



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

ALEXANDRE BATTAZZA

**PROTEÔMICA DOS OSTEOSSARCOMAS CANINOS: UMA
DESCRIÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE OS SEXOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador(a): Profa. Titular Noeme Sousa Rocha

**Botucatu
2022**

ALEXANDRE BATTAZZA

**PROTEÔMICA DOS OSTEOSSARCOMAS CANINOS: UMA
DESCRIÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE OS SEXOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Titular Noeme Sousa Rocha

Botucatu
2022

B335p Battazza, Alexandre
Proteômica dos osteossarcomas caninos: uma descrição e
comparação entre os sexos / Alexandre Battazza. -- Botucatu, 2023
49 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientadora: Noeme Sousa Rocha

1. Oncologia veterinária. 2. Proteômica. 3. Osteossarcoma. 4.
Câncer em animais. 5. Sexo diferenças. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Medicina, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.481130/2020-00.

RESUMO

Osteossarcoma é a neoplasia óssea primária mais comum em cães, altamente agressivo, invasivo e com alto potencial metastático, sendo os machos mais afetados do que as fêmeas. Apesar dos avanços no tratamento, o prognóstico continua ruim e os pacientes não ultrapassam dois anos de sobrevida. As disparidades na incidência entre os sexos oferecem oportunidades para investigação da biologia tumoral, diagnóstico precoce, estratégias terapêuticas e determinação do prognóstico. Para tanto, comparou-se a proteômica de tecido *ex vivo* de osteossarcomas apendiculares caninos entre os sexos. Foram colhidas amostras de osteossarcomas de 4 machos e 4 fêmeas. O tecido foi cortado em pequenos fragmentos, acrescido de tampão RIPA, sonificado e centrifugado para obtenção do extrato de proteínas (sobrenadante). A concentração de proteínas totais foi mensurada e confirmada por SDS-PAGE. Então a digestão trípica foi conduzida e a proteômica foi realizada por espectrometria de massas (Orbitrap LC-MS). Um total de 9 proteínas foram diferencialmente mais abundantes nos machos ($P < 0.05$), das quais todas já foram descritas em um ou mais tipos de câncer com papel na carcinogênese ou na resposta terapêutica. Este estudo é pioneiro na avaliação das disparidades proteicas entre os sexos no osteossarcoma canino, e amplia o conhecimento sobre o tema, podendo servir de base para futuros estudos sobre vias da oncogênese, resistência terapêutica e de marcadores prognósticos.

Palavras-chave: cão, neoplasia, osso, *ex vivo*, proteômica, disparidade.

ABSTRACT

Osteosarcoma is the most common primary bone cancer in dogs, highly aggressive and invasive and has a high metastatic potential, being males more affected than females. Despite advances in treatment, the prognosis of this tumor remains poor, and the survival of patients does not exceed two years. Incidence and response to treatment disparities between sexes offer opportunities to investigate tumoral biology, early diagnosis, therapy strategies, and establishment of prognosis. Thus, we compared the proteomics of *ex vivo* tissue of canine appendicular osteosarcoma between sexes. There were sampled osteosarcomas from 4 males and 4 females. Tissue was fragmented in small pieces, added RIPA buffer, sonicated e centrifuged to obtain the protein extract (supernatant). Total proteins concentration was measured and confirmed by SDS-PAGE. Tryptic digestion was conducted and mass spectrometry for proteomics performed (Orbitrap LC-MS). Nine proteins were diferentially more abundant in males ($P < 0.05$), of which all have already been reported in one or more types of neoplasia playing roles in carcinogenesis or therapy responses. This study is the pioneer in evaluating protein disparities between sexes on canine osteosarcoma. Consequently, it broads the knowledge about this subject and it can be the basis of further studies to investigate oncogenesis pathways, therapy resistance, and prognostic biomarkers.

Key-words: dog, neoplasia, *ex vivo*, bone, proteomics, disparity.

Sumário

Capítulo I	5
Revisão de literatura	6
Osteossarcoma.....	7
Caracterização e classificação	7
Epidemiologia e modelo experimental.....	9
Exames de imagem	10
Tratamento e prognóstico.....	11
Biomarcadores.....	12
Disparidades entre sexos no osteossarcoma.....	12
Proteômica.....	14
Referências.....	16
Capítulo II.....	25
Resumo.....	26
Introdução	27
Material e métodos.....	28
Resultados.....	31
Discussão	32
Referências.....	38
Considerações finais	47

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

Revisão de literatura

Osteossarcoma

Osteossarcoma (OS) é a neoplasia óssea primária mais comum em cães e humanos.^[1-3] De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), esta neoplasia é classificada em osteossarcoma central ou medular, o mais comum e normalmente mais agressivo; e periférico ou superficial (parosteal, periosteal e de alto grau), menos comum e agressivo.^[4,5]

A etiologia tumoral ainda não é bem elucidada, porém acredita-se que OS apendicular em cães pode ser resultado de mutações replicativas derivadas do processo normal de divisão celular para formação de ossos longos, com pouca contribuição de fatores hereditários ou ambientais.^[4]

Esporadicamente, algumas observações são citadas como relacionadas ao desenvolvimento de OS em cães e humanos, como irritação crônica, reparo tecidual associado à osteomielite, presença de fixadores internos, fraturas e infartos ósseos, radiação e doença de Paget.^[6]

Caracterização e classificação

Osteossarcoma é caracterizado pela produção de matriz osteoide ou osso imaturo pelas células mesenquimais malignas, que frequentemente acompanham áreas de diferenciação condroide e/ou fibrosa, além de hemorragia e necrose, características estas usadas na classificação em subtipos tumorais^[6-8]. Diferentes subtipos de osteossarcoma podem produzir lesões líticas, produtivas ou mistas, as quais demonstram aspectos macroscópicos e radiográficos variáveis e, portanto, a diferenciação definitiva entre os subtipos se dá pelo exame histopatológico.^[5]

Histologicamente, osteossarcomas são subdivididos em seis subtipos na medicina veterinária, baseados na morfologia celular e tipo de matriz predominante que consistem em: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, pouco diferenciado, telangiectásico e rico em células gigantes.^[7,8] Outros subtipos como o epitelióide e de células pequenas estão presentes apenas na medicina humana, porém, provavelmente, ocorrem nos animais.^[7]

Ademais da classificação, Klein & Siegal (2006)^[7] demonstraram que a maioria dos osteossarcomas de origem central é de alto grau e os periféricos de baixo grau, utilizando-se de critérios como atipia celular, contagem de mitoses, necrose tumoral, produção de matriz osteoide e presença de células gigantes multinucleadas. Já em cães, existem dois sistemas de graduação que, dentre alguns dos fatores, são levados em consideração o pleomorfismo nuclear, contagem de mitoses, necrose tumoral, quantidade de matriz, células gigantes e invasão vascular.^[9-11]

A classificação e graduação histológica são justificáveis, visto que se correlacionam, por vezes, com o prognóstico do paciente. Exemplificado pelo melhor prognóstico do subtipo fibroblástico em comparação ao telangiectásico, tanto nos humanos quanto em cães.^[12-14] Outro ponto avaliado é o tempo de sobrevida reduzido, intervalo livre da doença após tratamento e chance de disseminação metastática em cães com osteossarcoma grau III quando comparado aos graus I e II.^[9-11]

Apesar de menos representativa que o exame histopatológico, impossibilitando a classificação em subtipos, a citologia constitui outro exame útil para o diagnóstico de OS, sendo definitiva em casos onde há associação aos achados radiográficos e história clínica, e com acurácia potencializada quando se utiliza a coloração de Fosfatase Alcalina (FA), que evidencia os osteoblastos em marrom.^[15,16]

Epidemiologia e modelo experimental

O cão representa um bom modelo experimental para OS em humanos, devido a incidência 10-50 vezes maior de OS em cães e as similaridades entre os comportamentos biológicos tumorais nestas espécies.^[17-19]

Cães e humanos compartilham várias semelhanças quanto a incidência, como por exemplo a faixa etária, o porte do indivíduo, a localização do tumor e sexo; sendo as crianças, os adolescentes, os idosos, os indivíduos de porte grande, o esqueleto apendicular e os machos os mais afetados.^[6,18,20]

Outros dados epidemiológicos das espécies canina e humana reforçam a similaridade entre estas espécies. Por exemplo, o risco maior de cães de raças grandes e gigantes desenvolverem OS e mais precocemente do que portes menores^[2,12], equivalente a maior frequência de acometimento em indivíduos mais altos em humanos^[21].

Geralmente, OS acomete cães de idade média a idosos, com média de sete anos (7-9 anos), e há, também, uma concentração na faixa etária de 18-24 meses de idade.^[5,20,21] Entretanto, em humanos, OS é considerado uma doença de adolescentes, com média de 16 anos (10-24 anos) e outro pico de incidência em idosos acima dos 60 anos.^[6,18,21] Ademais, há predomínio de raças como Rottweiler, São Bernardo, Pastor Alemão, Labrador Retriever, Golden Retriever, Deerhound, Doberman Pinscher, Boxer, Setter Irlandês e Lébrél Irlandês e Dogue Alemão.^[1,3,21]

Os osteossarcomas em cães possuem maior incidência no esqueleto apendicular, três a quatro vezes mais frequente (75-80%) do que o axial (20-25%), e os membros anteriores de 1,6-1,8 vezes mais afetados do que os posteriores.^[1,20] Ainda, semelhante aos humanos, osteossarcomas apendiculares em cães acometem mais machos do que fêmeas, porém com

algumas variações entre raças e localização tumoral.^[1,2,6,21] Já o oposto é apontando para osteossarcomas axiais em cães, sendo mais frequentes em fêmeas.^[22]

No âmbito da localização, a metáfise distal do rádio, a metáfise proximal do úmero e a porção distal da tíbia são mais afetadas, com exceções entre certas raças e o porte do animal. Quanto ao osteossarcoma axial, 50% destes acometem a região da cabeça.^[1,22] Em humanos, a metáfise e diáfise de ossos longos representam 80-90% dos locais de maior acometimento, com 25% destes situados na região proximal do úmero.^[6,21]

O reconhecimento das limitações e vantagens do uso de cães como modelo experimental para essa neoplasia é essencial para estudos comparativos inovadores que irão maximizar a compreensão e potencializar o desenvolvimento de estratégias mais seguras e efetivas na prevenção e tratamento de OS em cães e humanos.^[17]

Exames de imagem

Os achados radiográficos, tanto nos cães quanto em humanos, são basicamente destruição óssea, neoformação óssea, edema de tecidos moles, padrão “sunburst” e triângulo de Codman.^[6,21] Apesar de que em cães, o padrão amorfo de matriz óssea é o mais frequente do que o padrão “sunburst”.^[5]

As alterações radiográficas acima descritas refletem as manifestações clínicas que variam de acordo com a localização tumoral, tais como claudicação nos osteossarcomas apendiculares^[23], dor, fraturas patológicas^[1,2] e corrimento nasal sanguinolento, no caso de OS nasal.^[24] Uma vez que OS apresenta evolução rápida, a velocidade de progressão da lesão clínica e radiográfica pode ser de importante valor diagnóstico.^[5] Ainda, vale ressaltar que há baixa taxa de detecção metastática no ato diagnóstico por radiografia, cerca de 10% em cães e

8-10% nos humanos e, por esse motivo, o exame de tomografia computadorizada se torna mais preciso na detecção de micrometástases pulmonares.^[6,17,21,22]

Tratamento e prognóstico

Os tratamentos combinam métodos de controle locais, como a amputação do membro ou excisão do tumor com preservação do membro e radioterapia, associadas ou não a quimioterapia para controle das metástases.^[25]

Os fármacos comumente utilizados em cães são a doxorrubicina e carboplatina, os quais, quando utilizados em conjunto com as técnicas de controle local acima exemplificadas, melhoram o tempo de sobrevida, entretanto sem diferenças entre si, exceto pelos menores efeitos adversos da carboplatina.^[26]

A sobrevida em cães varia de menos de um mês até oito meses, infreqüentemente chegando a um ou dois anos de sobrevida.^[1,27,28] Os melhores prognósticos ocorrem através de uso de quimioterapia adjuvante à amputação ou técnica de preservação de membro.^[2] Enquanto em humanos, há 70% de sobrevida até cinco anos no pós-operatório com quimioterapia e, ainda assim, 30-40% dos pacientes apresentam recidivas dentro de três anos após tratamento.^[6,21] A taxa de metástase sem quimioterapia é de 90% dentro de um ano para cães e de 80% em dois anos para humanos, com metástase para os pulmões e outros órgãos como linfonodo e cérebro, de forma precoce no curso da doença.^[6] Tanto em cães quanto nos humanos, quando se detecta metástase para linfonodo regional o prognóstico é pior.^[9,29]

Outros fatores que levam ao prognóstico desfavorável incluem metástase pulmonar, tamanho tumoral aumentado, localização tumoral (úmero), porcentagem de necrose, grau histológico e índice mitótico aumentado.^[6,9,21] Sendo o índice mitótico o fator mais confiável no caso dos critérios histológicos.^[30]

Em suma, apesar dos avanços no tratamento cirúrgico e quimioterápico e melhoria na sobrevida dos pacientes, o prognóstico de OS continua ruim.^[21] Por isso, o comportamento biológico, marcadores relacionados ao prognóstico e o tratamento são assunto de vários trabalhos de revisão e meta-análise, os quais ressaltam a importância de se obter mais informações sobre OS, bem como sobre seus biomarcadores.^[17,31-33]

Biomarcadores

Biomarcadores são características que podem ser medidas e avaliadas objetivamente como um indicador de processos biológicos, processos patogênicos ou respostas a tratamentos^[34], podendo auxiliar na previsão do curso da doença, a especificar as características moleculares do tumor e permitir uma abordagem terapêutica personalizada.^[35] Existem biomarcadores teciduais, séricos, plasmáticos e do sangue total, que se relacionam ao diagnóstico, sobrevida, intervalo livre da doença, agressividade tumoral, risco de metástase, resistência a fármacos e, conseqüentemente, com o prognóstico em cães e humanos. Dentre estes, a elevada expressão de Ezrin, superexpressão de metaloproteinases, oncogene MET, COX2, VEGF, Survivin, ABCB1 (Glicoproteína P), mutações no PTEN e TP53, IL-8, IL-12p40, Células CD8⁺ e Treg, mRNA EGFR, receptor Notch 2, HES1, mRNA HEYS, SERPIND1, componente 6 do MHC, células tumorais circulantes, pSmad2 e YAP, níveis de monócitos e linfócitos, e alguns microRNAs, como o miR-233, miR-214, miR-130a-3p, miR-126, miR-30c-5p, miR-23a-3p, miR-21 e let-7b-5p podem ser destacadas^[21,35-37]

Em humanos, acrescenta-se a superexpressão de c-Fos, CXCR4, uPA/uPAR, mutação Rb^[21] e um grupo de 12 miRNAs capazes de prever a resposta dos pacientes a quimioterapia.^[33]

Disparidades entre sexos no osteossarcoma

Em humanos, presume-se que as diferenças entre os sexos no câncer sejam relacionadas a hormônios sexuais, especialmente o estrogênio^[38], uma vez que modulam a expressão gênica em diferentes cânceres.^[39] Além disso, observaram-se diferenças na resposta e efeitos colaterais de fármacos anticâncer entre os sexos ^[40,41], e nas taxas de incidência e mortalidade.^[42]

De acordo com o Italian Cancer Registry (AIRTUM), um em cada dois homens e uma em cada três mulheres tem risco médio de desenvolver câncer, ao passo que um em cada três homens e uma em cada seis mulheres tem probabilidade média de morrer de câncer.^[43] A causa deve residir na interação complexa entre hormônios sexuais, cromossomos sexuais, células cancerígenas, o microambiente tumoral e o sistema imunológico.^[44] As células das mulheres demonstraram maior capacidade de superar o estresse celular pela indução de mecanismos de proteção, como a autofagia^[45], e por possuírem mais defesas antioxidantes do que as células masculinas.^[46]

Para a maioria dos cânceres, os homens tem maior risco de desenvolvimento e pior prognóstico do que as mulheres^[47]. Um dos motivos pelo qual as mulheres tem menor risco de mortalidade pelo câncer é por possuírem respostas imunes inatas e adaptativas mais fortes relacionadas a fatores genéticos e epigenéticos, hormônios sexuais (principalmente o estrogênio) e fatores psicossociais.^[48] À exemplo, alguns genes com papel crucial na regulação da resposta imune, como os que codificam a subunidade gama de receptores de IL-2, toll like receptor (TLR)-7, TLR8, CD40L e o forkhead box P3 (FoxP3) estão localizados no cromossomo X. No caso dos hormônios sexuais, estes modulam a diferenciação, maturação, funções efetoras e sobrevivência de células imunitárias inatas, incluindo células dendríticas, neutrófilos, células natural killer, macrófagos e linfócitos B e T.^[49]

Nos cães, apontam-se diversas neoplasias com incidência diferente entre os sexos, com maior incidência em machos nos fibrossarcomas, hemangiossarcomas, linfomas, melanomas e carcinoma de células escamosas, e taxas maiores nas fêmeas nos adenocarcinomas.^[31]

Não obstante, um estudo em camundongos identificou diferenças significativas na expressão gênica entre os sexos em diferentes tecidos^[50], dos quais várias estão envolvidas em doenças com susceptibilidade influenciada pelo sexo.^[42] Em outro modelo de camundongos, 19 proteínas derivadas dos machos e 10 derivadas das fêmeas obtiveram expressão influenciada pelo sexo na tumorigênese do câncer hepático.^[51]

Nesse contexto, as disparidades na incidência entre os sexos oferecem oportunidades para pesquisas sobre a etiologia tumoral em diferentes tipos de câncer^[47,52,53] e, assim como descritos em alguns tipos de câncer em humanos, podem trazer também informações para o diagnóstico precoce, determinação do prognóstico, escolha terapêutica e previsão da resposta as terapias.^[54]

Vale ressaltar que a expressão de mRNAs nem sempre se relaciona com a expressão proteica de fato. Porém, assim como nos estudos de transcriptômica, os estudos comparando a proteômica entre os sexos também encontraram diferenças.^[55]

Proteômica

O proteoma e suas redes de interação se correlacionam com as características tumorais de agressividade e resposta aos fármacos^[56-58], sendo a proteômica usada frequentemente nos estudos recentes em osteossarcoma, principalmente em culturas celulares, que buscam melhor compreensão tumoral tanto no homem quanto em modelos experimentais, à exemplo do cão.^[34,35]

A proteômica de culturas celulares é um método de estudo empregado em diversas características tumorais anteriormente citadas. Porém, como discutido por Freshney, ^[59] as diferenças entre *in vitro* e *in vivo* devem ser compreendidas, principalmente as relacionadas a farmacocinética, metabolismo e respostas teciduais e isquêmicas.

Nosso estudo traz, portanto, percepções moleculares sobre as proteínas diferencialmente expressas entre os sexos em tecido *ex vivo* de osteossarcomas apendiculares caninos, investigados pela espectrometria de massas. Um assunto inexplorado na literatura, no conhecimento dos autores, com a finalidade de melhorar a compreensão da biologia tumoral, bem como embasar estudos futuros sobre os potenciais biomarcadores e suas implicações no diagnóstico, prognóstico e intervenções terapêuticas no cenário da abordagem personalizada.

Referências

- [1] Brodey RS, Riser WH. Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. *Clin Orthop Relat Res.* 1969; 62:54–64. | PMID: 5251443.
- [2] Dernell WS. Tumours of the skeletal system. In: Dobson JM, Lascelles BDX, editors. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*, British Small Animal Veterinary Association, 2011, p. 159–77. DOI:10.22233/9781905319749.13
- [3] Egenvall A, Nødtvedt A, von Euler H. Bone tumors in a population of 400 000 insured Swedish dogs up to 10 y of age: incidence and survival. *Can J Vet Res.* 2007; 71:292–9. | PMID: 17955904; PMCID: PMC1940277.
- [4] Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science.* 2015; 347:78–81. DOI:10.1126/science.1260825 | PMID: 25554788; PMCID: PMC4446723.
- [5] Thompson KG, Dittmer KE. Tumors of Bone. *Tumors in Domestic Animals*, John Wiley & Sons, Ltd, 2016, p. 356–424. DOI:10.1002/9781119181200.ch10
- [6] Morello E, Martano M, Buracco P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: Similarities and differences with human osteosarcoma. *The Veterinary Journal.* 2011; 189:268–77. DOI:10.1016/j.tvjl.2010.08.014
- [7] Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol.* 2006; 125:555–81. DOI:10.1309/UC6K-QHLD-9LV2-KENN | PMID: 16627266.
- [8] McCarthy EF. Histological grading of primary bone tumors. *Skeletal Radiol.* 2009; 38:947–8. DOI:10.1007/s00256-009-0776-9
- [9] Kirpensteijn J, Kik M, Rutteman GR, Teske E. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Vet Pathol.* 2002; 39:240–6. DOI:10.1354/vp.39-2-240 | PMID: 12009062.
- [10] Loukopoulos P, Robinson WF. Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. *J Comp Pathol.* 2007; 136:65–73. DOI:10.1016/j.jcpa.2006.11.005 | PMID: 17270206.
- [11] Straw R, Powers B, Klausner J, Henderson R, Morrison W, McCaw D, Harvey H, Jacobs R, Berg R. Canine mandibular osteosarcoma: 51 cases (1980-1992). *Journal of the American Animal Hospital Association.* 1996; 32:257–62. DOI:10.5326/15473317-32-3-257
- [12] Misdorp W, Hart AA. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst.* 1979; 62:537–45. DOI:10.1093/jnci/62.3.537 | PMID: 283283.
- [13] Hammer AS, Weeren FR, Weisbrode SE, Padgett SL. Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1995; 31:321–6. DOI:10.5326/15473317-31-4-321 | PMID: 7552665.
- [14] Al-Khan AA, Nimmo JS, Day MJ, Tayebi M, Ryan SD, Kuntz CA, Simcock JO, Tarzi R, Saad ES, Richardson SJ, Danks JA. Fibroblastic Subtype has a Favourable Prognosis in Appendicular Osteosarcoma of Dogs. *J Comp Pathol.* 2020; 176:133–44. DOI:10.1016/j.jcpa.2020.02.011 | PMID: 32359626.
- [15] Barger A, Graca R, Bailey K, Messick J, de Lorimier L-P, Fan T, Hoffmann W. Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. *Vet Pathol.* 2005; 42:161–5. DOI:10.1354/vp.42-2-161 | PMID: 15753469.

- [16] Ryseff JK, Bohn AA. Detection of alkaline phosphatase in canine cells previously stained with Wright–Giemsa and its utility in differentiating osteosarcoma from other mesenchymal tumors. *Veterinary Clinical Pathology*. 2012; 41:391–5. DOI:10.1111/j.1939-165X.2012.00445.x
- [17] Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res*. 2007; 27:155–64. | PMID: 17352227.
- [18] Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009; 115:1531–43. DOI:10.1002/cncr.24121 | PMID: 19197972; PMCID: PMC2813207.
- [19] Anfinson KP, Devesa SS, Bray F, Troisi R, Jonasdottir TJ, Bruland OS, Grotmol T. Age-period-cohort analysis of primary bone cancer incidence rates in the United States (1976-2005). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; 20:1770–7. DOI:10.1158/1055-9965.EPI-11-0136 | PMID: 21724855.
- [20] Trost ME, Kommers GD, Brown CC, Barros CSL, Irigoyen LF, Figuera RA, Inkelmann MA, Silva TM da. Primary bone neoplasms in dogs: 90 cases. *Pesq Vet Bras*. 2012; 32:1329–35. DOI:10.1590/S0100-736X2012001200018
- [21] Selvarajah GT, Kirpensteijn J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *Vet J*. 2010; 185:28–35. DOI:10.1016/j.tvjl.2010.04.010 | PMID: 20493743.
- [22] Heyman SJ, Diefenderfer DL, Goldschmidt MH, Newton CD. Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). *Vet Surg*. 1992; 21:304–10. DOI:10.1111/j.1532-950x.1992.tb00069.x | PMID: 1455640.
- [23] Ling GV, Morgan JP, Pool RR. Primary bone tumors in the dog: a combined clinical, radiographic, and histologic approach to early diagnosis. *J Am Vet Med Assoc*. 1974; 165:55–67. | PMID: 4600463.
- [24] Morgan JP, Med V, Ackerman N, Bailey CS, Pool RR. Vertebral Tumors in the Dog: A Clinical Radiologic, and Pathologic Study of 61 Primary and Secondary Lesions. *Veterinary Radiology*. 1980; 21:197–212. DOI:10.1111/j.1740-8261.1980.tb01684.x
- [25] Withrow SJ, Page R, Vail DM. *Withrow and MacEwen’s Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier Health Sciences, 2012
- [26] Selmic LE, Ryan SD, Ehrhart NP, Withrow SJ. Bilateral appendicular bone tumors in four dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2013; 49:135–41. DOI:10.5326/JAAHA-MS-5828 | PMID: 23325591.
- [27] Spodnick GJ, Berg J, Rand WM, Schelling SH, Couto G, Harvey HJ, Henderson RA, MacEwen G, Mauldin N, McCaw DL. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). *J Am Vet Med Assoc*. 1992; 200:995–9. | PMID: 1577656.
- [28] Brodey RS, Abt DA. Results of surgical treatment in 65 dogs with osteosarcoma. *J Am Vet Med Assoc*. 1976; 168:1032–5. | PMID: 1064592.
- [29] Hillers KR, Dernell WS, Lafferty MH, Withrow SJ, Lana SE. Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986-2003). *J Am Vet Med Assoc*. 2005; 226:1364–7. DOI:10.2460/javma.2005.226.1364 | PMID: 15844430.

- [30] Schott CR, Tatierysky LJ, Foster RA, Wood GA. Histologic Grade Does Not Predict Outcome in Dogs with Appendicular Osteosarcoma Receiving the Standard of Care. *Vet Pathol.* 2018; 55:202–11. DOI:10.1177/0300985817747329 | PMID: 29284372.
- [31] Fenger JM, London CA, Kisseberth WC. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *ILAR J.* 2014; 55:69–85. DOI:10.1093/ilar/ilu009 | PMID: 24936031.
- [32] Wycislo KL, Fan TM. The immunotherapy of canine osteosarcoma: a historical and systematic review. *J Vet Intern Med.* 2015; 29:759–69. DOI:10.1111/jvim.12603 | PMID: 25929293; PMCID: PMC4895426.
- [33] Dai P, He Y, Luo G, Deng J, Jiang N, Fang T, Li Y, Cheng Y. Screening candidate microRNA-mRNA network for predicting the response to chemoresistance in osteosarcoma by bioinformatics analysis. *J Cell Biochem.* 2019; 120:16798–810. DOI:10.1002/jcb.28938 | PMID: 31090103.
- [34] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:89–95. DOI:10.1067/mcp.2001.113989 | PMID: 11240971.
- [35] Luu AK, Wood GA, Vilorio-Petit AM. Recent Advances in the Discovery of Biomarkers for Canine Osteosarcoma. *Front Vet Sci.* 2021; 8:734965. DOI:10.3389/fvets.2021.734965 | PMID: 34660770; PMCID: PMC8517113.
- [36] Heishima K, Meuten T, Yoshida K, Mori T, Thamm DH. Prognostic significance of circulating microRNA-214 and -126 in dogs with appendicular osteosarcoma receiving amputation and chemotherapy. *BMC Veterinary Research.* 2019; 15:39. DOI:10.1186/s12917-019-1776-1
- [37] Shekhar R, Priyanka P, Kumar P, Ghosh T, Khan MM, Nagarajan P, Saxena S. The microRNAs miR-449a and miR-424 suppress osteosarcoma by targeting cyclin A2 expression. *J Biol Chem.* 2019; 294:4381–400. DOI:10.1074/jbc.RA118.005778 | PMID: 30679313; PMCID: PMC6433048.
- [38] Özdemir BC, Dotto G-P. Sex Hormones and Anticancer Immunity. *Clinical Cancer Research.* 2019; 25:4603–10. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-19-0137
- [39] Kim H-I, Lim H, Moon A. Sex Differences in Cancer: Epidemiology, Genetics and Therapy. *Biomol Ther (Seoul).* 2018; 26:335–42. DOI:10.4062/biomolther.2018.103 | PMID: 29949843; PMCID: PMC6029678.
- [40] Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, Vargas-Chanes D, Nair S, Cha SS, Novotny PJ, Poon MA, O'Connell MJ, Loprinzi CL. Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2002; 20:1491–8. DOI:10.1200/JCO.2002.20.6.1491 | PMID: 11896096.
- [41] Lim H, Kim SY, Lee E, Lee S, Oh S, Jung J, Kim KS, Moon A. Sex-Dependent Adverse Drug Reactions to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *Biol Pharm Bull.* 2019; 42:594–600. DOI:10.1248/bpb.b18-00707 | PMID: 30930418.
- [42] Dorak MT, Karpuzoglu E. Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. *Front Genet.* 2012; 3:268. DOI:10.3389/fgene.2012.00268 | PMID: 23226157; PMCID: PMC3508426.
- [43] Straface E, Gambardella L, Brandani M, Malorni W. Sex differences at cellular level: “cells have a sex.” *Handb Exp Pharmacol.* 2012:49–65. DOI:10.1007/978-3-642-30726-3_3 | PMID: 23027445.

- [44] Clocchiatti A, Cora E, Zhang Y, Dotto GP. Sexual dimorphism in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16:330–9. DOI:10.1038/nrc.2016.30 | PMID: 27079803.
- [45] Massimini M, Palmieri C, De Maria R, Romanucci M, Malatesta D, De Martinis M, Maniscalco L, Ciccarelli A, Ginaldi L, Buracco P, Bongiovanni L, Della Salda L. 17-AAG and Apoptosis, Autophagy, and Mitophagy in Canine Osteosarcoma Cell Lines. *Vet Pathol*. 2017; 54:405–12. DOI:10.1177/0300985816681409 | PMID: 28438108.
- [46] Lista P, Straface E, Brunelleschi S, Franconi F, Malorni W. On the role of autophagy in human diseases: a gender perspective. *J Cell Mol Med*. 2011; 15:1443–57. DOI:10.1111/j.1582-4934.2011.01293.x | PMID: 21362130; PMCID: PMC3823190.
- [47] Cook MB, Dawsey SM, Freedman ND, Inskip PD, Wichner SM, Quraishi SM, Devesa SS, McGlynn KA. Sex disparities in cancer incidence by period and age. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18:1174–82. DOI:10.1158/1055-9965.EPI-08-1118 | PMID: 19293308; PMCID: PMC2793271.
- [48] Ortona E, Pierdominici M, Rider V. Editorial: Sex Hormones and Gender Differences in Immune Responses. *Front Immunol*. 2019; 10:1076. DOI:10.3389/fimmu.2019.01076 | PMID: 31156632; PMCID: PMC6530401.
- [49] Irelli A, Sirufo MM, D’Ugo C, Ginaldi L, De Martinis M. Sex and Gender Influences on Cancer Immunotherapy Response. *Biomedicines*. 2020; 8:232. DOI:10.3390/biomedicines8070232 | PMID: 32708265; PMCID: PMC7400663.
- [50] Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L, Drake TA, Lusis AJ. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res*. 2006; 16:995–1004. DOI:10.1101/gr.5217506 | PMID: 16825664; PMCID: PMC1524872.
- [51] Rong Z, Fan T, Li H, Li J, Wang K, Wang X, Dong J, Chen J, Wang F, Wang J, Wang A. Differential Proteomic Analysis of Gender-dependent Hepatic Tumorigenesis in Hras12V Transgenic Mice. *Mol Cell Proteomics*. 2017; 16:1475–90. DOI:10.1074/mcp.M116.065474 | PMID: 28512230; PMCID: PMC5546199.
- [52] Villamil JA, Henry CJ, Hahn AW, Bryan JN, Tyler JW, Caldwell CW. Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol*. 2009; 2009:591753. DOI:10.1155/2009/591753 | PMID: 20445802; PMCID: PMC2859020.
- [53] Edgren G, Liang L, Adami H-O, Chang ET. Enigmatic sex disparities in cancer incidence. *Eur J Epidemiol*. 2012; 27:187–96. DOI:10.1007/s10654-011-9647-5 | PMID: 22212865.
- [54] Shin JY, Jung HJ, Moon A. Molecular Markers in Sex Differences in Cancer. *Toxicol Res*. 2019; 35:331–41. DOI:10.5487/TR.2019.35.4.331 | PMID: 31636844; PMCID: PMC6791665.
- [55] Arnold AP, Lusis AJ. Understanding the Sexome: Measuring and Reporting Sex Differences in Gene Systems. *Endocrinology*. 2012; 153:2551–5. DOI:10.1210/en.2011-2134 | PMID: 22434084; PMCID: PMC3359607.
- [56] Timpe LC, Li D, Yen T-Y, Wong J, Yen R, Macher BA, Piryatinska A. Mining the Breast Cancer Proteome for Predictors of Drug Sensitivity. *J Proteomics Bioinform*. 2015; 8:204–11. DOI:10.4172/jpb.1000370 | PMID: 26516301; PMCID: PMC4621756.
- [57] Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, Gillette MA, Clauser KR, Wang P, Wang X, Qiao JW, Cao S, Petralia F, Kawaler E, Mundt F, Krug K, Tu Z, Lei JT, Gatz ML, Wilkerson M, Perou CM, Yellapantula V, Huang K, Lin C, McLellan MD, Yan P, Davies SR, Townsend RR, Skates SJ, Wang J, Zhang B, Kinsinger CR, Mesri M, Rodriguez H, Ding

- L, Paulovich AG, Fenyö D, Ellis MJ, Carr SA, NCI CPTAC. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*. 2016; 534:55–62. DOI:10.1038/nature18003 | PMID: 27251275; PMCID: PMC5102256.
- [58] Zhang H, Liu T, Zhang Z, Payne SH, Zhang B, McDermott JE, Zhou J-Y, Petyuk VA, Chen L, Ray D, Sun S, Yang F, Chen L, Wang J, Shah P, Cha SW, Aiyetan P, Woo S, Tian Y, Gritsenko MA, Clauss TR, Choi C, Monroe ME, Thomas S, Nie S, Wu C, Moore RJ, Yu K-H, Tabb DL, Fenyö D, Bafna V, Wang Y, Rodriguez H, Boja ES, Hiltke T, Rivers RC, Sokoll L, Zhu H, Shih I-M, Cope L, Pandey A, Zhang B, Snyder MP, Levine DA, Smith RD, Chan DW, Rodland KD, CPTAC Investigators. Integrated Proteogenomic Characterization of Human High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cell*. 2016; 166:755–65. DOI:10.1016/j.cell.2016.05.069 | PMID: 27372738; PMCID: PMC4967013.
- [59] Hoffman JM, O’Neill DG, Creevy KE, Austad SN. Do Female Dogs Age Differently Than Male Dogs? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018; 73:150–6. DOI:10.1093/gerona/glx061 | PMID: 28472238; PMCID: PMC5861885.
- [60] Grüntzig K, Graf R, Boo G, Guscetti F, Hässig M, Axhausen KW, Fabrikant S, Welle M, Meier D, Folkers G, Pospischil A. Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. *J Comp Pathol*. 2016; 155:156–70. DOI:10.1016/j.jcpa.2016.05.011 | PMID: 27406312.
- [61] Slayter MV, editor. *Histological classification of bone and joint tumors of domestic animals*. Washington, DC: Armed Forces Inst. of Pathology, 1994
- [62] Peach M, Marsh N, Macphee DJ. Protein solubilization: attend to the choice of lysis buffer. *Methods Mol Biol*. 2012; 869:37–47. DOI:10.1007/978-1-61779-821-4_4 | PMID: 22585475.
- [63] Souza F, Chirinéa V, Martins M, Lopes M. Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009; 44:283–6. DOI:10.1111/j.1439-0531.2009.01447.x
- [64] Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein methods*. 2nd ed New York: Wiley-Liss, 1996
- [65] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996; 68:850–8. DOI:10.1021/ac950914h | PMID: 8779443.
- [66] Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, Moresco JJ, Yates JR, Barbosa VC. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc*. 2016; 11:102–17. DOI:10.1038/nprot.2015.133
- [67] Shan N, Zhou W, Zhang S, Zhang Y. Identification of HSPA8 as a candidate biomarker for endometrial carcinoma by using iTRAQ-based proteomic analysis. *Oncotargets Ther*. 2016; 9:2169–79. DOI:10.2147/OTT.S97983 | PMID: 27110132; PMCID: PMC4835145.
- [68] Li J, Ge Z. High HSPA8 expression predicts adverse outcomes of acute myeloid leukemia. *BMC Cancer*. 2021; 21:475. DOI:10.1186/s12885-021-08193-w | PMID: 33926391; PMCID: PMC8086305.
- [69] Novikova SE, Soloveva NA, Farafonova TE, Tikhonova OV, Liao P-C, Zgoda VG. Proteomic Signature of Extracellular Vesicles for Lung Cancer Recognition. *Molecules*.

- 2021; 26:6145. DOI:10.3390/molecules26206145 | PMID: 34684727; PMCID: PMC8539600.
- [70] Nirdé P, Derocq D, Maynadier M, Chambon M, Basile I, Gary-Bobo M, Garcia M. Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. *Oncogene*. 2010; 29:117–27. DOI:10.1038/onc.2009.311 | PMID: 19802014; PMCID: PMC2864961.
- [71] Xiang X, You X-M, Li L-Q. Expression of HSP90AA1/HSPA8 in hepatocellular carcinoma patients with depression. *OTT*. 2018; Volume 11:3013–23. DOI:10.2147/OTT.S159432
- [72] Tian Y, Xu H, Farooq AA, Nie B, Chen X, Su S, Yuan R, Qiao G, Li C, Li X, Liu X, Lin X. Maslinic acid induces autophagy by down-regulating HSPA8 in pancreatic cancer cells. *Phytotherapy Research*. 2018; 32:1320–31. DOI:10.1002/ptr.6064
- [73] Gebhard C, Miller I, Hummel K, Neschi Née Ondrovics M, Schlosser S, Walter I. Comparative proteome analysis of monolayer and spheroid culture of canine osteosarcoma cells. *J Proteomics*. 2018; 177:124–36. DOI:10.1016/j.jprot.2018.01.006 | PMID: 29337282.
- [74] Xu Y-F, Ren X-Y, Li Y-Q, He Q-M, Tang X-R, Sun Y, Shao J-Y, Jia W-H, Kang T-B, Zeng M-S, Liu N, Ma J. High expression of Talin-1 is associated with poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2015; 15:332. DOI:10.1186/s12885-015-1351-5 | PMID: 25925041; PMCID: PMC4424526.
- [75] Lai M-T, Hua C-H, Tsai M-H, Wan L, Lin Y-J, Chen C-M, Chiu I-W, Chan C, Tsai F-J, Jinn-Chyuan Sheu J. Talin-1 overexpression defines high risk for aggressive oral squamous cell carcinoma and promotes cancer metastasis. *J Pathol*. 2011; 224:367–76. DOI:10.1002/path.2867 | PMID: 21547905.
- [76] Fang K-P, Dai W, Ren Y-H, Xu Y-C, Zhang S-M, Qian Y-B. Both Talin-1 and Talin-2 correlate with malignancy potential of the human hepatocellular carcinoma MHCC-97 L cell. *BMC Cancer*. 2016; 16:45. DOI:10.1186/s12885-016-2076-9 | PMID: 26822056; PMCID: PMC4730717.
- [77] Cao Y, Li R, Shen M, Li C, Zou Y, Jiang Q, Liu S, Lu C, Li H, Liu H, Cai Y. DDRGK1, a crucial player of ufmylation system, is indispensable for autophagic degradation by regulating lysosomal function. *Cell Death Dis*. 2021; 12:416. DOI:10.1038/s41419-021-03694-9 | PMID: 33879777; PMCID: PMC8058061.
- [78] Lin J-X, Xie X-S, Weng X-F, Zheng C-H, Xie J-W, Wang J-B, Lu J, Chen Q-Y, Cao L-L, Lin M, Tu R-H, Li P, Huang C-M. Low expression of CDK5RAP3 and DDRGK1 indicates a poor prognosis in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2018; 24:3898–907. DOI:10.3748/wjg.v24.i34.3898 | PMID: 30228783; PMCID: PMC6141336.
- [79] Balamurugan TST, Huang C-H, Chang P-C, Huang S-T. Electrochemical Molecular Switch for the Selective Profiling of Cysteine in Live Cells and Whole Blood and for the Quantification of Aminoacylase-1. *Anal Chem*. 2018; 90:12631–8. DOI:10.1021/acs.analchem.8b02799 | PMID: 30350617.
- [80] Caira S, Iannelli A, Sciarrillo R, Picariello G, Renzone G, Scaloni A, Addeo P. Differential representation of liver proteins in obese human subjects suggests novel biomarkers and promising targets for drug development in obesity. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017; 32:672–82. DOI:10.1080/14756366.2017.1292262 | PMID: 28274171; PMCID: PMC6009959.

- [81] Xu Z, Hu Y, Yu Z. Effect of the ACY-1 gene on HER2 and TRAIL expression in rectal carcinoma. *Exp Ther Med*. 2021; 22:817. DOI:10.3892/etm.2021.10249 | PMID: 34131440; PMCID: PMC8193208.
- [82] Shi H, Hayes MT, Kirana C, Miller RJ, Keating JP, Stubbs RS. Overexpression of aminoacylase 1 is associated with colorectal cancer progression. *Hum Pathol*. 2013; 44:1089–97. DOI:10.1016/j.humpath.2012.09.015 | PMID: 23317546.
- [83] Wei X, Li J, Xie H, Ling Q, Wang J, Lu D, Zhou L, Xu X, Zheng S. Proteomics-based identification of the tumor suppressor role of aminoacylase 1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2014; 351:117–25. DOI:10.1016/j.canlet.2014.05.001 | PMID: 24846301.
- [84] Blanc V, Navaratnam N, Henderson JO, Anant S, Kennedy S, Jarmuz A, Scott J, Davidson NO. Identification of GRY-RBP as an apolipoprotein B RNA-binding protein that interacts with both apobec-1 and apobec-1 complementation factor to modulate C to U editing. *J Biol Chem*. 2001; 276:10272–83. DOI:10.1074/jbc.M006435200 | PMID: 11134005.
- [85] Cappelli S, Romano M, Buratti E. Systematic Analysis of Gene Expression Profiles Controlled by hnRNP Q and hnRNP R, Two Closely Related Human RNA Binding Proteins Implicated in mRNA Processing Mechanisms. *Front Mol Biosci*. 2018; 5:79. DOI:10.3389/fmolb.2018.00079 | PMID: 30214903; PMCID: PMC6125337.
- [86] Chen Y, Chan J, Chen W, Li J, Sun M, Kannan GS, Mok Y-K, Yuan YA, Jobichen C. SYNCRIP, a new player in pri-let-7a processing. *RNA*. 2020; 26:290–305. DOI:10.1261/rna.072959.119 | PMID: 31907208; PMCID: PMC7025501.
- [87] Titlow J, Robertson F, Järvelin A, Ish-Horowitz D, Smith C, Gratton E, Davis I. Syncrip/hnRNP Q is required for activity-induced Msp300/Nesprin-1 expression and new synapse formation. *J Cell Biol*. 2020; 219:e201903135. DOI:10.1083/jcb.201903135 | PMID: 32040548; PMCID: PMC7055005.
- [88] Semino F, Schröter J, Willemsen MH, Bast T, Biskup S, Beck-Woedl S, Brennenstuhl H, Schaaf CP, Kölker S, Hoffmann GF, Haack TB, Syrbe S. Further evidence for de novo variants in SYNCRIP as the cause of a neurodevelopmental disorder. *Hum Mutat*. 2021; 42:1094–100. DOI:10.1002/humu.24245 | PMID: 34157790.
- [89] Hauptman N, Boštjančič E, Žlajpah M, Ranković B, Zidar N. Bioinformatics Analysis Reveals Most Prominent Gene Candidates to Distinguish Colorectal Adenoma from Adenocarcinoma. *Biomed Res Int*. 2018; 2018:9416515. DOI:10.1155/2018/9416515 | PMID: 30175151; PMCID: PMC6106857.
- [90] Jiang X, Wu M, Xu X, Zhang L, Huang Y, Xu Z, He K, Wang H, Wang H, Teng L. COL12A1, a novel potential prognostic factor and therapeutic target in gastric cancer. *Mol Med Rep*. 2019; 20:3103–12. DOI:10.3892/mmr.2019.10548 | PMID: 31432110; PMCID: PMC6755194.
- [91] Xiang Z, Li J, Song S, Wang J, Cai W, Hu W, Ji J, Zhu Z, Zang L, Yan R, Yu Y. A positive feedback between IDO1 metabolite and COL12A1 via MAPK pathway to promote gastric cancer metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019; 38:314. DOI:10.1186/s13046-019-1318-5 | PMID: 31315643; PMCID: PMC6637527.
- [92] COL12A1 as a prognostic biomarker in HER2-enriched breast cancer and its association with immune infiltration. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2022. DOI:10.22514/ejgo.2022.045

- [93] Irmer H, Höhfeld J. Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone Hip. *J Biol Chem.* 1997; 272:2230–5. DOI:10.1074/jbc.272.4.2230 | PMID: 8999928.
- [94] Shi Z, Zhang J, Zheng S. What we know about ST13, a co-factor of heat shock protein, or a tumor suppressor? *J Zhejiang Univ Sci B.* 2007; 8:170–6. DOI:10.1631/jzus.2007.B0170 | PMID: 17323428; PMCID: PMC1810382.
- [95] Dong Q, Zheng S, Hu Y, Chen G, Ding J-Y. Evaluation of ST13 gene expression in colorectal cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005; 6:1170–5. DOI:10.1631/jzus.2005.B1170 | PMID: 16358374; PMCID: PMC1390639.
- [96] Wang L-B, Zheng S, Zhang S-Z, Peng J-P, Ye F, Fang S-C, Wu J-M. Expression of ST13 in colorectal cancer and adjacent normal tissues. *World J Gastroenterol.* 2005; 11:336–9. DOI:10.3748/wjg.v11.i3.336 | PMID: 15637739; PMCID: PMC4205332.
- [97] Yang M, Yu M, Guan D, Gu J, Cao X, Wang W, Zheng S, Xu Y, Shen Z, Liu X. ASK1-JNK signaling cascade mediates Ad-ST13-induced apoptosis in colorectal HCT116 cells. *J Cell Biochem.* 2010; 110:581–8. DOI:10.1002/jcb.22551 | PMID: 20512919.
- [98] Doly S, Marullo S. [PRAF2, an endoplasmic reticulum gatekeeper, controls the cell-surface export of the GABA(B) receptor in neurons]. *Med Sci (Paris).* 2015; 31:834–6. DOI:10.1051/medsci/20153110008 | PMID: 26481021.
- [99] Schweneker M, Bachmann AS, Moelling K. JM4 is a four-transmembrane protein binding to the CCR5 receptor. *FEBS Lett.* 2005; 579:1751–8. DOI:10.1016/j.febslet.2005.02.037 | PMID: 15757671.
- [100] Fo CS, Coleman CS, Wallick CJ, Vine AL, Bachmann AS. Genomic organization, expression profile, and characterization of the new protein PRA1 domain family, member 2 (PRAF2). *Gene.* 2006; 371:154–65. DOI:10.1016/j.gene.2005.12.009 | PMID: 16481131.
- [101] Borsics T, Lundberg E, Geerts D, Koomoa D-LT, Koster J, Wester K, Bachmann AS. Subcellular distribution and expression of prenylated Rab acceptor 1 domain family, member 2 (PRAF2) in malignant glioma: Influence on cell survival and migration. *Cancer Sci.* 2010; 101:1624–31. DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01570.x | PMID: 20412121.
- [102] Geerts D, Wallick CJ, Koomoa D-LT, Koster J, Versteeg R, Go RCV, Bachmann AS. Expression of prenylated Rab acceptor 1 domain family, member 2 (PRAF2) in neuroblastoma: correlation with clinical features, cellular localization, and cerulenin-mediated apoptosis regulation. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:6312–9. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-0829 | PMID: 17975142.
- [103] Yco LP, Geerts D, Koster J, Bachmann AS. PRAF2 stimulates cell proliferation and migration and predicts poor prognosis in neuroblastoma. *Int J Oncol.* 2013; 42:1408–16. DOI:10.3892/ijo.2013.1836 | PMID: 23440329.
- [104] Vento MT, Zazzu V, Loffreda A, Cross JR, Downward J, Stoppelli MP, Iaccarino I. Praf2 is a novel Bcl-xL/Bcl-2 interacting protein with the ability to modulate survival of cancer cells. *PLoS One.* 2010; 5:e15636. DOI:10.1371/journal.pone.0015636 | PMID: 21203533; PMCID: PMC3006391.
- [105] Wang C-H, Liu L-L, Liao D-Z, Zhang M-F, Fu J, Lu S-X, Chen S-L, Wang H, Cai S-H, Zhang CZ, Zhang H-Z, Yun J-P. PRAF2 expression indicates unfavorable clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2018; 10:2241–8. DOI:10.2147/CMAR.S166789 | PMID: 30100755; PMCID: PMC6065608.

- [106] Qian Z, Wei B, Zhou Y, Wang Q, Wang J, Sun Y, Gao Y, Chen X. PRAF2 overexpression predicts poor prognosis and promotes tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2019; 19:585. DOI:10.1186/s12885-019-5818-7 | PMID: 31200670; PMCID: PMC6570937.
- [107] Wang Y, Zhao Z, Jiao W, Yin Z, Zhao W, Bo H, Bi Z, Dong B, Chen B, Wang Z. PRAF2 is an oncogene acting to promote the proliferation and invasion of breast cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2022; 24:1–11. DOI:10.3892/etm.2022.11674

CAPÍTULO II

O artigo a seguir foi redigido em conformidade com as normas do periódico científico “*Oncology in Veterinary Medicine in Frontiers in Veterinary Science*”

Sex-biased proteins differences in canine appendicular osteosarcomas

Resumo

Osteossarcoma é a neoplasia óssea primária mais comum em cães, altamente agressivo, invasivo e com alto potencial metastático, sendo os machos mais afetados do que as fêmeas. Apesar dos avanços no tratamento, o prognóstico continua ruim e os pacientes não ultrapassam dois anos de sobrevida. As disparidades na incidência entre os sexos oferecem oportunidades para investigação da biologia tumoral, diagnóstico precoce, estratégias terapêuticas e determinação do prognóstico. Para tanto, comparou-se a proteômica de tecido *ex vivo* de osteossarcomas apendiculares caninos entre os sexos. Foram colhidas amostras de osteossarcomas de 4 machos e 4 fêmeas. O tecido foi cortado em pequenos fragmentos, acrescido de tampão RIPA, sonificado e centrifugado para obtenção do extrato de proteínas (sobrenadante). A concentração de proteínas totais foi mensurada e confirmada por SDS-PAGE. Então a digestão trípica foi conduzida e a proteômica foi realizada por espectrometria de massas (Orbitrap LC-MS). Um total de 9 proteínas foram diferencialmente mais abundantes nos machos ($P < 0.05$), das quais todas já foram descritas em um ou mais tipos de câncer com papel na carcinogênese ou na resposta terapêutica. Este estudo é pioneiro na avaliação das disparidades proteicas entre os sexos no osteossarcoma canino, e amplia o conhecimento sobre o tema, podendo servir de base para futuros estudos sobre vias da oncogênese, resistência terapêutica e de marcadores prognósticos.

Palavras-chave: cão, neoplasia, osso, *ex vivo*, proteômica, disparidade.

Introdução

Osteossarcoma (OS) é a neoplasia óssea primária mais comum em cães. ^[1-3] É uma neoplasia altamente agressiva e a sobrevida varia de menos de um mês até oito meses, infreqüentemente chegando a um ou dois anos. ^[1,27,28] Em suma, apesar dos avanços no tratamento cirúrgico e quimioterápico, o prognóstico de OS continua ruim. ^[6]

Esporadicamente, observações foram relacionadas ao desenvolvimento de OS em cães e humanos, como irritação crônica, reparo associado à osteomielite, presença de fixadores internos, fraturas e infartos ósseos, radiação e doença de Paget. ^[6] Todavia, a etiologia tumoral ainda não é bem elucidada e acredita-se que OS apendicular em cães pode ser resultado de mutações replicativas derivadas do processo normal de divisão celular para formação de ossos longos, com pouca contribuição de fatores hereditários ou ambientais. ^[4]

O OS apendiculares acometem mais os machos do que as fêmeas, com algumas variações entre raças e localização tumoral. ^[1,2,6,21] Além disso, a proporção de mortes por OS é maior nos machos do que nas fêmeas, tanto nos intactos quanto nos castrados, entretanto acredita-se que a castração esteja associada a uma taxa de morte por câncer de 10%–13% maior em ambos os sexos. ^[59]

Em humanos, presume-se que as diferenças entre os sexos no câncer sejam relacionadas a hormônios sexuais, especialmente o estrógeno ^[38], uma vez que modulam a expressão gênica em diferentes cânceres. ^[39] Além disso, observaram-se diferenças na resposta e efeitos adversos de fármacos anticâncer entre os sexos ^[40,41], inclusive nas taxas de incidência e mortalidade. ^[42,54]

Nos cães, apontam-se diversas neoplasias com incidência diferente entre os sexos, com maior incidência em machos nos fibrossarcomas, hemangiossarcomas, linfomas, melanomas e carcinoma de células escamosas; e taxas maiores nas fêmeas nos adenocarcinomas. ^[60]

Nesse contexto, as disparidades na incidência entre os sexos oferecem oportunidades para pesquisas sobre a etiologia tumoral^[47,52,53] e, assim como descritos em outros tipos de câncer em humanos, podem trazer também informações para o diagnóstico precoce, determinação do prognóstico, escolha da terapia e previsão de resposta as terapias.^[54]

Nosso estudo traz, portanto, percepções moleculares sobre as proteínas diferencialmente expressas entre os sexos em osteossarcomas apendiculares caninos, assunto inexplorado na literatura disponível, no conhecimento dos autores.

Material e métodos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ – Unesp - Botucatu - Protocolo 0020/2022.

As amostras foram obtidas a partir de biópsias de cães com lesões ósseas com suspeita de osteossarcoma, que chegaram ao Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp - Campus de Botucatu nos anos de 2020 e 2021, juntamente com as informações clínicas de cada paciente.

O tecido tumoral à fresco foi dividido em duas amostras teciduais equivalentes, uma para gradação e classificação histopatológica e outra para a realização da proteômica.

A primeira amostra foi fixada em formalina tamponada neutra a 10% e submetida ao processamento de rotina utilizado para o diagnóstico histopatológico, sendo as lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Os tumores foram graduados conforme descrito por Kirpensteijn et al.^[9] e Loukopoulos e Robinson^[10] e classificados com base na classificação histopatológica de tumores ósseos proposta por Slayter et al.^[61].

Já a segunda fração da amostra foi selecionada evitando-se áreas de necrose visíveis macroscopicamente e tecidos adjacentes não tumorais, e congelada em nitrogênio líquido, em até 30 minutos após a exérese da neoplasia ou óbito, para extração proteica.

Para extração das proteínas, as amostras de osteossarcoma foram seccionadas em fragmentos pequenos com auxílio de lâmina de bisturi na placa de Petri, pesadas na balança analítica, acrescida de tampão RIPA contendo inibidores de proteases (150 mmol NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 50 mmol TRIS-HCl pH 7,5, 0,8 mmol EDTA, 1,0 µg/mL aprotinina, 1,0 µg/mL leupeptina e 35,0 µg/mL PMSF [phenylmethylsulfonyl fluoride]^[62], na proporção de 100 µL para cada 100 mg de amostra. Então as amostras foram sonicadas segundo Souza et al. ^[63]utilizando uma probe de 3,0 mm, 20% de amplitude, por 30 segundos em banho de gelo, repetida 10 vezes, com intervalos de 1 minuto entre as séries. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 10.000xg, 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante resultante foi separado e a concentração de proteína total foi mensurada em espectrofotômetro na absorvância 280 (NanoDrop 2000, Termo Fisher Scientific™ Wilmington, Delaware USA). O SDS-PAGE foi conduzido para confirmação da quantidade de proteína mensurada ^[64].

Para espectrometria de massas, 50 µg do extrato proteico foram submetidos a SDS-PAGE, porém a corrida foi interrompida quando as amostras atingiram o gel de separação, formando uma banda única. O gel foi corado e cada banda foi recortada em fragmentos de ~1 mm e digeridas, segundo Shevchenko et al. ^[65] com modificações. Os fragmentos de gel foram descorados em 50% metanol, 2,5% ácido acético diluído em água ultrapura, por 4 vezes. A seguir, os fragmentos foram desidratados com 100% acetonitrila. As pontes de ligação nas proteínas foram reduzidas com DTT (Bio-Rad® Lagoa Santa, SP, BR) e alquiladas com

iodoacetamida (Bio-Rad® Santo Amaro, MG, BR). Então, a digestão foi conduzida *overnight* com tripsina (20 ng/ μ L), na proporção de 1: 50 (tripsina/substrato). A extração dos peptídeos no gel foi realizada com 5% ácido fórmico, as amostras foram concentradas a \sim 1 μ L (SPD1010 Integrated SpeedVac™ Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e armazenadas a -80 °C até a espectrometria de massas.

Para a espectrometria de massas, as amostras foram diluídas e a mistura homogeneizada em agitador de tubos, centrifugada a 1.100 x g, durante 5 minutos. O sobrenadante foi depositado em tubos de vidro, específicos para análise no espectrômetro de massas e analisado em duplicata (Orbitrap Q Exactive Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Os digestos trópticos foram analisados por UHPLC Dionex Ultimate 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) acoplado a Q Exactive (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Neste sistema, o controle de fluxo é regulado em nl/min. As amostras foram ressuspendidas em 100 μ l água LC/MS contendo 0,1% ácido fórmico. A cromatografia se deu em uma fonte PicoChip (Model 1PCH-550; matriz sílica 75 μ m ReproSil Pur C18 3 μ m; New Objective, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) com fluxo contínuo de 300 nL/min. Antes da coluna, foi injetado 3 μ l da amostra em 2 cm Acclaim PepMap 100 trap (75 μ m ID, C18 3 μ m; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). A fase móvel A correspondeu 0,1% ácido fórmico diluído em água e a fase B foi acetonitrila, 0,1% ácido fórmico diluído em água.

Cada amostra foi separada seguindo um gradiente 2-40% fase móvel B por 2 horas, seguidas por 10 minutos de lavagem da coluna em 80% do tampão B e reequilíbrio da coluna por 10 minutos em 2% do mesmo tampão. Os espectros de massa foram adquiridos em

espectrômetro de massas por DDA (data dependent acquisition) com seleção de contagem *top* 30. A busca dos íons precursores foi 350-1.400 m/z a 70.000 de resolução. Uma janela de isolamento de 1,2 m/z foi selecionada, energia de colisão de 30 e *higher energy collision induced dissociation* (HCD) MS/MS espectros adquiridos em 15.000 de resolução. *Automatic gain control* (AGC) *target* de 10^5 e tempo máximo de injeção de 50 ms. Considerou-se a exclusão de cargas 1 e > 5 e o tempo de exclusão dinâmico de 10 segundos.

Os níveis de expressão relativos entre as amostras foram avaliados com base na contagem espectral no *software PatternLab for Proteomics* ^[66] com o uso de banco de dados da base UNIPROT (www.uniprot.org) para espécie em questão (*Canis lupus familiaris*) seguindo protocolo proposto pelos autores do *software*, e então, os dados foram inseridos no programa KEGG a fim de determinar as vias de correlação.

Para a comparação dos níveis proteicos entre os sexos foi utilizado o teste t com intervalo de confiança de 95%, pela plataforma MetaboAnalyst 5.0 (metaboanalyst.ca). Além disso, as proteínas diferencialmente expressas entre os sexos foram listadas por nome e gene codificador.

Resultados

Foram obtidas 8 amostras de osteossarcomas caninos, sendo 4 fêmeas e 4 machos (Tabela 1), das quais identificou-se número variado de proteínas (Tabela 1), sendo 9 com maior abundância nos machos em comparação com as fêmeas, quando $P < 0,05$ (Tabela 2).

Tabela 1. Informações anatomoclínicas.

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
Idade (anos)	1,5	9	10	11	4,5	6	7	15
Peso (kg)	30	34	16,65	43	54	29	22	25,4
Raça	Golden Retriever	Labrador	SRD	Labrador	Rottweiler	Pastor Alemão	SRD	Dálmata
Sexo	Macho	Fêmea	Fêmea	Macho	Macho	Fêmea	Fêmea	Macho
Esterilização	Sim	Sim	Não	Não	Não	-	Sim	Não
Localização	Distal de rádio esquerdo	Distal de rádio esquerdo	Distal de rádio esquerdo	Proximal de úmero direito	Proximal de úmero esquerdo	Proximal de úmero direito	Distal de metatarso direito	Diáfise fêmur esquerdo
Tamanho (cm)	4,5 x 2,5	5,5 x 3,0	11,0 x 9,2 x 7,0	11,0 x 8,0 x 6,0	6,5 x 6,0 x 1,5	10,3 x 9,9 x 7,9	13,0 x 7,0 x 5,0	5,0 x 4,0 x 3,0
Metástase	Pulmão	-	Ausente	Pulmão, baço, fígado	Ausente	Pulmão	Ausente	Ausente
Evolução (dias)	-	120	90	30	90	7	30	60
Tratamento	Amputação	Amputação	Amputação	Nenhum	Amputação + carboplatina	Amputação	Amputação + carboplatina	Nenhum
Sobrevida após diagnóstico (dias)	-	-	45	1	300	60	180	60
Eutanásia	-	-	-	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Subtipo	Condrolástico	Osteoblástico	Osteoblástico	Osteoblástico	Condrolástico	Osteoblástico	Condrolástico	Osteoblástico
Graduação	I	II	I	III	I	III	II	II
Proteínas identificadas	340	359	476	509	272	491	374	271

Tabela 2. Proteínas em maior abundância (macho/fêmea).

Registro UniProt	Proteínas	Genes	P<0.05
A0A8I3NP07	Collagen type XII alpha 1 chain	COL12A1	^
A0A8I3NLY5	DDRGK domain-containing protein 1	DDRGK1	^
A0A8I3NK47	Heat shock protein family A (Hsp70) member 8	HSPA8	^
A0A8I3QUB8	N-acyl-aliphatic-L-amino acid amidohydrolase (EC 3.5.1.14) (N-acyl-L-amino-acid amidohydrolase)	ACY1	^
A0A8I3Q651	PRA1 family protein	PRAF2	^
A0A8I3NYR1	ST13 Hsp70 interacting protein	ST13	^
A0A8I3NM71	Synaptotagmin binding cytoplasmic RNA interacting protein	SYNCRIP	^
A0A8I3PBU4	Tubulin alpha chain	LOC119866377	^
A0A8I3Q1H9	Tubulin alpha chain	TUBA4A	^

^ maior abundância

Discussão

As informações anatomoclínicas, são compatíveis com as informações da literatura.

Outras características que não reafirmam dados da literatura ou que estão ausentes nesse estudo

podem ter correlação com o número reduzido de amostras, como por exemplo a ausência de outras raças, idades, localizações e subtipos histopatológicos.

Devido à escassez da literatura relacionada as proteínas diferencialmente identificadas entre os sexos no osteossarcoma canino e de humano, bem como em outras neoplasias dos cães, no nosso estudo, a discussão foi baseada principalmente na literatura de câncer em humano e, predominantemente, relacionada a expressão gênica.

As nove proteínas identificadas (Tabela 2) estavam em maior abundância no grupo dos machos em comparação ao grupo das fêmeas, demonstrando que eventualmente possam estar relacionadas a maior incidência do OS em cães machos. A maioria destas proteínas estão relacionadas em última instância, de maneira ampla, ao favorecimento da progressão tumoral, evasão do sistema imune, invasão, migração e disseminação metastática como revisado a seguir.

A expressão reduzida de HSPA8 é benéfica para supressão da proliferação de células cancerosas e atua também na modulação da viabilidade e da autofagia destas células.^[70] A alta expressão de HSPA8 já foi identificada em carcinoma hepatocelular e carcinoma endometrial, estando envolvida no crescimento celular^[67,71] e regulando a autofagia.^[72]

O alto nível de HSPA8 foi considerado um biomarcador em potencial para o câncer endometrial em mulheres^[67] e um fator prognóstico para baixa sobrevida total em leucemia mieloide aguda.^[68] Também foram encontrados altos níveis de HSPA8 no plasma sanguíneo de pacientes humanos com câncer de pulmão.^[69]

Em um estudo comparativo entre cultura celular 2D e 3D de osteossarcoma canino, não se demonstrou a superregulação esperada das proteínas de resposta de estresse celular hsp70 e hsp90 nas culturas 3D. Inclusive, houve infrarregulação de algumas proteínas (HSPA8, HSPA9).^[73] Este fato, relacionado as disparidades proteicas encontradas no nosso estudo, incita

questionamentos na comparação entre sexos nas diferentes linhagens celulares utilizadas na pesquisa, visto que a linhagem utilizada pelos autores citados é proveniente de um osteossarcoma de uma fêmea (D-17) e que a expressão destas proteínas foi maior no grupo dos machos.

Há poucos artigos sobre TUBA4A no câncer e apenas câncer de pulmão^[74-76] e de bexiga foram mencionados, podendo ser um biomarcador prognóstico em potencial.^[69]

DDRGK *domain-containing protein 1* (DDRGK1) é um componente do sistema *ufmylation* e sua ausência induz estresse extenso no retículo endoplasmático. Há evidências, de que o sistema *ufmylation* esteja correlacionado com a autofagia.^[77] Além disso, em cânceres gástricos, a baixa expressão de DDRGK1 indica mau prognóstico.^[78]

ACY-1 é uma enzima ligante de zinco que hidrolisa aminoácidos N-acetil em aminoácidos livres e ácido acético, e é expressa em altos níveis em diversos cânceres, como no câncer hepático, estando associada a proliferação tumoral, invasão e metástase.^[79,80] ACY1 regula a sinalização de PTEN/PI3K/AKT promovendo a progressão de câncer de pulmão de células não pequenas^[81] e do câncer colorretal^[82], porém a supressão no carcinoma hepatocelular.^[83]

SYNCRIP possui papel essencial no splicing de mRNA, edição, transporte e maturação.^[84-87] E tem sido proposto como um gene candidato para desordens neurodesenvolvimentais com espectro de autismo, deficiência intelectual e epilepsia.^[88] Porém sem descrições do seu papel na carcinogênese e comportamento biológico dos cânceres.

COL12A1 estava superexpressa e envolvida no desenvolvimento de câncer colorretal.^[89] A expressão de COL12A1 estava aumentada no câncer gástrico e os níveis

elevados relacionados com características clínicas agressivas^[90], promovendo em sinergia com o IDO1 a disseminação metastática de câncer gástrico.^[91]

A alta expressão de COL12A1 está correlacionada a metástase nodal e pior sobrevida geral em pacientes com tumor de mama rico em HER2. Além disso, COL12A1 está positivamente correlacionado com macrófagos M2 e ao *checkpoint imune programmed cell death 1 ligand 2* (PDCD1LG2) e negativamente correlacionado com a ativação de células natural killer (NK) e células T (CD8)+ em câncer de mama HER2-positivo, desta forma atuando como possível biomarcador de mau prognóstico em câncer de mama rico em HER2 e se correlacionando com a infiltração imunitária em câncer de mama HER2-positivo.^[92]

Proteína ST13 pode facilitar a função de chaperona da Hsc/Hsp70 para controlar as atividades de proteínas regulatórias como os receptores de esteroide, regular a proliferação ou apoptose e reparação e dobramento proteico.^[93,94] Os níveis de mRNA *ST13* e da proteína são baixos em câncer colorretal.^[95,96] E a expressão proteica elevada de ST13 suprimiu a proliferação de células SW620 de câncer colorretal, induzindo a apoptose.^[97] Os mecanismos pelos quais ST13 atua são pouco elucidados e a disparidade encontrada no presente estudo reforça a necessidade do entendimento de seus mecanismos e níveis de expressão em diferentes neoplasias.

PRAF2 é uma proteína de domínio residente do retículo endoplasmático (RE), atuando como a principal guardiã do GABAB^[98] e mediadora do transporte entre retículo endoplasmático e Golgi.^[99] PRAF2 é altamente expresso em tecidos normais como no pulmão e cérebro de humanos.^[100]

PRAF2 é considerada um oncogene, uma vez que é frequentemente superexpressa^[101], sendo correlacionada com características clínicas com prognóstico desfavorável em gliomas

malignos e neuroblastomas, por impedir a apoptose^[102] ou estimular o crescimento celular e migração.^[103] Entretanto, relata-se que a superexpressão de PRAF2 induziu apoptose em U2OS (linhagem de células de osteossarcoma de humano), podendo atuar como um gene supressor tumoral.^[104] E também, sua expressão afeta a sobrevida de paciente com carcinoma hepatocelular^[105] em carcinomas de células escamosas de esôfago^[106], também relacionada ao estágio TNM e metástase nodal regional em câncer de mama, promovendo a proliferação celular e invasão.^[107]

Em suma, boa parte das proteínas aqui identificadas não foram estudadas em OS de humanos e nem de cães, ou fazem parte de escassos estudos. Portanto, devido à escassez literária sobre as proteínas identificadas em cânceres de cães, investigações devem ser conduzidas para elucidação das funções destas na biologia tumoral nos osteossarcomas caninos, inclusive na resposta as terapias e no prognóstico.

Ainda, para melhor interpretação do presente estudo, algumas considerações sobre as limitações devem ser feitas. A amostragem limitada interfere com a representatividade das diferentes raças, localizações, idades, subtipos e graus histopatológicos. Ademais, o presente estudo não levou em consideração fatores ambientais e condição reprodutiva dos animais (castrados ou não), o que pode influenciar na carcinogênese.

Deve-se atentar que o presente estudo representa as proteínas presentes no tumor como um todo (células cancerosas, estroma e microambiente) e não exclusivamente nas células cancerosas, demandando cautela em comparações com experimentos *in vitro*.

Por fim, o presente trabalho deve servir para evidenciar disparidades moleculares entre os sexos no osteossarcoma canino e para embasar estudos futuros sobre tais diferenças nos

cânceres em animais domésticos, bem como para destacar a relevância da incorporação do sexo na pesquisa, como modo de melhorar a reprodutibilidade, rigor e qualidade científica.

Referências

- [1] Brodey RS, Riser WH. Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. *Clin Orthop Relat Res.* 1969; 62:54–64. | PMID: 5251443.
- [2] Dernell WS. Tumours of the skeletal system. In: Dobson JM, Lascelles BDX, editors. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*, British Small Animal Veterinary Association, 2011, p. 159–77. DOI:10.22233/9781905319749.13
- [3] Egenvall A, Nødtvedt A, von Euler H. Bone tumors in a population of 400 000 insured Swedish dogs up to 10 y of age: incidence and survival. *Can J Vet Res.* 2007; 71:292–9. | PMID: 17955904; PMCID: PMC1940277.
- [4] Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science.* 2015; 347:78–81. DOI:10.1126/science.1260825 | PMID: 25554788; PMCID: PMC4446723.
- [5] Thompson KG, Dittmer KE. Tumors of Bone. *Tumors in Domestic Animals*, John Wiley & Sons, Ltd, 2016, p. 356–424. DOI:10.1002/9781119181200.ch10
- [6] Morello E, Martano M, Buracco P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: Similarities and differences with human osteosarcoma. *The Veterinary Journal.* 2011; 189:268–77. DOI:10.1016/j.tvjl.2010.08.014
- [7] Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol.* 2006; 125:555–81. DOI:10.1309/UC6K-QHLD-9LV2-KENN | PMID: 16627266.
- [8] McCarthy EF. Histological grading of primary bone tumors. *Skeletal Radiol.* 2009; 38:947–8. DOI:10.1007/s00256-009-0776-9
- [9] Kirpensteijn J, Kik M, Rutteman GR, Teske E. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Vet Pathol.* 2002; 39:240–6. DOI:10.1354/vp.39-2-240 | PMID: 12009062.
- [10] Loukopoulos P, Robinson WF. Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. *J Comp Pathol.* 2007; 136:65–73. DOI:10.1016/j.jcpa.2006.11.005 | PMID: 17270206.
- [11] Straw R, Powers B, Klausner J, Henderson R, Morrison W, McCaw D, Harvey H, Jacobs R, Berg R. Canine mandibular osteosarcoma: 51 cases (1980-1992). *Journal of the American Animal Hospital Association.* 1996; 32:257–62. DOI:10.5326/15473317-32-3-257
- [12] Misdorp W, Hart AA. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst.* 1979; 62:537–45. DOI:10.1093/jnci/62.3.537 | PMID: 283283.
- [13] Hammer AS, Weeren FR, Weisbrode SE, Padgett SL. Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1995; 31:321–6. DOI:10.5326/15473317-31-4-321 | PMID: 7552665.
- [14] Al-Khan AA, Nimmo JS, Day MJ, Tayebi M, Ryan SD, Kuntz CA, Simcock JO, Tarzi R, Saad ES, Richardson SJ, Danks JA. Fibroblastic Subtype has a Favourable Prognosis in Appendicular Osteosarcoma of Dogs. *J Comp Pathol.* 2020; 176:133–44. DOI:10.1016/j.jcpa.2020.02.011 | PMID: 32359626.
- [15] Barger A, Graca R, Bailey K, Messick J, de Lorimier L-P, Fan T, Hoffmann W. Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-

- positive tumors. *Vet Pathol.* 2005; 42:161–5. DOI:10.1354/vp.42-2-161 | PMID: 15753469.
- [16] Ryseff JK, Bohn AA. Detection of alkaline phosphatase in canine cells previously stained with Wright–Giemsa and its utility in differentiating osteosarcoma from other mesenchymal tumors. *Veterinary Clinical Pathology.* 2012; 41:391–5. DOI:10.1111/j.1939-165X.2012.00445.x
- [17] Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res.* 2007; 27:155–64. | PMID: 17352227.
- [18] Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer.* 2009; 115:1531–43. DOI:10.1002/cncr.24121 | PMID: 19197972; PMCID: PMC2813207.
- [19] Anfinson KP, Devesa SS, Bray F, Troisi R, Jonasdottir TJ, Bruland OS, Grotmol T. Age-period-cohort analysis of primary bone cancer incidence rates in the United States (1976-2005). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20:1770–7. DOI:10.1158/1055-9965.EPI-11-0136 | PMID: 21724855.
- [20] Trost ME, Kommers GD, Brown CC, Barros CSL, Irigoyen LF, Figuera RA, Inkelmann MA, Silva TM da. Primary bone neoplasms in dogs: 90 cases. *Pesq Vet Bras.* 2012; 32:1329–35. DOI:10.1590/S0100-736X2012001200018
- [21] Selvarajah GT, Kirpensteijn J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *Vet J.* 2010; 185:28–35. DOI:10.1016/j.tvjl.2010.04.010 | PMID: 20493743.
- [22] Heyman SJ, Diefenderfer DL, Goldschmidt MH, Newton CD. Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). *Vet Surg.* 1992; 21:304–10. DOI:10.1111/j.1532-950x.1992.tb00069.x | PMID: 1455640.
- [23] Ling GV, Morgan JP, Pool RR. Primary bone tumors in the dog: a combined clinical, radiographic, and histologic approach to early diagnosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1974; 165:55–67. | PMID: 4600463.
- [24] Morgan JP, Med V, Ackerman N, Bailey CS, Pool RR. Vertebral Tumors in the Dog: A Clinical Radiologic, and Pathologic Study of 61 Primary and Secondary Lesions. *Veterinary Radiology.* 1980; 21:197–212. DOI:10.1111/j.1740-8261.1980.tb01684.x
- [25] Withrow SJ, Page R, Vail DM. *Withrow and MacEwen’s Small Animal Clinical Oncology.* Elsevier Health Sciences, 2012
- [26] Selmic LE, Ryan SD, Ehrhart NP, Withrow SJ. Bilateral appendicular bone tumors in four dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2013; 49:135–41. DOI:10.5326/JAAHA-MS-5828 | PMID: 23325591.
- [27] Spodnick GJ, Berg J, Rand WM, Schelling SH, Couto G, Harvey HJ, Henderson RA, MacEwen G, Mauldin N, McCaw DL. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). *J Am Vet Med Assoc.* 1992; 200:995–9. | PMID: 1577656.
- [28] Brodey RS, Abt DA. Results of surgical treatment in 65 dogs with osteosarcoma. *J Am Vet Med Assoc.* 1976; 168:1032–5. | PMID: 1064592.
- [29] Hillers KR, Dernell WS, Lafferty MH, Withrow SJ, Lana SE. Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986-2003). *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 226:1364–7. DOI:10.2460/javma.2005.226.1364 | PMID: 15844430.

- [30] Schott CR, Tatierysky LJ, Foster RA, Wood GA. Histologic Grade Does Not Predict Outcome in Dogs with Appendicular Osteosarcoma Receiving the Standard of Care. *Vet Pathol.* 2018; 55:202–11. DOI:10.1177/0300985817747329 | PMID: 29284372.
- [31] Fenger JM, London CA, Kisseberth WC. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *ILAR J.* 2014; 55:69–85. DOI:10.1093/ilar/ilu009 | PMID: 24936031.
- [32] Wycislo KL, Fan TM. The immunotherapy of canine osteosarcoma: a historical and systematic review. *J Vet Intern Med.* 2015; 29:759–69. DOI:10.1111/jvim.12603 | PMID: 25929293; PMCID: PMC4895426.
- [33] Dai P, He Y, Luo G, Deng J, Jiang N, Fang T, Li Y, Cheng Y. Screening candidate microRNA-mRNA network for predicting the response to chemoresistance in osteosarcoma by bioinformatics analysis. *J Cell Biochem.* 2019; 120:16798–810. DOI:10.1002/jcb.28938 | PMID: 31090103.
- [34] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:89–95. DOI:10.1067/mcp.2001.113989 | PMID: 11240971.
- [35] Luu AK, Wood GA, Vilorio-Petit AM. Recent Advances in the Discovery of Biomarkers for Canine Osteosarcoma. *Front Vet Sci.* 2021; 8:734965. DOI:10.3389/fvets.2021.734965 | PMID: 34660770; PMCID: PMC8517113.
- [36] Heishima K, Meuten T, Yoshida K, Mori T, Thamm DH. Prognostic significance of circulating microRNA-214 and -126 in dogs with appendicular osteosarcoma receiving amputation and chemotherapy. *BMC Veterinary Research.* 2019; 15:39. DOI:10.1186/s12917-019-1776-1
- [37] Shekhar R, Priyanka P, Kumar P, Ghosh T, Khan MM, Nagarajan P, Saxena S. The microRNAs miR-449a and miR-424 suppress osteosarcoma by targeting cyclin A2 expression. *J Biol Chem.* 2019; 294:4381–400. DOI:10.1074/jbc.RA118.005778 | PMID: 30679313; PMCID: PMC6433048.
- [38] Özdemir BC, Dotto G-P. Sex Hormones and Anticancer Immunity. *Clinical Cancer Research.* 2019; 25:4603–10. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-19-0137
- [39] Kim H-I, Lim H, Moon A. Sex Differences in Cancer: Epidemiology, Genetics and Therapy. *Biomol Ther (Seoul).* 2018; 26:335–42. DOI:10.4062/biomolther.2018.103 | PMID: 29949843; PMCID: PMC6029678.
- [40] Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, Vargas-Chanes D, Nair S, Cha SS, Novotny PJ, Poon MA, O'Connell MJ, Loprinzi CL. Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2002; 20:1491–8. DOI:10.1200/JCO.2002.20.6.1491 | PMID: 11896096.
- [41] Lim H, Kim SY, Lee E, Lee S, Oh S, Jung J, Kim KS, Moon A. Sex-Dependent Adverse Drug Reactions to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *Biol Pharm Bull.* 2019; 42:594–600. DOI:10.1248/bpb.b18-00707 | PMID: 30930418.
- [42] Dorak MT, Karpuzoglu E. Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. *Front Genet.* 2012; 3:268. DOI:10.3389/fgene.2012.00268 | PMID: 23226157; PMCID: PMC3508426.
- [43] Straface E, Gambardella L, Brandani M, Malorni W. Sex differences at cellular level: “cells have a sex.” *Handb Exp Pharmacol.* 2012:49–65. DOI:10.1007/978-3-642-30726-3_3 | PMID: 23027445.

- [44] Clocchiatti A, Cora E, Zhang Y, Dotto GP. Sexual dimorphism in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16:330–9. DOI:10.1038/nrc.2016.30 | PMID: 27079803.
- [45] Massimini M, Palmieri C, De Maria R, Romanucci M, Malatesta D, De Martinis M, Maniscalco L, Ciccarelli A, Ginaldi L, Buracco P, Bongiovanni L, Della Salda L. 17-AAG and Apoptosis, Autophagy, and Mitophagy in Canine Osteosarcoma Cell Lines. *Vet Pathol*. 2017; 54:405–12. DOI:10.1177/0300985816681409 | PMID: 28438108.
- [46] Lista P, Straface E, Brunelleschi S, Franconi F, Malorni W. On the role of autophagy in human diseases: a gender perspective. *J Cell Mol Med*. 2011; 15:1443–57. DOI:10.1111/j.1582-4934.2011.01293.x | PMID: 21362130; PMCID: PMC3823190.
- [47] Cook MB, Dawsey SM, Freedman ND, Inskip PD, Wichner SM, Quraishi SM, Devesa SS, McGlynn KA. Sex disparities in cancer incidence by period and age. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18:1174–82. DOI:10.1158/1055-9965.EPI-08-1118 | PMID: 19293308; PMCID: PMC2793271.
- [48] Ortona E, Pierdominici M, Rider V. Editorial: Sex Hormones and Gender Differences in Immune Responses. *Front Immunol*. 2019; 10:1076. DOI:10.3389/fimmu.2019.01076 | PMID: 31156632; PMCID: PMC6530401.
- [49] Irelli A, Sirufo MM, D’Ugo C, Ginaldi L, De Martinis M. Sex and Gender Influences on Cancer Immunotherapy Response. *Biomedicines*. 2020; 8:232. DOI:10.3390/biomedicines8070232 | PMID: 32708265; PMCID: PMC7400663.
- [50] Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L, Drake TA, Lusis AJ. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res*. 2006; 16:995–1004. DOI:10.1101/gr.5217506 | PMID: 16825664; PMCID: PMC1524872.
- [51] Rong Z, Fan T, Li H, Li J, Wang K, Wang X, Dong J, Chen J, Wang F, Wang J, Wang A. Differential Proteomic Analysis of Gender-dependent Hepatic Tumorigenesis in Hras12V Transgenic Mice. *Mol Cell Proteomics*. 2017; 16:1475–90. DOI:10.1074/mcp.M116.065474 | PMID: 28512230; PMCID: PMC5546199.
- [52] Villamil JA, Henry CJ, Hahn AW, Bryan JN, Tyler JW, Caldwell CW. Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol*. 2009; 2009:591753. DOI:10.1155/2009/591753 | PMID: 20445802; PMCID: PMC2859020.
- [53] Edgren G, Liang L, Adami H-O, Chang ET. Enigmatic sex disparities in cancer incidence. *Eur J Epidemiol*. 2012; 27:187–96. DOI:10.1007/s10654-011-9647-5 | PMID: 22212865.
- [54] Shin JY, Jung HJ, Moon A. Molecular Markers in Sex Differences in Cancer. *Toxicol Res*. 2019; 35:331–41. DOI:10.5487/TR.2019.35.4.331 | PMID: 31636844; PMCID: PMC6791665.
- [55] Arnold AP, Lusis AJ. Understanding the Sexome: Measuring and Reporting Sex Differences in Gene Systems. *Endocrinology*. 2012; 153:2551–5. DOI:10.1210/en.2011-2134 | PMID: 22434084; PMCID: PMC3359607.
- [56] Timpe LC, Li D, Yen T-Y, Wong J, Yen R, Macher BA, Piryatinska A. Mining the Breast Cancer Proteome for Predictors of Drug Sensitivity. *J Proteomics Bioinform*. 2015; 8:204–11. DOI:10.4172/jpb.1000370 | PMID: 26516301; PMCID: PMC4621756.
- [57] Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, Gillette MA, Clauser KR, Wang P, Wang X, Qiao JW, Cao S, Petralia F, Kawaler E, Mundt F, Krug K, Tu Z, Lei JT, Gatz ML, Wilkerson M, Perou CM, Yellapantula V, Huang K, Lin C, McLellan MD, Yan P, Davies SR, Townsend RR, Skates SJ, Wang J, Zhang B, Kinsinger CR, Mesri M, Rodriguez H, Ding

- L, Paulovich AG, Fenyö D, Ellis MJ, Carr SA, NCI CPTAC. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*. 2016; 534:55–62. DOI:10.1038/nature18003 | PMID: 27251275; PMCID: PMC5102256.
- [58] Zhang H, Liu T, Zhang Z, Payne SH, Zhang B, McDermott JE, Zhou J-Y, Petyuk VA, Chen L, Ray D, Sun S, Yang F, Chen L, Wang J, Shah P, Cha SW, Aiyetan P, Woo S, Tian Y, Gritsenko MA, Clauss TR, Choi C, Monroe ME, Thomas S, Nie S, Wu C, Moore RJ, Yu K-H, Tabb DL, Fenyö D, Bafna V, Wang Y, Rodriguez H, Boja ES, Hiltke T, Rivers RC, Sokoll L, Zhu H, Shih I-M, Cope L, Pandey A, Zhang B, Snyder MP, Levine DA, Smith RD, Chan DW, Rodland KD, CPTAC Investigators. Integrated Proteogenomic Characterization of Human High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cell*. 2016; 166:755–65. DOI:10.1016/j.cell.2016.05.069 | PMID: 27372738; PMCID: PMC4967013.
- [59] Hoffman JM, O’Neill DG, Creevy KE, Austad SN. Do Female Dogs Age Differently Than Male Dogs? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018; 73:150–6. DOI:10.1093/gerona/glx061 | PMID: 28472238; PMCID: PMC5861885.
- [60] Grüntzig K, Graf R, Boo G, Guscetti F, Hässig M, Axhausen KW, Fabrikant S, Welle M, Meier D, Folkers G, Pospischil A. Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. *J Comp Pathol*. 2016; 155:156–70. DOI:10.1016/j.jcpa.2016.05.011 | PMID: 27406312.
- [61] Slayter MV, editor. *Histological classification of bone and joint tumors of domestic animals*. Washington, DC: Armed Forces Inst. of Pathology, 1994
- [62] Peach M, Marsh N, Macphee DJ. Protein solubilization: attend to the choice of lysis buffer. *Methods Mol Biol*. 2012; 869:37–47. DOI:10.1007/978-1-61779-821-4_4 | PMID: 22585475.
- [63] Souza F, Chirinéa V, Martins M, Lopes M. Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009; 44:283–6. DOI:10.1111/j.1439-0531.2009.01447.x
- [64] Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein methods*. 2nd ed New York: Wiley-Liss, 1996
- [65] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996; 68:850–8. DOI:10.1021/ac950914h | PMID: 8779443.
- [66] Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, Moresco JJ, Yates JR, Barbosa VC. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc*. 2016; 11:102–17. DOI:10.1038/nprot.2015.133
- [67] Shan N, Zhou W, Zhang S, Zhang Y. Identification of HSPA8 as a candidate biomarker for endometrial carcinoma by using iTRAQ-based proteomic analysis. *Oncotargets Ther*. 2016; 9:2169–79. DOI:10.2147/OTT.S97983 | PMID: 27110132; PMCID: PMC4835145.
- [68] Li J, Ge Z. High HSPA8 expression predicts adverse outcomes of acute myeloid leukemia. *BMC Cancer*. 2021; 21:475. DOI:10.1186/s12885-021-08193-w | PMID: 33926391; PMCID: PMC8086305.
- [69] Novikova SE, Soloveva NA, Farafonova TE, Tikhonova OV, Liao P-C, Zgoda VG. Proteomic Signature of Extracellular Vesicles for Lung Cancer Recognition. *Molecules*.

- 2021; 26:6145. DOI:10.3390/molecules26206145 | PMID: 34684727; PMCID: PMC8539600.
- [70] Nirdé P, Derocq D, Maynadier M, Chambon M, Basile I, Gary-Bobo M, Garcia M. Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. *Oncogene*. 2010; 29:117–27. DOI:10.1038/onc.2009.311 | PMID: 19802014; PMCID: PMC2864961.
- [71] Xiang X, You X-M, Li L-Q. Expression of HSP90AA1/HSPA8 in hepatocellular carcinoma patients with depression. *OTT*. 2018; Volume 11:3013–23. DOI:10.2147/OTT.S159432
- [72] Tian Y, Xu H, Farooq AA, Nie B, Chen X, Su S, Yuan R, Qiao G, Li C, Li X, Liu X, Lin X. Maslinic acid induces autophagy by down-regulating HSPA8 in pancreatic cancer cells. *Phytotherapy Research*. 2018; 32:1320–31. DOI:10.1002/ptr.6064
- [73] Gebhard C, Miller I, Hummel K, Neschi Née Ondrovics M, Schlosser S, Walter I. Comparative proteome analysis of monolayer and spheroid culture of canine osteosarcoma cells. *J Proteomics*. 2018; 177:124–36. DOI:10.1016/j.jprot.2018.01.006 | PMID: 29337282.
- [74] Xu Y-F, Ren X-Y, Li Y-Q, He Q-M, Tang X-R, Sun Y, Shao J-Y, Jia W-H, Kang T-B, Zeng M-S, Liu N, Ma J. High expression of Talin-1 is associated with poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2015; 15:332. DOI:10.1186/s12885-015-1351-5 | PMID: 25925041; PMCID: PMC4424526.
- [75] Lai M-T, Hua C-H, Tsai M-H, Wan L, Lin Y-J, Chen C-M, Chiu I-W, Chan C, Tsai F-J, Jinn-Chyuan Sheu J. Talin-1 overexpression defines high risk for aggressive oral squamous cell carcinoma and promotes cancer metastasis. *J Pathol*. 2011; 224:367–76. DOI:10.1002/path.2867 | PMID: 21547905.
- [76] Fang K-P, Dai W, Ren Y-H, Xu Y-C, Zhang S-M, Qian Y-B. Both Talin-1 and Talin-2 correlate with malignancy potential of the human hepatocellular carcinoma MHCC-97 L cell. *BMC Cancer*. 2016; 16:45. DOI:10.1186/s12885-016-2076-9 | PMID: 26822056; PMCID: PMC4730717.
- [77] Cao Y, Li R, Shen M, Li C, Zou Y, Jiang Q, Liu S, Lu C, Li H, Liu H, Cai Y. DDRGK1, a crucial player of ufmylation system, is indispensable for autophagic degradation by regulating lysosomal function. *Cell Death Dis*. 2021; 12:416. DOI:10.1038/s41419-021-03694-9 | PMID: 33879777; PMCID: PMC8058061.
- [78] Lin J-X, Xie X-S, Weng X-F, Zheng C-H, Xie J-W, Wang J-B, Lu J, Chen Q-Y, Cao L-L, Lin M, Tu R-H, Li P, Huang C-M. Low expression of CDK5RAP3 and DDRGK1 indicates a poor prognosis in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2018; 24:3898–907. DOI:10.3748/wjg.v24.i34.3898 | PMID: 30228783; PMCID: PMC6141336.
- [79] Balamurugan TST, Huang C-H, Chang P-C, Huang S-T. Electrochemical Molecular Switch for the Selective Profiling of Cysteine in Live Cells and Whole Blood and for the Quantification of Aminoacylase-1. *Anal Chem*. 2018; 90:12631–8. DOI:10.1021/acs.analchem.8b02799 | PMID: 30350617.
- [80] Caira S, Iannelli A, Sciarrillo R, Picariello G, Renzone G, Scaloni A, Addeo P. Differential representation of liver proteins in obese human subjects suggests novel biomarkers and promising targets for drug development in obesity. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017; 32:672–82. DOI:10.1080/14756366.2017.1292262 | PMID: 28274171; PMCID: PMC6009959.

- [81] Xu Z, Hu Y, Yu Z. Effect of the ACY-1 gene on HER2 and TRAIL expression in rectal carcinoma. *Exp Ther Med*. 2021; 22:817. DOI:10.3892/etm.2021.10249 | PMID: 34131440; PMCID: PMC8193208.
- [82] Shi H, Hayes MT, Kirana C, Miller RJ, Keating JP, Stubbs RS. Overexpression of aminoacylase 1 is associated with colorectal cancer progression. *Hum Pathol*. 2013; 44:1089–97. DOI:10.1016/j.humpath.2012.09.015 | PMID: 23317546.
- [83] Wei X, Li J, Xie H, Ling Q, Wang J, Lu D, Zhou L, Xu X, Zheng S. Proteomics-based identification of the tumor suppressor role of aminoacylase 1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2014; 351:117–25. DOI:10.1016/j.canlet.2014.05.001 | PMID: 24846301.
- [84] Blanc V, Navaratnam N, Henderson JO, Anant S, Kennedy S, Jarmuz A, Scott J, Davidson NO. Identification of GRY-RBP as an apolipoprotein B RNA-binding protein that interacts with both apobec-1 and apobec-1 complementation factor to modulate C to U editing. *J Biol Chem*. 2001; 276:10272–83. DOI:10.1074/jbc.M006435200 | PMID: 11134005.
- [85] Cappelli S, Romano M, Buratti E. Systematic Analysis of Gene Expression Profiles Controlled by hnRNP Q and hnRNP R, Two Closely Related Human RNA Binding Proteins Implicated in mRNA Processing Mechanisms. *Front Mol Biosci*. 2018; 5:79. DOI:10.3389/fmolb.2018.00079 | PMID: 30214903; PMCID: PMC6125337.
- [86] Chen Y, Chan J, Chen W, Li J, Sun M, Kannan GS, Mok Y-K, Yuan YA, Jobichen C. SYNCRIP, a new player in pri-let-7a processing. *RNA*. 2020; 26:290–305. DOI:10.1261/rna.072959.119 | PMID: 31907208; PMCID: PMC7025501.
- [87] Titlow J, Robertson F, Järvelin A, Ish-Horowitz D, Smith C, Gratton E, Davis I. Syncrip/hnRNP Q is required for activity-induced Msp300/Nesprin-1 expression and new synapse formation. *J Cell Biol*. 2020; 219:e201903135. DOI:10.1083/jcb.201903135 | PMID: 32040548; PMCID: PMC7055005.
- [88] Semino F, Schröter J, Willemsen MH, Bast T, Biskup S, Beck-Woedl S, Brennenstuhl H, Schaaf CP, Kölker S, Hoffmann GF, Haack TB, Syrbe S. Further evidence for de novo variants in SYNCRIP as the cause of a neurodevelopmental disorder. *Hum Mutat*. 2021; 42:1094–100. DOI:10.1002/humu.24245 | PMID: 34157790.
- [89] Hauptman N, Boštjančič E, Žlajpah M, Ranković B, Zidar N. Bioinformatics Analysis Reveals Most Prominent Gene Candidates to Distinguish Colorectal Adenoma from Adenocarcinoma. *Biomed Res Int*. 2018; 2018:9416515. DOI:10.1155/2018/9416515 | PMID: 30175151; PMCID: PMC6106857.
- [90] Jiang X, Wu M, Xu X, Zhang L, Huang Y, Xu Z, He K, Wang H, Wang H, Teng L. COL12A1, a novel potential prognostic factor and therapeutic target in gastric cancer. *Mol Med Rep*. 2019; 20:3103–12. DOI:10.3892/mmr.2019.10548 | PMID: 31432110; PMCID: PMC6755194.
- [91] Xiang Z, Li J, Song S, Wang J, Cai W, Hu W, Ji J, Zhu Z, Zang L, Yan R, Yu Y. A positive feedback between IDO1 metabolite and COL12A1 via MAPK pathway to promote gastric cancer metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019; 38:314. DOI:10.1186/s13046-019-1318-5 | PMID: 31315643; PMCID: PMC6637527.
- [92] COL12A1 as a prognostic biomarker in HER2-enriched breast cancer and its association with immune infiltration. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2022. DOI:10.22514/ejgo.2022.045

- [93] Irmer H, Höhfeld J. Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone Hip. *J Biol Chem.* 1997; 272:2230–5. DOI:10.1074/jbc.272.4.2230 | PMID: 8999928.
- [94] Shi Z, Zhang J, Zheng S. What we know about ST13, a co-factor of heat shock protein, or a tumor suppressor? *J Zhejiang Univ Sci B.* 2007; 8:170–6. DOI:10.1631/jzus.2007.B0170 | PMID: 17323428; PMCID: PMC1810382.
- [95] Dong Q, Zheng S, Hu Y, Chen G, Ding J-Y. Evaluation of ST13 gene expression in colorectal cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005; 6:1170–5. DOI:10.1631/jzus.2005.B1170 | PMID: 16358374; PMCID: PMC1390639.
- [96] Wang L-B, Zheng S, Zhang S-Z, Peng J-P, Ye F, Fang S-C, Wu J-M. Expression of ST13 in colorectal cancer and adjacent normal tissues. *World J Gastroenterol.* 2005; 11:336–9. DOI:10.3748/wjg.v11.i3.336 | PMID: 15637739; PMCID: PMC4205332.
- [97] Yang M, Yu M, Guan D, Gu J, Cao X, Wang W, Zheng S, Xu Y, Shen Z, Liu X. ASK1-JNK signaling cascade mediates Ad-ST13-induced apoptosis in colorectal HCT116 cells. *J Cell Biochem.* 2010; 110:581–8. DOI:10.1002/jcb.22551 | PMID: 20512919.
- [98] Doly S, Marullo S. [PRAF2, an endoplasmic reticulum gatekeeper, controls the cell-surface export of the GABA(B) receptor in neurons]. *Med Sci (Paris).* 2015; 31:834–6. DOI:10.1051/medsci/20153110008 | PMID: 26481021.
- [99] Schweneker M, Bachmann AS, Moelling K. JM4 is a four-transmembrane protein binding to the CCR5 receptor. *FEBS Lett.* 2005; 579:1751–8. DOI:10.1016/j.febslet.2005.02.037 | PMID: 15757671.
- [100] Fo CS, Coleman CS, Wallick CJ, Vine AL, Bachmann AS. Genomic organization, expression profile, and characterization of the new protein PRA1 domain family, member 2 (PRAF2). *Gene.* 2006; 371:154–65. DOI:10.1016/j.gene.2005.12.009 | PMID: 16481131.
- [101] Borsics T, Lundberg E, Geerts D, Koomoa D-LT, Koster J, Wester K, Bachmann AS. Subcellular distribution and expression of prenylated Rab acceptor 1 domain family, member 2 (PRAF2) in malignant glioma: Influence on cell survival and migration. *Cancer Sci.* 2010; 101:1624–31. DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01570.x | PMID: 20412121.
- [102] Geerts D, Wallick CJ, Koomoa D-LT, Koster J, Versteeg R, Go RCV, Bachmann AS. Expression of prenylated Rab acceptor 1 domain family, member 2 (PRAF2) in neuroblastoma: correlation with clinical features, cellular localization, and cerulenin-mediated apoptosis regulation. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:6312–9. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-0829 | PMID: 17975142.
- [103] Yco LP, Geerts D, Koster J, Bachmann AS. PRAF2 stimulates cell proliferation and migration and predicts poor prognosis in neuroblastoma. *Int J Oncol.* 2013; 42:1408–16. DOI:10.3892/ijo.2013.1836 | PMID: 23440329.
- [104] Vento MT, Zazzu V, Loffreda A, Cross JR, Downward J, Stoppelli MP, Iaccarino I. Praf2 is a novel Bcl-xL/Bcl-2 interacting protein with the ability to modulate survival of cancer cells. *PLoS One.* 2010; 5:e15636. DOI:10.1371/journal.pone.0015636 | PMID: 21203533; PMCID: PMC3006391.
- [105] Wang C-H, Liu L-L, Liao D-Z, Zhang M-F, Fu J, Lu S-X, Chen S-L, Wang H, Cai S-H, Zhang CZ, Zhang H-Z, Yun J-P. PRAF2 expression indicates unfavorable clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2018; 10:2241–8. DOI:10.2147/CMAR.S166789 | PMID: 30100755; PMCID: PMC6065608.

- [106] Qian Z, Wei B, Zhou Y, Wang Q, Wang J, Sun Y, Gao Y, Chen X. PRAF2 overexpression predicts poor prognosis and promotes tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2019; 19:585. DOI:10.1186/s12885-019-5818-7 | PMID: 31200670; PMCID: PMC6570937.
- [107] Wang Y, Zhao Z, Jiao W, Yin Z, Zhao W, Bo H, Bi Z, Dong B, Chen B, Wang Z. PRAF2 is an oncogene acting to promote the proliferation and invasion of breast cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2022; 24:1–11. DOI:10.3892/etm.2022.11674

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações finais

Houve êxito na identificação de disparidades proteicas nos osteosarcomas caninos nos diferentes sexos. Além disso, o presente estudo aborda um tema atual e em expansão na medicina humana: as disparidades moleculares nos cânceres entre os sexos. Entretanto, há poucos experimentos que abordem o assunto nos animais domésticos. Sendo, as percepções moleculares das proteínas diferencialmente expressas entre os sexos em tecido *ex vivo* de osteossarcomas apendiculares caninos, investigados através da espectrometria de massas, um assunto inexplorado na literatura disponível, no conhecimento do grupo de pesquisa, se mostrando, portanto, um trabalho pioneiro.

Vale ressaltar também que, devido ao curto espaço de tempo em que as amostras deveriam ser coletadas após a exérese ou óbito do animal (até 30 minutos), algumas coletas não eram viáveis, principalmente em clínicas externas e de outras cidades, o que dificultou a obtenção de maior número de casos.

Não obstante, as restrições impostas pela pandemia da COVID 19 também restringiram o espaço de tempo para obtenção de maior número de amostras, visto o fechamento do Hospital Veterinário e a restrição no número de atendimentos após sua reabertura. Da mesma forma, o acesso a clínicas particulares também foi prejudicado, bem como o acesso aos laboratórios onde outras análises seriam realizadas, como a análise de PCR, e incertezas na obtenção dos insumos, das quais os prazos de entrega eram incertos ou demasiadamente prolongados.

Aos colaboradores do projeto, agradeço imensamente a solicitude e disponibilidade, que mesmo com os desafios impostos pela pandemia da COVID 19, foram fundamentais para a entrega dos resultados.