amostras exibindo baixa expressão. Para H3K9Ac esses resultados se assemelham aos observados em humanos, tendo em vista que estudos evidenciaram hipoacetilação em tecidos neoplásicos (Elsheikh et al., 2009; Webber et al., 2017). Reafirmando esses achados, estudos em cães também demonstraram os mesmos resultados em carcinomas uroteliais (Eto et al., 2019) e mais recentemente em linfomas cutâneos caninos (Sierra, 2019).

Pesquisadores observaram que a hipoacetilação encontrada em muitas neoplasias malignas está intimamente ligada ao silenciamento de genes supressores tumorais, uma vez que, a hiperacetilação influencia positivamente na transcrição gênica (Taunton, et al., 1996; Kouzarides, 2007; Jones et al., 2016), e possivelmente o mesmo possa estar ocorrendo nas neoplasias caninas estudadas.

Quando analisamos a expressão de HDAC1, observamos que se apresentava baixa na maioria dos carcinomas. além disso, pela análise univariada a baixa expressão estava associada a presença de metástase em linfonodos. Entretanto, pela análise multivariada, quando apresentava elevada expressão, esta estava associada a fatores prognósticos favoráveis (Sorenmø, 2003; Cassali et al., 2014; Sorenmø et al., 2020), como ausência de metástase e baixo índice mitótico. Esses resultados ganham importância se pensarmos na determinação cada vez mais precisa do prognóstico em cadelas com tumor de mama e vai de encontro ao observado em mulheres. Uma meta-análise avaliando sete trabalhos que estudaram a expressão de HDAC1 em tumores de mama em mulheres constatou que a maior expressão dessa enzima estava associada a fatores prognósticos favoráveis e melhores tempos de sobrevida global (Qiao et al., 2018).

Em nosso estudo, conseguimos reafirmar o papel de algumas variáveis clínico-patológicas no prognóstico das pacientes. Variáveis como tamanho do tumor, presença de metástase e índice mitótico influenciaram significativamente na sobrevida global das cadelas. Esses resultados são concordantes aos observados em outros estudos que avaliaram fatores prognósticos em neoplasias mamárias de cadelas (Misdorp 1999; Ferreira et al., 2009; Santo et al., 2013; Rasotto et al., 2017), e reafirmam a importância desses critérios na tomada de decisão e abordagem clínica das pacientes.

De forma geral, não conseguimos determinar o impacto da expressão das histonas acetiladas e enzimas desacetilases com o tempo de sobrevida global das cadelas, como também não observamos associação com algumas das variáveis clínico-patológicas. Esses resultados podem ter relação com o número de amostras analisadas, se comparado com estudos em humanos. Com isso, acreditamos que novos estudos envolvendo um maior número de amostras possa acrescentar outras informações acerca da relação entre o prognóstico e das alterações epigenéticas em tumores mamários de cadelas.

Ademais, entender as alterações epigenéticas que estão envolvidas com as neoplasias mamárias de cadelas assume considerável importância, pois além dos fatores prognósticos que podem ser incorporados as avaliações dos carcinomas mamários simples, as altas expressões das enzimas HDAC2 e HDAC6 podem, futuramente, se tornar alvos terapêuticos nessa neoplasia.

A utilização de inibidores de HDACs já está sendo incorporada ao tratamento do câncer em humanos (Moufarrij et al., 2020) e vários estudos demonstram que a modulação da expressão dessas enzimas favorece o sistema imunológico e a transcrição de genes supressores tumorais (Lansigan et al, 2010; Fang et al., 2015; Lu et al., 2020). Desta forma, nossos resultados sustentam uma possível utilização também em cães. Além disso, estudos clínicos de fase I testando a toxicidade de iHDACs já foram realizados e mostraram bons resultados (Zhang et al., 2016).

Nossos resultados são pioneiros em relação a avaliação das histonas acetiladas e enzimas desacetilases em cadelas com carcinomas mamários simples e apontam para uma relação entre a alta expressão de HDAC1 e baixa HDAC6 com fatores prognósticos favoráveis. Além disso, a baixa expressão de H3K9Ac e as altas expressões de HDAC2 e HDAC6 sustentam a continuidade das pesquisas envolvendo essas enzimas como alvos terapêuticos. A ampliação deste estudo com um maior número de amostras poderá confirmar os resultados aqui descritos.

6. Declaração de disponibilidade de dados

Os dados que sustentam as conclusões deste estudo estão disponíveis com o autor, mediante solicitação pertinente.

7. Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

8. Referências

- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. 2005;120(2):169-181.
- Bryan JN, Jabbes M, Berent, LM, et al. Hypermethylation of the DLC1 CpG island does not alter gene expression in canine lymphoma. *BMC genetics*. 2009;10(1):73.
- Cassali GD, Lavallo GE, Ferreira, E, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2014;7(2):38-69.

Cavalcanti MF, Cassali G, Cardoso S, et al. Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: estadiamento TNM e sistema de Nottingham [MS thesis]. *Prática Hospitalar*. 2006;8(44):97-97.

Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*. 2000;103(2):263-271.

De Matos AJF, Lopes CCC, Faustino AMR, et al. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer research*, v. 26, n. 3A, p. 1821-1826, 2006.

Derr RS, van Hoesel AQ, Benard A, et al. High nuclear expression levels of histone-modifying enzymes LSD1, HDAC2 and SIRT1 in tumor cells correlate with decreased survival and increased relapse in breast cancer patients. *BMC câncer*. 2014;14(1):604.

Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(7):1414.

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer research*. 2009;69(9):3802-3809.

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer research*. 2009;69(9):3802-3809.

Elston CW, Ellis IO. Assessment of histological grade. *The breast*. 1998;13:356-384.

Eto S, Saeki K, Yoshitake R, et al. Anti-tumor effects of the histone deacetylase inhibitor vorinostat on canine urothelial carcinoma cells. *PloS one*. 2019;14(6).

Fang C, Jian ZY, Shen XF, et al. Promoter methylation of the retinoic acid receptor beta2 (RAR β 2) is associated with increased risk of breast cancer: A prisma compliant meta-analysis. *PloS one*. 2015;10(10).

Ferreira, E., Bertagnolli, A. C., Cavalcanti, M. F., Schmitt, F. C., & Cassali, G. D. (2009). The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(4), 230-235.

Fraga M, Ballestar E, Villar-Garea BM, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*. 2005;37:391-400.

Gizinski S, Boryczko Z, Katkiewicz M, et al. Białko Ki-67 jako wskaźnik prognostyczny w nowotworach gruczołu mlekowego u suk. *Medycyna Weterynaryjna*. 2003;59(10):888-891.

- Guerriero JL, Sotayo A, Ponichtera HE, et al. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. *Nature*. 2017;543(7645):428-432.
- Hou H, Zhao L, Chen W, et al. Expression and significance of cortactin and HDAC 6 in human prostatic foamy gland carcinoma. *International journal of experimental pathology*. 2015;96(4):248-254.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293(5532):1074-1080.
- Jones PA, Issa JPJ, Baylin. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(10):630.
- Kadthur JC, Rao S, Sonnahallipura BM, et al. Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours. *Braz J Vet Pathol*. 2011;4(1):36-40.
- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
- Krusche CA, Wülfing P et al. Histone deacetylase-1 and-3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2005;90(1):15-23.
- Lansigan, F, Foss F. Current and Emerging Treatment Strategies for Cutaneous T-cell Lymphoma. *Drugs*. 2010;70(3):273-286.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 2005;438(7069):803-819.
- Lu Z, Zou J, Li S, et al. Epigenetic therapy inhibits metastases by disrupting premetastatic niches. *Nature*. 2020;579(7798):284-290.
- Misdorp W. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals second series*. 1999;7: 1-59.
- Moufarrij S, Srivastava A, Gomez S, et al. Combining DNMT and HDAC6 inhibitors increases anti-tumor immune signaling and decreases tumor burden in ovarian cancer. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-12.
- Müller BM, Jana L, Kasajima A, et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer-overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC câncer*. 2013;13(1):215.
- Muller HR, Prado KB. Epigenética: um novo campo da genética. *Rubs*. 2008;1(3):61-69.
- Murahari S, Jalkanen AL, Kulp SK, et al.. Sensitivity of osteosarcoma cells to HDAC inhibitor AR-42 mediated apoptosis. *BMC cancer*. 2017;17(1):67.

- Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncology reports*. 2007;18(4):769-774.
- Nowak, M., Madej, J. A., Pula, B., Dziegiel, P., & Ciaputa, R. (2015). Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), E-cadherin and Ki-67 in metastatic and non-metastatic canine mammary carcinomas. *Irish veterinary journal*, 69(1), 9.
- Oronsky B, Oronsky N, Scicinski J, et al. Rewriting the epigenetic code for tumor resensitization: a review. *Translational oncology*. 2014;7(5):626-631.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, et al. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. 2005;122(4):517-527.
- Qiao W, Liu H, Liu R, et al. Prognostic and clinical significance of histone deacetylase 1 expression in breast cancer: A meta-analysis. *Clinica chimica acta*. 2018;483:209-215.
- Ranieri G, Gadaleta CD, Patruno, R et al. A model of study for human cancer: Spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2013;88(1):187-197.
- Rasotto R, Berlato D, Goldschmidt MH, Zappulli, V. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of 229 cases. *Veterinary pathology*. 2017;54(4):571-578.
- Santos AA, Lopes CC, Ribeiro, JR, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*. 2013;9(1):1.
- Seo J, Min SK, Park HR., et al. Expression of histone deacetylases HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC6 in invasive ductal carcinomas of the breast. *Journal of breast cancer*. 2014;17(4):323-331.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(4):a018713.
- Shafiee R, Javanbakht J, Atyabi N et al. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell International*. 2013;13:79.
- Sierra OR, Santilli J, Anai LA et al. Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol. *J Vet Diagn Invest* 2018; 30: 263–267
- Sierra, OMR. Evaluation of acetylated histones 3 and 4 and histone deacetylases 1, 2 and 6 in cutaneous t-cell lymphoma in dogs. 2019. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária na área

de Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019. Disponível em: <
<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/191235>>. Acesso em: 27-01-2020.

Sorenmo, K. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2003;33(3): 573-596.

Sorenmo KV, Workey RD, Zappulli V .Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, Vail DM, Thamm D, Liptak J, Page, R. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book. Elsevier Health Sciences, Inc;2020:604-615.

Suzuki J, Chen YY, Scott GK, et al. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(9):3163-3171.

Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*.1996;272(5260):408-411.

Uehara N, Yoshizawa K, Tsubura A. Vorinostat enhances protein stability of p27 and p21 through negative regulation of Skp2 and Cks1 in human breast cancer cells. *Oncology reports*. 2012;28(1): 105-110.

Webber LP, Wagner VP, Curra M, et al. Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology*. 2017;71(2):278-286.

Weichert W. Expressão de HDAC e prognóstico clínico em neoplasias malignas humanas. *Cartas de câncer*. 2009;280 (2):168-176.

Withers SS, Skorupski KA, York D, et al. Association of macrophage and lymphocyte infiltration with outcome in canine osteosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*. 2019;17(1):49-60.

Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 2007;26(37):5541-5552.

Yamagami, T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1996;58(11):1079-1083.

Zhang X, Zhang X, Yuan B, et al. Subchronic toxicities of HZ1006, a hydroxamate-based histone deacetylase inhibitor, in beagle dogs and sprague-dawley rats. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(12):1190.

Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et a. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(20):6962-6968.

Zhao H, Yu Z, Zhao L, et al. HDAC2 overexpression is a poor prognostic factor of breast cancer patients with increased multidrug resistance-associated protein expression who received anthracyclines therapy. Japanese journal of clinical oncology. 2016;46(10):893-902.