

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/07/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PROTEÔMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO DE  
CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS**

GABRIELA CARNEIRO DE SOUSA

BOTUCATU, SÃO PAULO  
JULHO, 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PROTEÔMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO DE  
CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS**

Dissertação apresentada junto ao Programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia Animal para  
obtenção do título de Mestre

Gabriela Carneiro de Sousa

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira de  
Souza

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca  
Alves

BOTUCATU, SÃO PAULO  
JULHO, 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB

Sousa, Gabriela Carneiro de.

Proteômica de vesículas extracelulares do soro de  
cadelas com neoplasias mamárias / Gabriela Carneiro de  
Sousa. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza

Coorientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Capes: 50504002

1. Biópsia Líquida. 2. Exossomos. 3. Oncologia. 4.  
Proteínas. 5. Neoplasias da Mama.

Palavras-chave: Biopsia líquida; Exossomo; Oncologia;  
Proteína; Tumor de mama.

Gabriela Carneiro de Sousa

PROTEÔMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO DE CADELAS  
COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

**BANCA EXAMINADORA**

Data da defesa da dissertação: 07 de julho de 2023

**Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza**

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista,  
UNESP, Botucatu.

**Profa. Dra. Laiza Sartori Camargo**

Membro titular

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista,  
UNESP, Botucatu.

**Profa. Dra. Juliano Coelho da Silveira**

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária,

Escola de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo,  
USP, Pirassununga.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar à minha mãe, Zuleide Carneiro da Silva, pelo amor e apoio incondicional durante todos esses anos de jornada acadêmica. Agradeço também ao meu irmão Rafael Carneiro da Silva por seguir servindo como fonte de inspiração e profissional e pessoal. Ao meu pai, Geraldo Alves de Sousa, que agora, mesmo que mais distante, tenho certeza de que segue e sempre seguirá presente em minha vida e em meu coração. Sem o apoio deles, nada disso seria possível, e serei eternamente grata.

A todos os meus amigos de Goiânia e de Botucatu que compartilharam diversos momentos importantes dessa jornada comigo e que ao longo desse caminho dessa pós-graduação sempre se fizeram presentes ao meu lado, em dias bons e em dias de dificuldades, obrigada por essa amizade.

A minha orientadora: Fabiana Ferreira de Souza, pela paciência e disposição de sempre me auxiliar e por tantos os ensinamentos não só profissionais como também de vida, obrigada pela oportunidade de conviver com você durante esses anos. A todos os professores do setor de Reprodução Animal, que durante todos esses anos, contribuíram de diversas formas para minha formação profissional e pessoal e que me auxiliaram a percorrer esse trajeto da minha carreira. A FMVZ – UNESP e a todos os seus colaboradores, que nos últimos anos se tornou minha segunda casa e que sempre será parte fundamental da minha história.

Agradeço ao laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD/ZMV), USP, Pirassununga, e ao professor Juliano Coelho da Silveira pela estrutura disponibilizada e em especial a Paola Maria da Silva e Alessandro de Paula Filho, alunos de pós-graduação e graduação, respectivamente, da FZEA – USP, Pirassununga, pelo auxílio fundamental em parte do meu projeto.

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001). Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (processo # 2021/07318-2) e ao Centro Nacional de pesquisa em energia

e matérias (CNPEM), pelas análises de espectrometria de massas, fundamentais para os resultados desse trabalho.

## RESUMO

SOUSA, G.C. **PROTEÔMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS**. Botucatu, 94p, 2023 Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

As neoplasias mamárias são o tipo de tumor mais frequente em cadelas, acometendo cerca de 50% das fêmeas. A espécie é considerada modelo experimental para câncer de mama em mulheres. Em vista disso, novas abordagens buscando biomarcadores e alvos terapêuticos têm encontrado respostas promissoras no estudo de vesículas extracelulares (VEs). As VEs são nanopartículas secretadas por diversos tipos celulares, incluindo células cancerígenas, as quais carregam informações da sua célula de origem e estão envolvidas na manutenção do microambiente tumoral e metástases. O objetivo desse estudo foi investigar a relação da proteômica de VEs séricas de cadelas acometidas por neoplasias mamárias e a malignidade tumoral. Trinta cadelas foram selecionadas e divididas em 3 grupos, controle (GC, n = 10) composto por cadelas sem neoplasia; cadelas com tumores grau I e II (GI, n = 13) e grau III (GII, n = 7). Durante a exérese cirúrgica o sangue foi colhido, o soro separado e preparado para o isolamento das VEs por cromatografia por exclusão de tamanho. As VEs séricas foram caracterizadas por análise de nanopartículas, microscopia eletrônica de transmissão. A seguir as amostras foram digeridas com tripsina para proteômica com abordagem *shotgun*. A média  $\pm$  erro padrão para a idade foi (1,95  $\pm$  0,33; 10,1  $\pm$  0,60; 12,1  $\pm$  0,70 anos), e para o peso corporal (16,2  $\pm$  2,5; 17,9  $\pm$  3,6; 10,9  $\pm$  3,4 kg). Não houve diferença entre a concentração de VEs (5,5  $\times$  10<sup>12</sup>  $\pm$  4,4  $\times$  10<sup>12</sup>; 1,3  $\times$  10<sup>12</sup>  $\pm$  0,66  $\times$  10<sup>12</sup>; 1,1  $\times$  10<sup>12</sup>  $\pm$  0,88  $\times$  10<sup>12</sup> partículas/mL) e tamanho das VEs (136,2  $\pm$  6,0; 129,3  $\pm$  4,0; 125,5  $\pm$  6,1 nm) entre os GC, GI e GII, respectivamente. Os resultados de VEs isoladamente não foram capazes de diferenciar o GC dos grupos GI e GII, entretanto podem ser considerados uma importante contribuição para a caracterização, quantificação e validação de VEs sérica em cadelas saudáveis e com neoplasia mamária. Na proteômica duas proteínas sintetizadas por genes importantes na supressão de tumores em humanos a *keratin 18* e a *protocadherin 17* apresentaram diferente abundância entre os grupos, podendo assim servir como candidatas em futuros estudos que busquem identificar biomarcadores para as neoplasias mamárias em cadelas por meio das VEs.

**Palavras chaves:** oncologia, proteína, exossomo, tumor de mama, biopsia líquida

## ABSTRACT

**SOUSA, G.C. PROTEOMIC OF SERUM EXTRACELLULAR VESICLES CARGO IN BITCHES WITH MAMMARY TUMORS.** Botucatu, 94p, 2023 Dissertation (Master of Science). São Paulo State University, School of Veterinary Medicine and Animal Science.

Mammary tumors are the most frequent type of neoplasm in bitches, affecting about 50% of females. The canine species is considered an experimental model for breast cancer in women. In view of this, new approaches seeking biomarkers and therapeutical targets have found encouraging answers in the research of extracellular vesicles (EVs). EVs are nanoparticles secreted by several cell types, including cancer cells, which carry information from their cell of origin and are involved in the maintenance of the tumor microenvironment and metastases. This study aimed to investigate the association between serum EVs proteomics from bitches with mammary neoplasms and tumor malignancy. Thirty bitches were selected and divided into three groups, control (GC, n = 10) composed of bitches without tumors; bitches with grade I and II (GI, n = 13), and grade III (GII, n = 7) tumors. Blood was collected during surgical excision, and the serum was separated and prepared for isolation of EVs by size exclusion chromatography. Serum EVs were characterized by nanoparticle analysis, transmission electron microscopy. Then the samples were digested with trypsin for proteomics with a *shotgun* approach. The mean  $\pm$  standard error for age ( $1.95 \pm 0.33$ ;  $10.1 \pm 0.60$ ;  $12.1 \pm 0.70$  years) and body weight ( $16.2 \pm 2.5$ ;  $17.9 \pm 3.6$ ;  $10.9 \pm 3.4$  kg). There was no difference in the concentration of EVs ( $5.5 \times 10^{12} \pm 4.4 \times 10^{12}$ ;  $1.3 \times 10^{12} \pm 0.66 \times 10^{12}$ ;  $1.1 \times 10^{12} \pm 0.88 \times 10^{12}$  particles/mL) and EV size ( $136.2 \pm 6.0$ ;  $129.3 \pm 4.0$ ;  $125.5 \pm 6.1$  nm) between GC, GI, and GII, respectively. Our EVs results were not able to differentiate the GC from the GI and GII, however, are an important contribution for the characterization quantification and validation of serum EVs in bitches. Also, our proteomics results showed two important proteins from genes that are important for tumor suppression in humans' *keratin 18* and *protocadherin 17* that showed differences in regulation among the groups and could be a target for future studies that intent to identify and validate biomarkers for the canine mammary neoplasia.

Keywords: oncology, protein, exosome, mammary tumor, liquid biopsy

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>2</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Neoplasias mamárias</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Vesículas extracelulares</b> .....	<b>7</b>
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	<b>16</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>23</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>Reagentes</b> .....	<b>29</b>
<b>Preceitos éticos</b> .....	<b>29</b>
<b>Seleção dos animais e colheita das amostras</b> .....	<b>29</b>
<b>Histopatologia, classificação dos tumores e divisão dos grupos</b> .....	<b>30</b>
<b>Isolamento das VEs</b> .....	<b>31</b>
<b>Quantificação e caracterização das VEs</b> .....	<b>32</b>
<b>Preparo das amostras para espectrometria de massas</b> .....	<b>32</b>
<b>Análise estatística</b> .....	<b>35</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Neoplasias mamárias estão entre as neoplasias mais frequentes em cadelas, acometendo cerca de 50% das fêmeas, com relatos demonstrando até 60% de incidência a depender da população estudada (VON EULER, 2011; PASTOR et al., 2018). Cenário semelhante é observado em humanos, que de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer de mama é o mais frequente em mulheres. Cerca de 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama e 685.000 morreram em 2020, considerando todo o mundo. A neoplasia mamária em cadelas é um dos principais casos atendidos na rotina de pequenos animais com 41 a 66% dos casos classificados como malignos (SILVA et al., 2019; BURRAI et al., 2020; ARIYARATHNA et al., 2021). O diagnóstico precoce da doença tem relação com o estadiamento e prognóstico dos animais acometidos (MISDORP 2002; CASSALI et al., 2019a).

Recentes estudos na oncologia humana identificaram biomarcadores, contidos em vesículas extracelulares (VEs), para o diagnóstico precoce, estadiamento, prognóstico e monitoramento de diversos tipos de câncer, uma vez que podem refletir o estado da célula de origem (CHEN et al., 2018; TIAN et al., 2021). Além disso, estas biomoléculas são consideradas alvo terapêutico relacionados com a resistência aos quimioterápicos, assim como meios alternativos que aumentem sua efetividade intracelular (OHNO et al., 2013; VADER et al., 2016; WEINMAN et al., 2021a).

Estudos utilizando VEs ainda possuem desafios e limitações, como a dificuldade de estabelecer métodos padrões de isolamento, detecção, análise e ausência de marcadores universais específicos (LÖTVALL et al., 2014; THÉRY et al., 2018). Esses desafios estão relacionados com a heterogeneidade do tamanho e conteúdo das subpopulações de VEs e dificuldade de distinção de outras estruturas com tamanhos similares como lipoproteínas, agregados proteicos e vírus (BONGIOVANNI et al., 2021; GUAN et al., 2021).

O perfil proteico de VEs obtidas de tecidos neoplásicos foi correlacionado com o subtipo de neoplasias mamárias de mulheres, sendo um importante avanço para o diagnóstico por métodos não invasivos (RONTOGIANNI et al., 2019).

702 **Informação dos Autores**

703 \*Autor Correspondente

704 **Fabiana Ferreira de Souza**, *Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução*  
705 *Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual Paulista*  
706 *(UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.* E-mail: [fabiana.f.souza@unesp.br](mailto:fabiana.f.souza@unesp.br)

707 Autores

708 **Gabriela Carneiro de Sousa**, *Departamento de Cirurgia Veterinária e*  
709 *Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, FMVZ, Universidade*  
710 *Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.* E-mail:  
711 [gc.sousa@unesp.br](mailto:gc.sousa@unesp.br)

712 **Marcos Gomides Carvalho**, *Departamento de Cirurgia Veterinária e*  
713 *Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, FMVZ, Universidade*  
714 *Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.* E-mail:  
715 [marcos.gomides@unesp.br](mailto:marcos.gomides@unesp.br)

716 **Carlos Eduardo Fonseca Alves**, *Departamento de Cirurgia Veterinária e*  
717 *Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, FMVZ, Universidade*  
718 *Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.* E-mail:  
719 [carlos.e.alves@unesp.br](mailto:carlos.e.alves@unesp.br)

720 **Notas**

721 Os autores declaram não ter conflito de interesse.

722 **Agradecimentos**

723 Os autores agradecem apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
724 Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001) e a Fundação de  
725 Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo # 2021/07318-2)  
726 e ao Centro Nacional de pesquisa em energia e matérias (CNPEM), pela análise  
727 das amostras de proteômica.

728

729 **REFERÊNCIAS**

- 730 ADRIAN, M. et al. Cryo-electron microscopy of viruses. **Nature**, v. 308, n. 5954, p.  
731 32–36, mar. 1984. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/308032a0>>.
- 732 AGUILERA-ROJAS, M. et al. Exploration of serum- and cell culture-derived  
733 exosomes from dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2018.
- 734 ARBELAIZ, A. et al. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for  
735 primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. **Hepatology**, v. 66, n. 4, p.  
736 1125–1143, 2017.
- 737 ARIYARATHNA, H. et al. Canine mammary gland disease in New Zealand: a review  
738 of samples from 797 dogs. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 70, n. 2, p. 95–100,  
739 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00480169.2021.2004953>>.
- 740 BELL, E. T.; CHRISTIE, D. W. The use of progestagens in the control of the canine  
741 oestrous cycle\*. **Journal of Small Animal Practice**, v. 12, n. 7, p. 375–382, jul.  
742 1971. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1971.tb06244.x>>.
- 744 BIONDI, L. R. et al. Canine mammary tumors in Santos, Brazil: clinicopathological  
745 and survival profile. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal  
746 Science**, v. 51, n. 3, p. 252, 2014.
- 747 BOLLAG, D.M.; ROZYCKII, M.D.; EDELSTEIN, S. . **Protein methods**. 2nd. ed. New  
748 York: John Wiley & Sons, 1996.
- 749 BOUKOURIS, S.; MATHIVANAN, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable  
750 resource of disease biomarkers. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 9, n. 3–  
751 4, p. 358–367, abr. 2015. Disponível em:  
752 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prca.201400114>>.
- 753 BRADY, J. V. et al. A Preliminary Proteomic Investigation of Circulating Exosomes  
754 and Discovery of Biomarkers Associated with the Progression of Osteosarcoma in a  
755 Clinical Model of Spontaneous Disease. **Translational Oncology**, v. 11, n. 5, p.  
756 1137–1146, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.07.004>>.
- 757 BRANDTZAEG, P.; PRYDZ, H. Direct evidence for an integrated function of J chain  
758 and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. **Nature**, v. 311,  
759 n. 5981, p. 71–73, set. 1984. Disponível em:  
760 <<https://www.nature.com/articles/311071a0>>.
- 761 BURRAI, G. P. et al. A statistical analysis of risk factors and biological behavior in  
762 canine mammary tumors: A multicenter study. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1–12, 2020.
- 763 BUSCHMANN, D. et al. Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods  
764 for profiling miRNAs by next-generation sequencing. **Journal of Extracellular  
765 Vesicles**, v. 7, n. 1, 2018.
- 766 BUTLER, C. et al. Hypomethylating Agent Azacitidine Is Effective in Treating Brain  
767 Metastasis Triple-Negative Breast Cancer Through Regulation of DNA Methylation  
768 of Keratin 18 Gene. **Translational Oncology**, v. 13, n. 6, p. 100775, 2020.  
769 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100775>>.

- 770 CANADAS, A. et al. Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and  
771 Grading Methods in a Survival Study. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 2, p. 208–  
772 219, 2019.
- 773 CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline  
774 mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal  
775 Science**, v. 55, n. 2, p. 38–69, 2013.
- 776 CASSALI, G. D. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment  
777 of canine and feline mammary tumors-2019. **Brazilian Journal of Veterinary  
778 Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555–574, 2019a.
- 779 CASSALI, G. D. et al. Consensus Regarding the Diagnosis , Prognosis and  
780 Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. v. 13, n. 3, p. 555–574,  
781 2019b.
- 782 CHEN, I. H. et al. Analytical Pipeline for Discovery and Verification of Glycoproteins  
783 from Plasma-Derived Extracellular Vesicles as Breast Cancer Biomarkers.  
784 **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 10, p. 6307–6313, 2018.
- 785 CHOI, D. S. et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and  
786 ectosomes. **Proteomics**, v. 13, n. 10–11, p. 1554–1571, 2013.
- 787 CLAYTON, A. et al. Considerations towards a roadmap for collection, handling and  
788 storage of blood extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8, n.  
789 1, 2019.
- 790 COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular  
791 Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell  
792 and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 255–289, 11 out. 2014. Disponível em:  
793 <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>>.
- 794 DE ÁVILA, A. C. F. C. M. et al. Estrous cycle impacts microRNA content in  
795 extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during in vitro  
796 maturation. **Biology of Reproduction**, v. 102, n. 2, p. 362–375, 2020.
- 797 DE MENEZES-NETO, A. et al. Size-exclusion chromatography as a stand-alone  
798 methodology identifies novel markers in mass spectrometry analyses of plasma-  
799 derived vesicles from healthy individuals. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4,  
800 n. 1, 2015.
- 801 DOBRA, G. et al. Small extracellular vesicles isolated from serum may serve as  
802 signal-enhancers for the monitoring of CNS tumors. **International Journal of  
803 Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 1–20, 2020.
- 804 DONG, W. et al. Proteomic analysis of small extracellular vesicles from the plasma  
805 of patients with hepatocellular carcinoma. **World Journal of Surgical Oncology**, v.  
806 20, n. 1, p. 1–15, 2022. Disponível em: <[https://doi.org/10.1186/s12957-022-02849-  
807 y](https://doi.org/10.1186/s12957-022-02849-y)>.
- 808 DORN, K. V.; HUGHES, C. E.; ROHATGI, R. A Smoothed-Evc2 Complex  
809 Transduces the Hedgehog Signal at Primary Cilia. **Developmental Cell**, v. 23, n. 4,  
810 p. 823–835, out. 2012. Disponível em:

- 811 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580712003231>>.
- 812 DUMAS, J.-F.; BRISSON, L. Interaction between adipose tissue and cancer cells:  
813 role for cancer progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 40, n. 1, p. 31–46,  
814 2 mar. 2021. Disponível em: <[https://link.springer.com/10.1007/s10555-020-09934-](https://link.springer.com/10.1007/s10555-020-09934-2)  
815 2>.
- 816 EL-BENHAWY, S. A. et al. Repression of protocadherin 17 is correlated with  
817 elevated angiogenesis and hypoxia markers in female patients with breast cancer.  
818 **Cancer Biomarkers**, v. 31, n. 2, p. 139–148, 2021.
- 819 ESTEVES, S. et al. Characterization and Proteomic Analysis of Plasma EVs  
820 Recovered from Healthy and Diseased Dogs with Canine Leishmaniosis.  
821 **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5490, 2023.
- 822 FISH, E. J. et al. Malignant canine mammary epithelial cells shed exosomes  
823 containing differentially expressed microRNA that regulate oncogenic networks.  
824 **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–20, 2018.
- 825 FRANCO-MARTÍNEZ, L. et al. Changes in Serum and Salivary Proteins in Canine  
826 Mammary Tumors. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 741, 24 abr. 2020. Disponível em:  
827 <<https://www.mdpi.com/2076-2615/10/4/741>>.
- 828 GALDZICKA, M. et al. A new gene, EVC2, is mutated in Ellis–van Creveld syndrome.  
829 **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 77, n. 4, p. 291–295, dez. 2002.  
830 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719202001786>>.
- 831 GÁMEZ-VALERO, A. et al. Size-Exclusion Chromatography-based isolation  
832 minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating  
833 agents. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–9, 2016.
- 834 GARDINER, C. et al. Techniques used for the isolation and characterization of  
835 extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. **Journal of Extracellular**  
836 **Vesicles**, v. 5, n. 1, 2016.
- 837 GARNICA, T. K. et al. Liquid biopsy based on small extracellular vesicles predicts  
838 chemotherapy response of canine multicentric lymphomas. **Scientific Reports**, v.  
839 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- 840 GEDON, J. et al. Canine mammary tumours: Size matters—a progression from low  
841 to highly malignant subtypes. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 19, n. 4,  
842 p. 707–713, 2020.
- 843 GEORGE, J. et al. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma  
844 and serum. **Blood**, v. 60, n. 4, p. 834–840, 1982. Disponível em:  
845 <<http://dx.doi.org/10.1182/blood.V60.4.834.834>>.
- 846 GERHARDT, C. et al. The cilia-regulated proteasome and its role in the development  
847 of ciliopathies and cancer. **Cilia**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2016.
- 848 GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Classification and grading of canine mammary tumors.  
849 **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.
- 850 HAN, M. H. et al. Proteomics analysis reveals overlapping functions of clustered  
851 protocadherins. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 9, n. 1, p. 71–83, 2010.

- 852 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M900343-MCP200>>.
- 853 HARSHMAN, S. W. et al. Proteomic characterization of circulating extracellular  
854 vesicles identifies novel serum myeloma associated markers. **Journal of**  
855 **Proteomics**, v. 136, p. 89–98, 2016. Disponível em:  
856 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.016>>.
- 857 HOSHINO, A. et al. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple  
858 Human Cancers. **Cell**, v. 182, n. 4, p. 1044–1061.e18, 2020.
- 859 HUBER, C.; CORMIER-DAIRE, V. Ciliary disorder of the skeleton. **American**  
860 **Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 160C, n.  
861 3, p. 165–174, 15 ago. 2012. Disponível em:  
862 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.c.31336>>.
- 863 ISHIHAMA, Y. et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for  
864 estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced  
865 peptides per protein. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 1265–1272,  
866 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>>.
- 867 JIANG, J. Hedgehog signaling mechanism and role in cancer. **Seminars in Cancer**  
868 **Biology**, v. 85, n. April 2021, p. 107–122, 2022. Disponível em:  
869 <<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.04.003>>.
- 870 JOHNSEN, K. B. et al. What is the blood concentration of extracellular vesicles?  
871 Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of  
872 cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1871, n. 1, p.  
873 109–116, 2019.
- 874 KOH, Y. Q. et al. Extracellular Vesicle Proteome of Breast Cancer Patients with and  
875 Without Cognitive Impairment Following Anthracycline-based Chemotherapy: An  
876 Exploratory Study. **Biomarker Insights**, v. 16, 2021.
- 877 KUBO, M. et al. Hedgehog Signaling Pathway is a New Therapeutic Target for  
878 Patients with Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 17, p. 6071–6074, 1 set.  
879 2004. Disponível em:  
880 <[https://aacrjournals.org/cancerres/article/64/17/6071/511707/Hedgehog-](https://aacrjournals.org/cancerres/article/64/17/6071/511707/Hedgehog-Signaling-Pathway-is-a-New-Therapeutic)  
881 [Signaling-Pathway-is-a-New-Therapeutic](https://aacrjournals.org/cancerres/article/64/17/6071/511707/Hedgehog-Signaling-Pathway-is-a-New-Therapeutic)>.
- 882 KULKA, M.; BRENNAN, K.; GEE, M. M. Investigation of canine extracellular vesicles  
883 in diffuse large B-cell lymphomas. **PLoS ONE**, v. 17, n. 9 September, p. 1–9, 2022.  
884 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0274261>>.
- 885 KURG, K.; PLANKEN, A.; KURG, R. Proteomic and Biochemical Analysis of  
886 Extracellular Vesicles Isolated from Blood Serum of Patients with Melanoma.  
887 **Separations**, v. 9, n. 4, p. 1–14, 2022.
- 888 LEE, J.-K. et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress  
889 Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. **PLoS**  
890 **ONE**, v. 8, n. 12, p. e84256, 31 dez. 2013. Disponível em:  
891 <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0084256>>.
- 892 LEE, K. et al. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. p.

- 893 19–24, 2019.
- 894 LI, A. M. et al. Protocadherin-7 induces bone metastasis of breast cancer.  
895 **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 436, n. 3, p. 486–  
896 490, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.131>>.
- 897 LIM, H. Y. et al. Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine  
898 Mammary Gland Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1045–1051, 2015a.  
899 Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0300985815579994>>.
- 900 LIM, H. Y. et al. Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration  
901 in canine mammary tumors. **Veterinary Journal**, v. 203, n. 3, p. 326–331, 2015b.
- 902 LIN, K. et al. Comprehensive proteomic profiling of serum extracellular vesicles in  
903 patients with colorectal liver metastases identifies a signature for non-invasive risk  
904 stratification and early-response evaluation. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1–7,  
905 2022.
- 906 LIN, Y. L. et al. Aberrant methylation of protocadherin 17 and its clinical significance  
907 in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. **Medical Science**  
908 **Monitor**, v. 20, p. 1376–1382, 2014.
- 909 LUDWIG, N.; WHITESIDE, T. L.; REICHERT, T. E. Challenges in exosome isolation  
910 and analysis in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**,  
911 v. 20, n. 19, 2019.
- 912 MINCIACCHI, V. R. et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and  
913 represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles.  
914 **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 11327–11341, 2015.
- 915 MOCCIA, V. et al. Characterization and function of extracellular vesicles in a canine  
916 mammary tumour cell line: Ultracentrifugation versus size exclusion  
917 chromatography. **Veterinary and Comparative Oncology**, n. May 2022, p. 36–44,  
918 2022.
- 919 MOHANTY, S. S.; MOHANTY, P. K. ScienceDirect Obesity as potential breast  
920 cancer risk factor for postmenopausal women. **Genes & Diseases**, v. 8, n. 2, p. 117–  
921 123, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.09.006>>.
- 922 OZAWA, P. M. M. et al. Identification of miRNAs enriched in extracellular vesicles  
923 derived from serum samples of breast cancer patients. **Biomolecules**, v. 10, n. 1,  
924 2020.
- 925 PAROLINI, I. et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor  
926 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 49, p. 34211–34222, 2009.
- 927 PASTOR, N. et al. Epidemiological study of canine mammary tumors: Age, breed,  
928 size and malignancy. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, v. 50, n. 3, p. 143–  
929 147, 2018.
- 930 PAUL, M. R. et al. Genomic landscape of metastatic breast cancer identifies  
931 preferentially dysregulated pathways and targets. **Journal of Clinical**  
932 **Investigation**, v. 140, n. 8, p. 4252–4265, 2020.
- 933 PEACH, M.; MARSH, N.; MACPHEE, D. J. Protein Solubilization: Attend to the

- 934 Choice of Lysis Buffer. In: [s.l: s.n.]p. 37–47.
- 935 PEÑAFIEL-VERDU, C. et al. Reduced Expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin and  
936 High Expression of Basal Cytokeratins in Feline Mammary Carcinomas With  
937 Regional Metastasis. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 6, p. 979–987, 2012.
- 938 PÉREZ ALENZA, M. D. et al. Clinical and pathological prognostic factors in canine  
939 mammary tumors. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 33, n. 4, p. 581–5,  
940 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616968>>.
- 941 PINEDA, B. et al. A two-gene epigenetic signature for the prediction of response to  
942 neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer patients. **Clinical  
943 Epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2019.
- 944 PUGHOLM, L. H. et al. Phenotyping of Leukocytes and Leukocyte-Derived  
945 Extracellular Vesicles. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.
- 946 RABBANI, G.; AHN, S. N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic  
947 potential of human serum albumin: A natural cargo. **International Journal of  
948 Biological Macromolecules**, v. 123, p. 979–990, 2019. Disponível em:  
949 <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.053>>.
- 950 RAIMONDO, F. et al. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics  
951 improving biological understanding and biomarker discovery. **Proteomics**, v. 11, n.  
952 4, p. 709–720, fev. 2011. Disponível em:  
953 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.201000422>>.
- 954 RASOTTO, R. et al. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic  
955 Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Veterinary Pathology**, v.  
956 54, n. 4, p. 571–578, 29 jul. 2017. Disponível em:  
957 <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985817698208>>.
- 958 REIS, E. S. et al. Complement in cancer: Untangling an intricate relationship. **Nature  
959 Reviews Immunology**, v. 18, n. 1, p. 5–18, 2018. Disponível em:  
960 <<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.97>>.
- 961 RONTOGIANNI, S. et al. Proteomic profiling of extracellular vesicles allows for  
962 human breast cancer subtyping. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, 2019.
- 963 RUTTEMAN, G. R.; MISDORP, W. Hormonal background of canine and feline  
964 mammary tumours. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 47, p.  
965 483–7, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229967>>.
- 966 SAMMARCO, A. et al. **Preliminary investigation of extracellular vesicles in  
967 mammary cancer of dogs and cats: Identification and  
968 characterization** **Veterinary and Comparative Oncology**, 2018. .
- 969 SCHALLER, G. et al. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable  
970 prognosis in patients with breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 2, n. 11, p.  
971 1879–1885, 1996.
- 972 SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of  
973 proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 25 dez. 2006.  
974 Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2006.468>>.

- 975 SHI, R. et al. Downregulation of cytokeratin 18 induces cellular partial EMT and  
976 stemness through increasing EpCAM expression in breast cancer. **Cellular**  
977 **Signalling**, v. 76, n. June, p. 109810, 2020. Disponível em:  
978 <<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109810>>.
- 979 SILVA, H. D. C. et al. Epidemiology of Canine Mammary Gland Tumours in Espírito  
980 Santo, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, 28 jan. 2019. Disponível em:  
981 <<https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/89901>>.
- 982 SORENMO, K. **Canine mammary gland tumors** **Veterinary Clinics of North**  
983 **America - Small Animal Practice**, 2003. .
- 984 SOUZA, F. et al. Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs.  
985 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 283–286, jul. 2009. Disponível em:  
986 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2009.01447.x>>.
- 987 SPOERRI, M. et al. Endocrine control of canine mammary neoplasms: Serum  
988 reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and  
989 growth hormone receptors. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2015.  
990 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0546-y>>.
- 991 STØVRING, M.; MOE, L.; GLATTRE, E. A population-based case-control study of  
992 canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. **APMIS**,  
993 v. 105, n. 7–12, p. 590–596, jul. 1997. Disponível em:  
994 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1699-0463.1997.tb05057.x>>.
- 995 SUN, Y. et al. Systematic comparison of exosomal proteomes from human saliva  
996 and serum for the detection of lung cancer. **Analytica Chimica Acta**, v. 982, p. 84–  
997 95, 2017.
- 998 SZATANEK, R. et al. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles ( EVs )  
999 Characterization. 2011.
- 1000 TECLES, F. et al. Serum Acute Phase Protein Concentrations in Female Dogs with  
1001 Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 2, p.  
1002 214–219, 1 mar. 2009. Disponível em:  
1003 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0282.x>>.
- 1004 TESI, M. et al. Role of body condition score and adiponectin expression in the  
1005 progression of canine mammary carcinomas. **Veterinary Medicine and Science**, v.  
1006 6, n. 3, p. 265–271, 2020.
- 1007 THÉRY, C. et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture  
1008 Supernatants and Biological Fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 30, n. 1,  
1009 p. 1–29, 2006.
- 1010 THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018  
1011 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular  
1012 Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular**  
1013 **Vesicles**, v. 7, n. 1, 2018.
- 1014 TIAN, F. et al. Protein analysis of extracellular vesicles to monitor and predict  
1015 therapeutic response in metastatic breast cancer. **Nature Communications**, v. 12,

- 1016 n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-22913-7>>.  
1017
- 1018 TOMIYAMA, E. et al. Proteomic analysis of urinary and tissue-exudative extracellular  
1019 vesicles to discover novel bladder cancer biomarkers. **Cancer Science**, v. 112, n.  
1020 5, p. 2033–2045, 2021.
- 1021 TROYER, R. M. et al. Exosomes from Osteosarcoma and normal osteoblast differ  
1022 in proteomic cargo and immunomodulatory effects on T cells. **Experimental Cell**  
1023 **Research**, v. 358, n. 2, p. 369–376, 2017.
- 1024 TUTANOV, O. et al. Proteomic Profiling of Plasma and Total Blood Exosomes in  
1025 Breast Cancer: A Potential Role in Tumor Progression, Diagnosis, and Prognosis.  
1026 **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. October, p. 1–16, 2020.
- 1027 TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Obese dogs with and without obesity-related  
1028 metabolic dysfunction - a proteomic approach. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n.  
1029 1, p. 1–9, 2016.
- 1030 UENO, T.; TOI, M.; LINDER, S. Detection of epithelial cell death in the body by  
1031 cytokeratin 18 measurement. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. S359–  
1032 S362, out. 2005. Disponível em:  
1033 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332205800782>>.
- 1034 WANG, Y. et al. Identification of Tumor Microenvironment-Related Prognostic  
1035 Biomarkers in Luminal Breast Cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 11, n. November,  
1036 2020.
- 1037 WEI, H.; WANG, J. Y. Role of polymeric immunoglobulin receptor in iga and igm  
1038 transcytosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–20,  
1039 2021.
- 1040 WENG, Y. R.; CUI, Y.; FANG, J. Y. Biological functions of cytokeratin 18 in cancer.  
1041 **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 4, p. 485–493, 2012.
- 1042 WOLFERS, J. et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection  
1043 antigens for CTL cross-priming. **Nature Medicine**, v. 7, n. 3, p. 297–303, mar. 2001.  
1044 Disponível em: <[http://www.nature.com/articles/nm0301\\_297](http://www.nature.com/articles/nm0301_297)>.
- 1045 XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics  
1046 Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 55, n. 1, 7 set. 2016.  
1047 Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpbi.11>>.
- 1048 YIN, X. et al. Protocadherin 17 functions as a tumor suppressor suppressing Wnt/ $\beta$ -  
1049 catenin signaling and cell metastasis and is frequently methylated in breast cancer.  
1050 **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 51720–51732, 2016.
- 1051 ŻMIGRODZKA, M. et al. Extracellular vesicles in the blood of dogs with cancer—a  
1052 preliminary study. **Animals**, v. 9, n. 8, p. 1–13, 2019a.
- 1053 ŻMIGRODZKA, M. et al. Extracellular Vesicles in the Blood of Dogs with Cancer—  
1054 A Preliminary Study. **Animals**, v. 9, n. 8, p. 575, 19 ago. 2019b. Disponível em:  
1055 <<https://www.mdpi.com/2076-2615/9/8/575>>.
- 1056 ZORZAN, E. et al. Hypermethylation-Mediated Silencing of CIDEA, MAL and

1057 PCDH17 Tumour Suppressor Genes in Canine DLBCL: From Multi-Omics Analyses  
1058 to Mechanistic Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7,  
1059 2022.  
1060