

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
cadela 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 ($5,5 \times 10^{12} \pm 4,4 \times 10^{12}$; $1,3 \times 10^{12} \pm 0,66 \times 10^{12}$; $1,1 \times 10^{12} \pm 0,88 \times 10^{12}$ 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 ± 0.33 ; 10.1 ± 0.60 ; 12.1 ± 0.70 years) and body weight (16.2 ± 2.5 ; 17.9 ± 3.6 ; 10.9 ± 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 ± 6.0 ; 129.3 ± 4.0 ; 125.5 ± 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

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

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).

Na veterinária, pesquisas com VEs têm identificado uma área promissora a ser explorada. VEs do plasma sanguíneo de cães com neoplasias de várias origens foram encontradas em maior abundância quando comparadas com animais saudáveis (ŻMIGRODZKA et al., 2019).

Em vista do exposto e considerando as neoplasias mamárias um dos tipos neoplásicos que mais acomete cadelas, este estudo objetivou, de forma inédita, analisar e comparar a proteômica das VEs presentes no soro de cadelas acometidas por tumor de mama a fim de identificar possíveis biomarcadores que auxiliem no diagnóstico precoce e monitoramento da neoplasia, utilizando-se um método considerado minimamente invasivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias mamárias

A neoplasia mamária é o tipo mais comum de câncer encontrado em cadelas, contudo a incidência pode variar de acordo com a população investigada. Este tipo de câncer demonstra malignidade entre 53 e 60% dos casos (PASTOR et al., 2018). No Brasil, a porcentagem de malignidade em tumores mamários é mais elevada sendo descrita entre 67 e 89% (BIONDI et al., 2014; SILVA et al., 2019). A neoplasia pode ser diagnosticada em animais castrados e não-castrados e é uma das maiores causas de morte em fêmeas caninas (PASTOR et al., 2018; BURRAI et al., 2020; ARIYARATHNA et al., 2021).

Os tumores de mama apresentam como principais fatores de risco a idade, o *status* reprodutivo, devido a exposição hormonal, e um possível envolvimento genético, uma vez que é observado uma maior incidência em determinadas raças. Na Suécia, um estudo identificou uma incidência de 112 casos de neoplasia mamária a cada 10.000 casos, acometendo, principalmente, animais de meia idade e idosos, sendo mais frequente em cadelas com média entre 7-12 anos (JITPEAN et al., 2012; GEDON et al., 2020). Maior risco de displasia e hiperplasia mamária foi encontrado em cadelas com média de 8,3 anos, enquanto o maior risco para neoplasias benignas foi de 8,9 e malignas de 13 anos de idade (ZATLOUKAL et al.,

2005; BURRAI et al., 2020). De fato, há incremento de 1,19x de risco de malignidade a cada 1 ano de avanço da idade de cadelas (GEDON et al., 2020).

Em relação a raça, há estudos demonstrando que animais de raças puras têm maior incidência de neoplasias mamárias, especialmente cadelas Poodle, Cocker Spaniel inglês, Dachshund, Labradores, Pastor Alemão, Spitz Alemão e Golden Retriever (ZATLOUKAL et al., 2005; NADHIYA et al., 2020; ARIYARATHNA et al., 2021; GEDON et al., 2021). Estes resultados são variáveis, de acordo com o local de estudo, desde que outros levantamentos encontraram maior incidência em animais sem raça definida (PASTOR et al., 2018).

Quanto ao *status* reprodutivo, os tumores de mama podem acometer animais castrados e não-castrados e estudo aponta que cadelas castradas antes do primeiro estro, tem incidência de 0,5% de neoplasias mamárias; quando esterilizadas entre o primeiro e o segundo estro, a ocorrência aumentou para 8%; e entre o segundo e terceiro para 26%. Esse estudo não observou a ovariectomia como fator preventivo das neoplasias mamárias após o quarto estro (SCHNEIDER et al., 1969).

A exposição hormonal parece ser um fator importante no desenvolvimento das neoplasias mamárias, uma vez que a glândula mamária possui receptores de estrogênio, progesterona e prolactina que são necessários para o desempenho das funções das mamas em momentos importantes da vida reprodutiva da cadela, como na produção de leite durante a lactação (PEREZ ALENZA et al., 2000; QUEIROGA et al., 2005; SORENMO et al., 2011).

O mecanismo exato do desenvolvimento e proliferação das neoplasias mamária ainda é desconhecido, entretanto sabe-se que o estrogênio possui efeito mitogênico e de promoção da proliferação intralobular e ductal, além da expansão de ductos e lóbulos do epitélio mamário. Já a progesterona tem efeitos sobre o desenvolvimento da glândula mamária pela produção de hormônio somatotrófico e seus receptores, enquanto a prolactina tem sido sugerida como um fator promotor do crescimento dos tumores de mama, já que concentrações maiores deste hormônio foram encontradas em cadelas em anestro com neoplasias benignas e malignas (TONITI et al., 2009; SORENMO et al., 2011;). Os esteróides foram

relacionados a progressão tumoral e foram observadas maiores concentrações em cadelas com neoplasias malignas quando comparadas com cadelas com neoplasias benignas ou sem alterações (QUEIROGA et al., 2005). Foi observado também que o avanço espontâneo da neoplasia de benigna para maligna foi correlacionada com uma menor dependência hormonal, demonstrada pelo menor número de receptores de progesterona nesses tipos neoplásicos malignos comparados aos benignos (GERALDES et al., 2000)

Cadelas com tumor de mama tem em média sobrevida de 2 anos, podendo variar de acordo com o estadiamento clínico, grau histológico e agressividade da neoplasia, sendo animais acometidos com neoplasias pouco diferenciadas atribuídos um maior tempo de sobrevida e animais com tipos histológicos muito indiferenciados como carcinoma sólido e anaplásico, há estudos demonstrando apenas 3 meses de sobrevida (CASSALI et al., 2013; CANADAS et al., 2019; CHOCTEAU et al., 2019). O diagnóstico das neoplasias mamárias deve ser realizado por um conjunto de avaliações clínicas e exames complementares. O exame clínico completo do animal, assim como o exame específico das glândulas mamárias, incluindo a inspeção e palpação de todas as mamas e linfonodos adjacentes, e os nódulos encontrados devem ser mensurados. Os exames complementares consistem em hemograma, bioquímico para avaliação do quadro clínico geral, e exames de imagem, com raio X torácico e ultrassonografia abdominal, para a pesquisa de metástases distantes (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

O estadiamento clínico é uma ferramenta importante, pois permite o planejamento do melhor tratamento a ser empregado uma vez que é possível determinar a fase da doença que o animal se encontra, além de auxiliar no estabelecimento de um prognóstico mais adequado ao paciente. O sistema de estadiamento proposto por Owen (1980) modificado por Cassali et al. (2013) consiste na avaliação TNM, sendo T o tamanho do(s) nódulo(s), N se há acometimento dos linfonodos adjacentes por micro metástases, e M se há identificação de metástases distantes. Desta forma, os animais serão classificados entre estádios I e V conforme demonstrado na Tabela 1. Outro modelo de modificação do sistema de Owen (1980), baseado naquele utilizado em humanos,

foi proposto por Chocteau et al. (2019), o qual demonstrou alta correlação entre o estadiamento e a sobrevida, contudo a avaliação de tamanho (T) e linfonodo (N) foi modificada para tamanho (pT) e linfonodo patológico (pN), sendo essas características avaliadas pelo patologista.

De forma geral, os animais com neoplasias mamárias apresentam-se estáveis e saudáveis, sendo que em casos de tumores inflamatórios, grandes, ulcerados, com contaminação bacterina, metástases distantes e comprometimento sistêmico, o animal pode estar debilitado, com quadro clínico alterado e consequentemente um prognóstico desfavorável (MISDORP; HART, 1976; PEREZ ALENZA et al., 2000).

Tabela 1. Estadiamento clínico proposto por Owen (1980) e modificado por Casali et al. (2013).

Estádio	Tamanho do tumor primário	Linfonodos Regionais	Metástase distante
I	T < 3 cm	N ₀	M ₀
II	3 > T > 5 cm	N ₀	M ₀
III	T > 5cm	N ₀	M ₀
IV	Qualquer tamanho	N ₁	M ₀
V	Qualquer tamanho	N ₀ ou N ₁	M ₁

Legenda: T – tumor primário, N₀ – ausência de metástase, N₁ – presença de metástase, M₀ – ausência de metástase, M₁ – presença de metástase.

A origem histológica da neoplasia mamária é epitelial, todavia podem ter componentes mesenquimais e mioepiteliais que sofrem efeitos carcinogênicos, com consequentes alterações, progredindo de nódulos benignos para malignos (SORENMO et al., 2009; GOLDSCHMIDT et al., 2011; SORENMO et al., 2013). As neoplasias mamárias são consideradas heterogêneas, tanto na espécie humana como canina, e por esse motivo o exame histopatológico é considerado padrão ouro para identificação do subtipo, graduação e estadiamento adequado dos pacientes (GOLDSCHMIDT et al., 2011; CASSALI et al., 2013).

A similaridade das características epidemiológicas, clínicas, morfológicas e prognósticas entre neoplasias mamárias em cadelas e em mulheres, favorecem a promoção de novos estudos de forma translacional, a fim de promover o desenvolvimento e identificação de novos métodos para o diagnóstico e tratamento para ambas as espécies (ROWELL et al., 2011; GRAY et al., 2020; KWON et al., 2023).

2.2 Vesículas extracelulares

As VEs foram inicialmente consideradas como *garbage bags* que seriam secretadas para o meio extracelular com a função de descarte de produtos não necessários para a célula, favorecendo assim a maturação destas (HARDING, et al., 1983; JOHNSTONE, 1992; VIDAL, 2019). Todavia, estudos demonstraram que essas partículas parecem ter importantes funções em processos metabólicos e que seu conteúdo pode servir como biomarcadores para auxiliar a elucidar diversos processos fisiológicos, além disso auxiliar no diagnóstico, monitoramento, prognóstico e transporte de fármacos para tratamento de doenças (COLOMBO, 2014).

São nanopartículas com dupla membrana lipídica e formato esférico, derivadas de células e contendo informações em seu interior ou em sua superfície (THÉRY et al., 2018) e secretadas por vários tipos celulares e, durante sua formação, são enriquecidas com moléculas presentes no citoplasma e na membrana da célula de origem (Figura 1) (CUFARO et al., 2019). As VEs contêm proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, produzidos pelas células de origem, e podem ser isoladas em tecidos, e fluidos corporais como sangue (soro e plasma), saliva, urina e leite (SUN et al., 2017; BOUKOURIS; MATHIVANAN, 2015; TOMIYAMA et al., 2021).

É percebido que a nomenclatura das VEs ainda não é padronizada na literatura, uma vez que há estudos que se referem VEs como exossomos, sendo esse termo podendo se referir ao tipo de formação da vesícula, a vesículas pequenas (30 – 150 nm) e ainda como nanopartículas que possuem função fisiológica (GOULD; RAPOSO, 2013). Entretanto, a Sociedade Internacional de

Vesículas Extracelular (ISEV), em publicação de 2018, recomenda que as VEs sejam classificadas preferencialmente de acordo com seu tamanho (vesículas pequenas < 100 ou < 200 nm e médias/grandes >200nm) ou densidade, composição bioquímica e descrição da célula de origem. Desta forma, as VEs devem ser denominadas como exossomos, microvesículas ou corpos apoptóticos, se no método de caracterização for possível identificar biomarcadores específicos que comprovem o mecanismo de formação, além disso o uso do termo vesículas extracelulares para denominar essas nanopartículas também é incentivado (THÉRY et al., 2018).

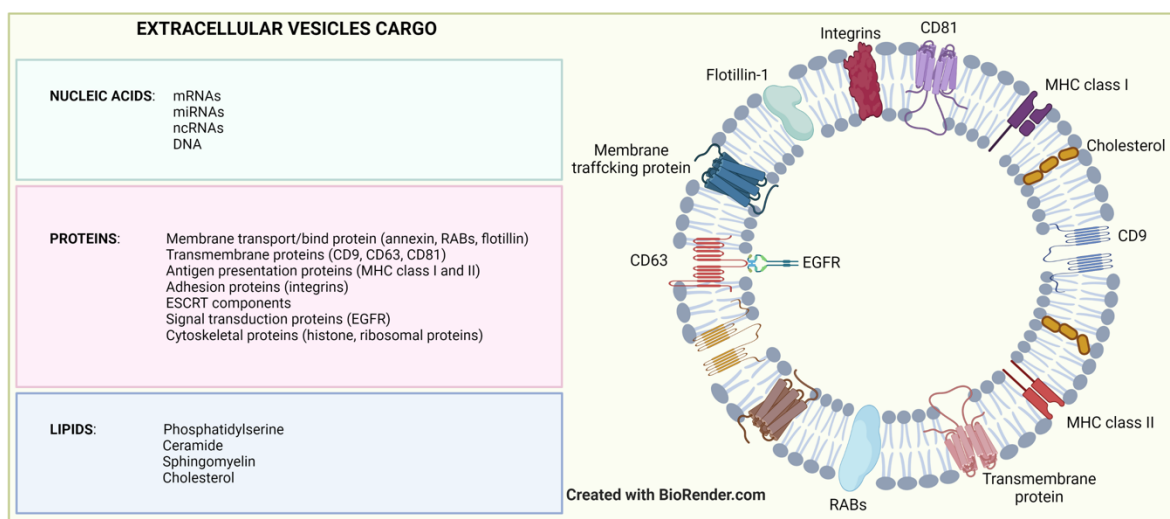


Figura 1. Ilustração de alguns dos marcadores presentes na superfície ou no interior das VEs, que são adquiridos durante seu processo de formação, e contém informações específicas sobre as VEs e suas células de origem. Fonte: Adaptado de Veerman *et al.* (2019).

A formação/secreção das VEs na célula de origem ocorre de diferentes formas de acordo com o tipo de vesícula (Figura 2). Os exossomos são formados pelo sistema endossômico, no qual partículas extracelulares são internalizadas pela célula e formam corpos multivesiculares (CMVs). Nesse processo pode ter dois caminhos, a fusão com lisossomos e posterior degradação; ou a fusão direta com a membrana plasmática e exocitose do conteúdo dos CMVs, os exossomos

(HARDING et al., 1983; PAN; JOHNSTONE, 1983). As microvesículas/ectossomos descritas inicialmente em 1947 (CHARGAFF; WEST, 1946) são produzidas pela fusão e posterior fissura da membrana plasmática da célula de origem seguida pela secreção das microvesículas para o meio extracelular (COCUCCI et al., 2009; AKERS et al., 2013). Por fim, os corpos apoptóticos são formados pela fusão da membrana plasmática fragmentada de células em processo de apoptose (KERR et al., 1972; GYÖRGY et al., 2011).

As VEs são enriquecidas com moléculas presentes no citoplasma e na membrana da sua célula de origem e cuja funções incluem a comunicação intercelular pelo transporte de bioativos nas células alvo, reparo tecidual, regulação e supressão da resposta imune (WOLFERS et al., 2001; COLOMBO, 2014).

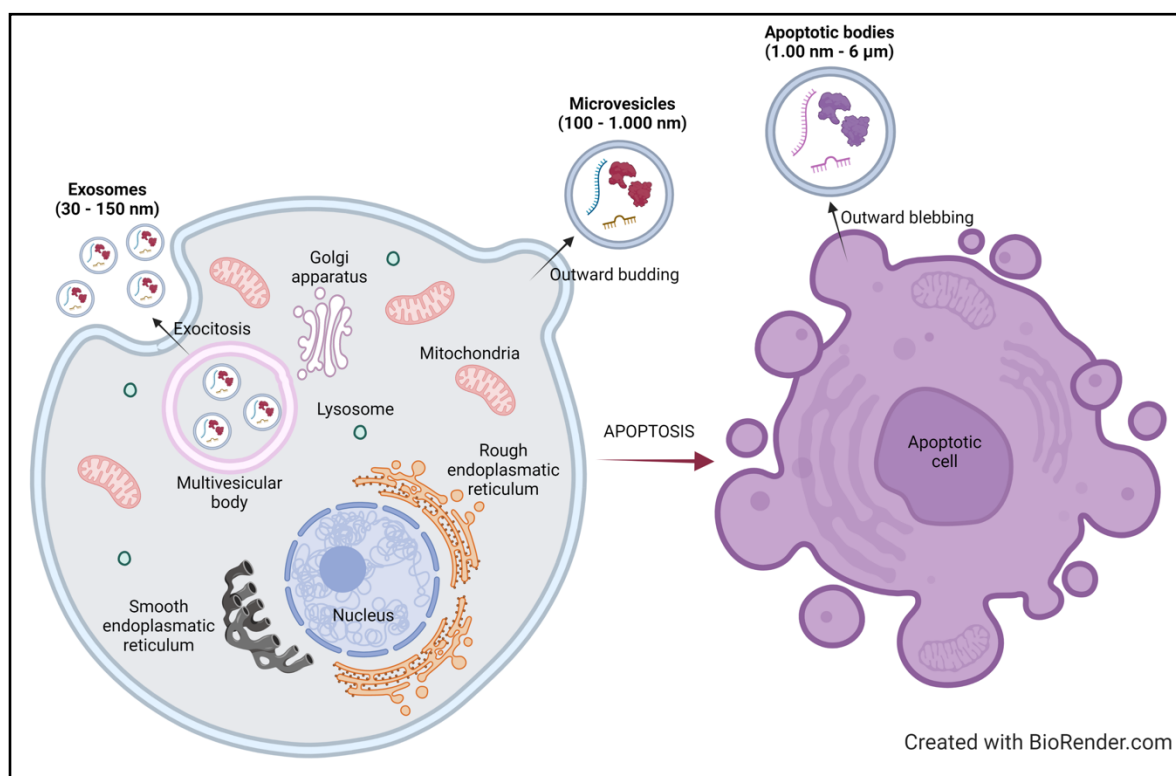


Figura 2. Processos de formação e secreção dos exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Fonte: Adaptado de Gurunathan *et al.* (2019).

O uso de VEs e seu conteúdo como biomarcadores está relacionado a sua maior estabilidade devido a proteção pela membrana bilipídica, prevenindo a degradação de seu conteúdo por lipases e proteases, e apesar de ser uma

nanopartícula, a elevada quantidade de VEs nos fluidos corporais, indica maior concentração de biomarcadores, quando comparada à de biomarcadores livres, sendo assim capaz de auxiliar no monitoramento de doenças (BOUKOURIS; MATHIVANAN, 2015; DOBRA et al., 2020; TOMIYAMA et al., 2021). Os diferentes tipos de VEs contêm proteínas comuns relacionadas com funções estruturais e de formação, e proteínas exclusivas produzidas pelas células de origem, como as células cancerígenas, e que são relacionadas com processos fisiológicos e patológicos dessas células (Figura 3) (RAIMONDO et al., 2011; CHOI et al., 2013).

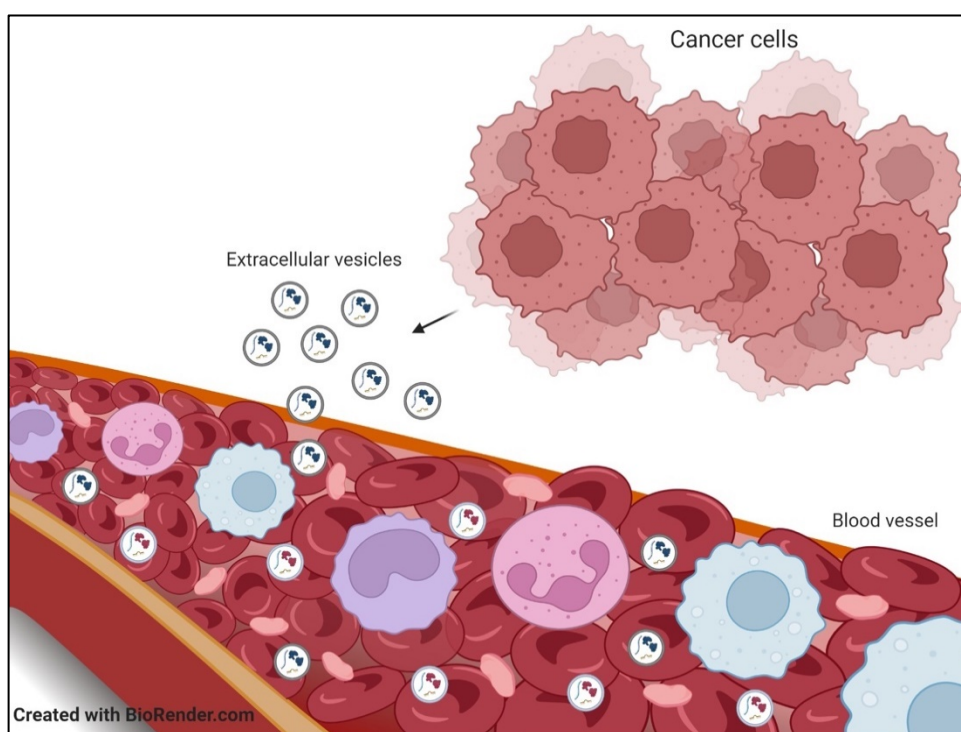


Figura 3. As VEs são secretadas por células cancerígenas, podendo ser isoladas em biofluidos corporais como sangue. Essas VEs contêm informações específicas como proteínas, marcadores de superfície e miRNA, sobre suas células de origem.

2.2.1 Isolamento e caracterização das VEs

Existem vários métodos de isolamento e caracterização das VEs, como a ultracentrifugação, ultracentrifugação com gradientes de densidade, imunoafinidade, ultrafiltração, precipitação e a cromatografia por exclusão de tamanho. Esses métodos possuem vantagens e desvantagens, como demonstrado na Tabela

2., e ainda não foi definido pela ISEV um padrão ouro para o isolamento das nanopartículas, sendo recomendado a utilização de métodos complementares para que haja maior purificação e concentração satisfatória de VEs que permitam as análises (LÖTVALL et al., 2014; THÉRY et al., 2018).

A ultracentrifugação é o método mais antigo e ainda o mais utilizado para isolamento de VEs. Esta técnica consiste na separação das partículas por densidade, tamanho e formato, sendo que as partículas mais pesadas e maiores sedimentam primeiro e o sobrenadante é submetido a centrifugações seriadas (THÉRY et al., 2006; GARDINER et al., 2016). Possui como principais vantagens o baixo custo e maior quantidade de vesículas isoladas; por outro lado, o longo tempo para realização da técnica (cerca de 4 h) e o co-isolamento de partículas como lipoproteínas e albumina, além da necessidade de volumes maiores de amostra, são as principais desvantagens desse método (THÉRY et al., 2006; TAURO et al., 2012; DOYLE; WANG, 2019; THÉRY et al., 2018;). A ultracentrifugação por gradiente de densidade formado por diferentes concentrações de sacarose e iodixanol é outra opção para a separação das VEs, com a vantagem aumentar a pureza pela retirada de partículas que foram co-isoladas nas ultracentrifugações, mas que não flutuarão no gradiente de sacarose (THÉRY et al., 2006; LOBB et al., 2015)

A imuno-afinidade permite o isolamento pela interação das VEs com marcadores proteicos específicos como CD9, CD63 e CD81, utilizando por exemplo *beads* magnéticas (CLAYTON et al., 2001; THÉRY et al., 2006). A ultrafiltração e a cromatografia por exclusão de tamanho são isolamentos baseados no tamanho das moléculas (BÖING et al., 2014; MONGUIÓ-TORTAJADA et al., 2019). A ultrafiltração consiste na passagem seriada das amostras por dispositivos contendo membranas de diferentes tamanhos (800, 450, 200 e 100 nm) e, geralmente, é utilizada em conjunto a ultracentrifugação, a fim de elevar a pureza e rendimento das moléculas isoladas (CRESCITELLI et al., 2013; PARISET et al., 2017; THÉRY et al., 2018).

Já a cromatografia por exclusão de tamanho consiste no uso de colunas porosas, nas quais as moléculas maiores são filtradas primeiro e as menores ficam

retidas temporariamente nos poros da coluna e são eluídas posteriormente. Esse método é promissor para utilização clínica do isolamento de VEs, uma vez que tem custo acessível, é de fácil manipulação e necessita de pouco tempo para realização (BÖING et al., 2014; PARISET et al., 2017;). Além disso, a cromatografia para o isolamento de VEs em fluidos corporais, como plasma e soro, tem como vantagem a redução do co-isolamento de lipoproteínas e albumina, e combinada com a pré-centrifugação aumenta a pureza das partículas isoladas (BÖING et al., 2014; MONGUIÓ-TORTAJADA et al., 2019).

A precipitação consiste em reduzir a solubilidade das VEs na presença de um polímero. Geralmente, são utilizados kits comerciais e é um método rápido, que permite repetição e alto rendimento. Apesar disso, apresenta baixa pureza no isolamento e observa-se alterações na morfologia das vesículas, comprometendo a caracterização e análises do conteúdo vesicular (VAN DEUN et al., 2014; GARDINER et al., 2016; PARISET et al., 2017; THÉRY et al., 2018).

Após o isolamento, as VEs devem ser quantificadas e caracterizadas, a fim de validar o isolamento. Os métodos mais utilizados, segundo pesquisa realizada em 2016, para a quantificação e caracterização são análise de nanopartículas (*Nano tracking Analysis*, NTA - 80%), *western blotting* (74%), microscopia eletrônica de transmissão (60%) e citometria de fluxo (41%). A análise de nanopartículas é utilizada tanto para determinar a concentração quando o tamanho das partículas isoladas. Já o *western blotting* serve principalmente para validação e caracterização das VEs, uma vez que a técnica permite a imunomarcção de biomarcadores contidos na superfície das vesículas (CD9, CD63, CD81, Alix). A imunomarcção negativa de proteínas ausentes nas partículas isoladas (TOM-20, citocromo C), também pode ser usada para verificar a pureza do isolamento (GARDINER et al., 2016; BRENNAN et al., 2020). As VEs, por serem nanopartículas não visualizadas em microscópio óptico comum, é necessário a microscopia eletrônica de transmissão para sua caracterização pelo tamanho e forma (THÉRY et al., 2006; VAN DER POL et al., 2010).

Tabela 2. Principais vantagens e desvantagens dos métodos de isolamento de VEs.

Método	Vantagem	Desvantagem
Ultracentrifugação	Recuperação de maior quantidade de partículas Alta repetibilidade Reduzido custo	Co-isolamento de lipoproteínas e agregados exossomais Tempo
Ultracentrifugação em gradiente de densidade	Reduzido custo Reduz o co-isolamento de lipoproteínas	Tempo
Imuno-afinidade	Alta pureza	Necessidade de uso de marcadores específicos; Baixo rendimento; possibilidade de dano à integridade das VEs; poucos marcadores específicos disponíveis no mercado; alto custo
Ultrafiltração	Rápido Fácil realização Reduzido custo	Co-isolamento de peptídeos e albuminas Baixo rendimento Baixa pureza
Cromatografia por exclusão de tamanho	Rápido Baixo co-isolamento de agregados exossomais Manutenção da integridade das VEs	Rendimento intermediário Alto volume eluído
Precipitação	Rápido Alta repetibilidade Alto rendimento	Co-isolamento de lipoproteínas e albumina Baixa especificidade Alterações morfológicas das VEs

2.2.2 VEs na oncologia

Na oncologia, as VEs foram relacionadas com a carcinogênese, promovendo a comunicação intercelular pela expressão de fatores implicados no crescimento e proliferação tumoral como *TGF- β* , *VEGF* e *SDF-1*. Além disso, estão envolvidas na formação do microambiente tumoral, imunomodulação e transporte de informações pró-metastáticas (LEE et al., 2013; COLOMBO, 2014; HARSHMAN et al., 2016). Por estes motivos, o estudo das VEs na oncologia tem sido importante para determinar métodos diferenciados de diagnóstico, fatores prognósticos e alvos terapêuticos, incluindo o tumor de mama em mulheres e cadelas.

A maioria dos estudos com VEs utiliza métodos complementares para análise de VEs uma vez que não existe um padrão ouro que consiga determinar uma análise completa das propriedades das VEs em fluidos corporais e amostras clínicas (THÉRY et al., 2018). Em geral os métodos utilizados são baseados em análises de características físicas e bioquímicas para identificação e quantificação de VEs. Para análise do conteúdo das VEs são utilizados métodos biomoleculares específicos como proteômica, lipidômica e genômica (CHOI et al., 2013; ROSA-FERNANDES et al., 2017).

Em humanos com neoplasias estudos observaram há maior concentração de VEs na corrente sanguínea em relação a indivíduos saudáveis (GALINDO-HERNANDEZ et al., 2013; ARBELAIZ et al., 2017) resultados também observados em pacientes acometidos por tumor de ovário correlacionando esta informação com o estadiamento precoce ou tardio dos pacientes (SZAJNIK et al., 2013)

O perfil proteico de VEs obtidas de tecidos neoplásicos também tem sido estudado e foi correlacionado com o subtipo de neoplasias mamárias, sendo um importante avanço para o diagnóstico por métodos não invasivos (RONTOGIANNI et al., 2019). Proteínas transportadoras de glicose (GLUT-1), *glypican 1* (GPC-1) e com *desintegrin domain* e *metalloproteinase* (ADAM10) foram identificadas na membrana de exossomos isolados de linhagens de neoplasia mamária foram sugeridos como potenciais biomarcadores para diagnóstico e prognóstico (RISHA et al., 2020). Já o perfil proteico de VEs do sangue total e do plasma de mulheres com câncer de mama sugeriu, como potenciais biomarcadores prognósticos, as

proteínas serpin 1, KRT6B e SOCS3 como favoráveis e a *IGF2R* como desfavorável (TUTANOV et al., 2020). Outro estudo com plasma sanguíneo e linhagens celulares identificou proteínas únicas em mulheres com câncer de mama proveniente de VEs como a *serpin B3, tripeptidyl--peptidase 2, prolactina-inducible protéin, tetraspanin-15 e proteassoma subunits*, sendo que algumas dessas proteínas tem funções relacionadas com aumento de mobilidade celular, sugerindo um papel no grau de invasividade celular dessas neoplasias (JORDAN et al., 2020).

Estudo do perfil proteico de VEs de linhagens celulares de osteossarcoma canino identificou proteínas associadas a imunossupressão como α -feto proteína, a qual foi mais abundante nas linhagens neoplásicas quando comparada a linhagens não-neoplásicas, e o TGF β foi encontrado apenas em exossomos das linhagens neoplásicas (TROYER et al., 2017). Outro estudo *in vivo*, de cães com osteossarcoma identificou mais de 170 proteínas em VEs séricas, correlacionadas com proteólise, regulação do sistema imune, ativação da resposta ao estresse e regulação de processos metabólicos (BRADY et al., 2018).

Perfil molecular composto por miRNA foi encontrado em VEs do soro de cães diagnosticados e tratados com linfoma multicêntrico, e sugeridos como potenciais biomarcadores para a resposta ao tratamento (GARNICA et al., 2020). Alterações na concentração total e no tamanho de partículas isoladas foram encontradas em estudo de VEs do plasma sanguíneo de cães, no qual animais com linfoma e adenocarcinoma tiveram maior concentração de VEs quando comparados a animais e saudáveis, e a animais com linfoma ainda demonstraram menor tamanho de partícula de VEs quando comparados a animais saudáveis (KULKA et al., 2022).

Em relação a resposta a quimioterapia estudos identificaram proteínas oriundas de VEs do soro de cães, como tetranectin, fatores de complemento C2 e C3, que podem ser potenciais marcadores para avaliar a resposta a quimioterapia de animais com osteossarcoma, tratados com carboplatina (WEINMAN et al., 2021).

Desta maneira, o conteúdo das VEs pode ser utilizado como biomarcadores, a fim de auxiliar no diagnóstico precoce e monitoramento de

doenças, incluindo o câncer, uma vez que podem refletir o estado da célula de origem da VEs (CHEN *et al.*, 2018; BONGIOVANNI *et al.*, 2021).

3. HIPÓTESE

Vesículas extracelulares do soro de cadelas com neoplasia mamária estão em maior concentração/mL e possuem conteúdo proteico diferenciado que podem ser considerados um marcador de malignidade tumoral.

4. OBJETIVOS

- Geral:
 - Isolar, caracterizar e comparar a concentração/mL de VEs do soro sanguíneo de cadelas acometidas ou não por neoplasias mamárias.
 - Caracterizar e comparar o perfil de proteínas de VEs séricas de cadelas saudáveis e com neoplasias mamárias.

5. REFERÊNCIAS

- AKERS, J. C. et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 113, n. 1, p. 1–11, 2 Maio 2013.
- ARBELAIZ, A. et al. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. **Hepatology**, v. 66, n. 4, p. 1125–1143, 2017.
- ARIYARATHNA, H. et al. Canine mammary gland disease in New Zealand: a review of samples from 797 dogs. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 70, n. 2, p. 95–100, 2021.
- BIONDI, L. R. et al. Canine mammary tumors in Santos, Brazil: clinicopathological and survival profile. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 252, 2014.
- BÖING, A. N. et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 23430, 8 jan. 2014.
- BONGIOVANNI, L. et al. Extracellular Vesicles: Novel Opportunities to Understand and Detect Neoplastic Diseases. **Veterinary Pathology**, 2021.
- BOUKOURIS, S.; MATHIVANAN, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 9, n. 3–4, p. 358–367, abr. 2015.
- BRADY, J. V. et al. A Preliminary Proteomic Investigation of Circulating Exosomes and Discovery of Biomarkers Associated with the Progression of Osteosarcoma in a Clinical Model of Spontaneous Disease. **Translational Oncology**, v. 11, n. 5, p. 1137–1146, 2018.
- BRENNAN, K. et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- BURRAI, G. P. et al. A statistical analysis of risk factors and biological behavior in canine mammary tumors: A multicenter study. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1–12, 2020.
- CANADAS, A. et al. Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 2, p. 208–219, 2019.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis, and treatment of feline mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 2, p. 38–69, 2013.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555–574, 2019.
- CHARGAFF, E.; WEST, R. The biological significance of the thromboplastic protein

- of blood. **The Journal of biological chemistry**, v. 166, n. 1, p. 189–97, nov. 1946.
- CHEN, I. H. et al. Analytical Pipeline for Discovery and Verification of Glycoproteins from Plasma-Derived Extracellular Vesicles as Breast Cancer Biomarkers. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 10, p. 6307–6313, 2018.
- CHOCTEAU, F. et al. Proposal for a Histological Staging System of Mammary Carcinomas in Dogs and Cats. Part 1: Canine Mammary Carcinomas. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, 7 Nov. 2019.
- CHOI, D. S. et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. **Proteomics**, v. 13, n. 10–11, p. 1554–1571, 2013.
- CLAYTON, A. et al. Analysis of antigen-presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 247, n. 1–2, p. 163–174, 2001.
- COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43–51, Feb. 2009.
- COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 255–289, 11 out. 2014.
- CRESCITELLI, R. et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, 2013.
- CUFARO, M. C. et al. Extracellular vesicles and their potential use in monitoring cancer progression and therapy: The contribution of proteomics. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.
- DOBRA, G. et al. Small extracellular vesicles isolated from serum may serve as signal-enhancers for monitoring cns tumors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 1–20, 2020.
- DOYLE, L.; WANG, M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 727, 15 jul. 2019.
- GALINDO-HERNANDEZ, O. et al. Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 3, p. 208–214, 2013.
- GARDINER, C. et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 5, n. 1, 2016.
- GARNICA, T. K. et al. Liquid biopsy based on small extracellular vesicles predicts the chemotherapy response of canine multicentric lymphomas. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- GEDON, J. et al. Canine mammary tumours: Size matters—a progression from low to highly malignant subtypes. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 19, n. 4, p. 707–713, 2021.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **Veterinary Record**, v. 146, n. 14, p. 403–406, 2000.

GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.

GOULD, S. J.; RAPOSO, G. As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2013.

GRAY, M. et al. Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. April, p. 1–17, 2020.

GUAN, F. et al. Simultaneous metabolomics and proteomics analysis of plasma-derived extracellular vesicles. **Analytical Methods**, v. 13, n. 16, p. 1930–1938, 2021.

GYÖRGY, B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 16, p. 2667–2688, 2011.

HARDING, C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 2, p. 329–339, 1 ago. 1983.

HARSHMAN, S. W. et al. Proteomic characterization of circulating extracellular vesicles identifies novel serum myeloma-associated markers. **Journal of Proteomics**, v. 136, p. 89–98, 2016.

JITPEAN, S. et al. Breed Variations in the Incidence of Pyometra and Mammary Tumours in Swedish Dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 347–350, 2012.

JOHNSTONE, R. M. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 70, n. 3–4, p. 179–190, 1 mar. 1992.

JORDAN, K. R. et al. Extracellular vesicles from young women's breast cancer patients drive increased invasion of non-malignant cells via the Focal Adhesion Kinase pathway: a proteomic approach. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 1–16, 2020.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, ago. 1972.

KULKA, M.; BRENNAN, K.; GEE, M. M. Investigation of canine extracellular vesicles in diffuse large B-cell lymphomas. **PLoS ONE**, v. 17, n. 9 September, p. 1–9, 2022.

KWON, J. Y. et al. Canine as a Comparative and Translational Model for Human Mammary Tumor. **Journal of Breast Cancer**, v. 26, n. 1, p. 1–13, 2023.

LEE, J.-K. et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress

Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e84256, 31 dez. 2013.

LOBB, R. J. et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p. 27031, 1 Jan. 2015.

LÖTVALL, J. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2014.

MISDORP W. Tumors of the mammary gland. In: **Tumors in domestic animals**. [s.l.] Ames: Blackwell., 2002. p. 575–606.

MISDORP, W.; HART, A. A. M. Prognostic Factors in Canine Mammary Cancer. JNCI: **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 4, p. 779–786, abr. 1976.

MONGUIÓ-TORTAJADA, M. et al. Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 12, p. 2369–2382, 2019.

NADHIYA, C. et al. Occurrence and pathology of canine mammary neoplasms- A prospective study. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 8, n. 4, p. 1498–1503, 2020.

OHNO, S. I. et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. **Molecular Therapy**, v. 21, n. 1, p. 185–191, 2013.

OWEN, L. N. **TNM Classification of tumors in domestic animals**. Geneva, 1980.

PAN, B.-T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 967–978, jul. 1983.

PARISET, E.; AGACHE, V.; MILLET, A. Extracellular Vesicles: Isolation Methods. **Advanced Biosystems**, v. 1, n. 5, p. 1–12, 2017.

PASTOR, N. et al. Epidemiological study of canine mammary tumors: Age, breed, size, and malignancy. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, v. 50, n. 3, p. 143–147, 2018.

PEREZ ALENZA, M. D. et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, n. 7, p. 287–291, 2000.

QUEIROGA, F. L. et al. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 1- 3 SPEC. ISS., p. 181–187, 2005.

RAIMONDO, F. et al. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. **Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 709–720, fev. 2011.

RISHA, Y. et al. The proteomic analysis of breast cell line exosomes reveals disease

- patterns and potential biomarkers. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.
- RONTOGIANNI, S. et al. Proteomic profiling of extracellular vesicles allows for human breast cancer subtyping. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, 2019.
- ROSA-FERNANDES, L. et al. A perspective on extracellular vesicles proteomics. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. NOV, p. 1–19, 2017.
- ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 380–388, 2011.
- SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249–61, dez. 1969.
- SILVA, H. D. C. et al. Epidemiology of Canine Mammary Gland Tumours in Espírito Santo, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, 28 jan. 2019.
- SORENMO, K. U. et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 162–172, 2009.
- SORENMO, K. U. *et al.* Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.
- SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. **Tumors of the Mammary Gland**. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 538–556.
- SUN, Y. *et al.* Systematic comparison of exosomal proteomes from human saliva and serum for the detection of lung cancer. **Analytica Chimica Acta**, v. 982, p. 84–95, 2017.
- SZAJNIK, M.; DERBIS, M.; LACH, M. Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy. **Gynecology & Obstetrics**, p. 1–11, 2013.
- TAURO, B. J. et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 56, n. 2, p. 293–304, Feb. 2012.
- THÉRY, C. et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 1–29, 2006.
- THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, 2018.
- TIAN, F. et al. Protein analysis of extracellular vesicles to monitor and predict therapeutic response in metastatic breast cancer. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2021.

- TOMIYAMA, E. et al. Proteomic analysis of urinary and tissue-exudative extracellular vesicles to discover novel bladder cancer biomarkers. **Cancer Science**, v. 112, n. 5, p. 2033–2045, 2021.
- TONITI, W. et al. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 10, n. 5, p. 907–11, 2009.
- TROYER, R. M. et al. Exosomes from Osteosarcoma and normal osteoblast differ in proteomic cargo and immunomodulatory effects on T cells. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 2, p. 369–376, 2017.
- TUTANOV, O. et al. Proteomic Profiling of Plasma and Total Blood Exosomes in Breast Cancer: A Potential Role in Tumor Progression, Diagnosis, and Prognosis. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. October, p. 1–16, 2020.
- VADER, P. et al. Extracellular vesicles for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 106, p. 148–156, nov. 2016.
- VAN DER POL, E. et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 12, p. 2596–2607, 2010.
- VAN DEUN, J. et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2014.
- VIDAL, M. Exosomes: Revisiting their role as “garbage bags”. **Traffic**, 2019.
- VON EULER, H. Tumors of the mammary gland. In: DOBSON, J.M.; LASCELLES, B. (Ed.). **BSAVA manual of canine and feline oncology**. 3. ed. [s.l.] Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2011. p. 237–247.
- WEINMAN, M. A. et al. Exosomal proteomic signatures correlate with drug resistance and carboplatin treatment outcome in a spontaneous model of canine osteosarcoma. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2021.
- WOLFERS, J. et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. **Nature Medicine**, v. 7, n. 3, p. 297–303, mar. 2001.
- XU, K. et al. Altered protein profile of plasma extracellular vesicles in oral squamous cell carcinoma development. **Journal of Proteomics**, v. 251, p. 104422, 2022.
- ZATLOUKAL, J. et al. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. **Acta Veterinaria Brno**, v. 74, n. 1, p. 103–109, 2005.
- ŻMIGRODZKA, M. et al. Extracellular Vesicles in the Blood of Dogs with Cancer—A Preliminary Study. **Animals**, v. 9, n. 8, p. 575, 19 ago. 2019.

CAPÍTULO 2

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

**PROTEOMIC APPROACH OF SERUM EXTRACELLULAR VESICLES CARGO IN
BITCHES WITH MAMMARY TUMORS**

(Artigo redigido segundo as normas da revista Journal of Proteome Research
https://publish.acs.org/publish/author_guidelines?coden=jprobs)

*Gabriela C. Sousa[†], Marcos G. Carvalho[†], Carlos E. Fonseca-Alves[†] e Fabiana F.
Souza^{*†}*

[†] Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ, Universidade Estadual Paulista -
UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

ABSTRACT

This study aimed to characterize the size, format, and concentration of the serum EVs in dogs and 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. 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 ± 0.33 ; 10.1 ± 0.60 ; 12.1 ± 0.70 years), body weight (16.2 ± 2.5 ; 17.9 ± 3.6 ; 10.9 ± 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 ± 6.0 ; 129.3 ± 4.0 ; 125.5 ± 6.1 nm) between GC, GI, and GII, respectively. We found a total of 91 proteins in our samples enriched with EVs, and 6 of these proteins presented difference among the groups (FDR < 0.05). *Keratin 18* was up regulated in GI, while *sushi domain-containing protein*, *EvC ciliary subunit 2* and *joining chain of multimeric IgM and IgA* were upregulated in GII. Finally, *protocadherin 17* and *albumin* were the proteins upregulated in GI and GII. 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 tumor suppressors genes 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 biomarkers for the canine mammary neoplasia.

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

45 **INTRODUÇÃO**

46 A neoplasia mamária é o tipo mais comum de câncer encontrado em
47 cadelas, sendo uma das principais causa de morte nesta espécie (PASTOR et al.,
48 2018; BURRAI et al., 2020; ARIYARATHNA et al., 2021). Este tipo de câncer
49 demonstra malignidade entre 53 e 60% dos casos, sendo no Brasil observada entre
50 67 e 89% (BIONDI et al., 2014; PASTOR et al., 2018; SILVA et al., 2019). Panorama
51 semelhante é observado em mulheres, em 2020 cerca de 2,3 milhões de mulheres
52 foram diagnosticadas e 685.000 morreram em decorrência do câncer de mama em
53 todo o mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Em vista dessa
54 alta ocorrência, estudos que buscam identificar biomarcadores relacionados a
55 neoplasias mamárias vêm tendo cada vez mais destaque.

56 Na oncologia humana, recentes estudos, identificaram biomarcadores,
57 contidos em vesículas extracelulares (VEs), nanopartículas com dupla membrana
58 lipídica e formato esférico, que podem auxiliar no diagnóstico precoce,
59 estadiamento, prognóstico e monitoramento de diversos tipos de câncer, uma vez
60 que estas podem refletir o estado da célula de origem (CHEN et al., 2018; TIAN et
61 al., 2021). Além de ter como conteúdo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, que
62 são produzidos pela célula progenitora, as VEs podem ainda ser isoladas em
63 tecidos, e fluidos corporais como plasma e soro sanguíneo, saliva, urina e leite
64 (BOUKOURIS; MATHIVANAN, 2015; SUN et al., 2017; TOMIYAMA et al., 2021).

65 O uso de VEs como biomarcadores tem como vantagem a sua maior
66 estabilidade devido a proteção pela membrana bilipídica, prevenindo a degradação
67 de seu conteúdo por lipases e proteases, e apesar de ser uma nanopartícula, a
68 elevada quantidade de VEs nos fluidos corporais, indica maior concentração de
69 biomarcadores, quando comparada à de biomarcadores livres, sendo assim capaz
70 de auxiliar no monitoramento de doenças (BOUKOURIS; MATHIVANAN, 2015;
71 DOBRA et al., 2020; TOMIYAMA et al., 2021).

72 As VEs têm importantes funções em processos metabólicos, comunicação
73 intercelular, reparo tecidual, regulação e supressão da resposta imune podem
74 auxiliar a elucidar diversos processos fisiológicos (WOLFERS et al., 2001;
75 COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). Na oncologia, as VEs já demonstraram ter

76 papel na carcinogênese, promovendo a comunicação intercelular pela expressão
77 de fatores implicados no crescimento e proliferação tumoral como TGF- β , VEGF e
78 SDF-1. Além disso, estão envolvidas na formação do microambiente tumoral,
79 imunomodulação e transporte de informações pró-metastáticas (LEE et al., 2013;
80 COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; HARSHMAN et al., 2016).

81 O conteúdo dessas VEs pela estabilidade e abundância têm despertado
82 interesse dos pesquisadores para identificação de biomarcadores que possam, no
83 futuro, ter aplicabilidade na rotina clínica. O perfil proteico de VEs obtidas de tecidos
84 neoplásicos em mulheres foi correlacionado com o subtipo de neoplasias mamárias,
85 sendo um importante avanço para o diagnóstico por métodos não invasivos
86 (RONTOGIANNI et al., 2019). Já o perfil proteico de VEs do sangue total e do
87 plasma de mulheres com câncer de mama sugeriu, como potenciais biomarcadores
88 prognósticos, as proteínas serpina 1, KRT6B e SOCS3 como favoráveis e a IGF2R
89 como desfavorável (TUTANOV et al., 2020).

90 Na veterinária, pesquisas com VEs, mesmo que ainda não tão numerosas,
91 têm demonstrado uma área ampla e promissora a ser explorada. Em células de
92 linhagens de um dos principais tipos de câncer em cães, o osteossarcoma, foram
93 identificadas proteínas associadas a imunomodulação como a α -feto proteína, o
94 TGF β , HSP90 e HSP70 de forma mais abundante nas linhagens neoplásicas
95 quando comparada a linhagens não-neoplásicas, e o TGF β foi encontrado apenas
96 em exossomos das linhagens neoplásicas (TROYER et al., 2017). Já em estudo *in*
97 *vivo*, de cães com osteossarcoma identificou mais de 170 proteínas em VEs séricas,
98 correlacionadas com proteólise, regulação do sistema imune, ativação da resposta
99 ao estresse e regulação de processos metabólicos (BRADY et al., 2018).

100 A concentração de VEs circulante nos biofluidos também tem sido alvo de
101 investigações, uma vez que possibilita o estudo por um método minimamente
102 invasivo. No plasma sanguíneo de cães com neoplasias de várias origens foram
103 encontradas uma maior abundância de VEs, quando comparadas com animais
104 saudáveis (ŻMIGRODZKA et al., 2019b). Uma maior abundância de VEs isoladas
105 do plasma sanguíneo de cães com linfoma e adenocarcinoma em relação a animais
106 saudáveis também foi observada, além disso, nesse mesmo estudo animais com

linfoma apresentaram VEs de tamanho menor que animais com saudáveis (KULKA; BRENNAN; GEE, 2022).

Em neoplasias mamárias ainda há poucos estudos com VEs, entretanto, essas nanopartículas derivadas de linhagens de neoplasias mamárias já foram isoladas e caracterizadas em cães e gatos (SAMMARCO et al., 2018), e ademais, tiveram diferentes métodos de isolamento comparados suas funções autócrinas avaliadas (MOCCIA et al., 2022).

Em vista do exposto e considerando o amplo campo de pesquisa a ser explorado com neoplasias mamárias e VEs, este estudo objetivou, de forma inédita, isolar, caracterizar e comparar o perfil proteico das VEs do soro sanguíneo de cadelas acometidas com tumor de mama.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e obtidos das empresas Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), GE Healthcare Life Science (São Paulo, São Paulo, Brasil), Waters Corp. (Barueri, São Paulo, Brasil) e Thermo Fisher Scientific (São Paulo, São Paulo, Brasil), quando não foram citados.

Preceitos éticos

O estudo foi conduzido de acordo com os preceitos éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) institucional sob o número de protocolo 0166/2021.

Seleção dos animais e colheita das amostras

Foram selecionadas 30 cadelas de acordo com o grau de evolução e estadiamento do tumor de mama. Os critérios de inclusão nos grupos de cadelas com neoplasia foram animais com idade superior a 4 anos, de todas as raças e que apresentassem um ou múltiplos nódulos mamários, castrados ou não e sem histórico de outras neoplasias ou doenças concomitantes. Os animais destes

grupos foram previamente triados por citologia aspirativa para identificar a origem da neoplasia e, posteriormente, foram submetidos a cirurgia de mastectomia unilateral no setor de Reprodução Animal do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil. Após a mastectomia e identificação das características histológicas da neoplasia, os grupos foram divididos. Os critérios de inclusão dos animais do grupo controle foram fêmeas jovens (até 4 anos de idade), saudáveis, sem histórico de neoplasias e que foram submetidos a ovariectomia eletiva na mesma instituição.

Como parte do protocolo do Setor de Reprodução Animal, os animais que foram submetidos a mastectomia realizaram radiografia torácica para pesquisa de metástase e eletrocardiograma. Além disso, o sangue foi colhido de todos os animais do grupo controle e grupos com neoplasia para realização de hemograma e perfil bioquímico renal e hepático. Todos os tutores responderam a um questionário contendo informações sobre o estado geral do animal, tempo de evolução dos nódulos mamários, *status* reprodutivo, histórico de doenças reprodutivas ou não, administração de contraceptivos e outras medicações, além de assinarem um termo de consentimento e esclarecimento para inclusão do animal no estudo. O sangue para separação das VEs foi colhido da veia jugular no transoperatório dos procedimentos de mastectomia ou ovariectomia.

Histopatologia, classificação dos tumores e divisão dos grupos

Todas as cadeias mamárias excisadas cirurgicamente foram enviadas ao serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Botucatu, São Paulo. Os nódulos mamários foram submetidos a análise histológica e foram classificados de acordo com as características descritas por Goldschmidt et al. (2011), Cassali et al. (2013) e (2019). Em animais com mais de um nódulo na mesma cadeia mamária, sempre foi considerada a neoplasia de maior complexidade, para divisão dos grupos de neoplasia.

As cadelas foram então separadas em 3 grupos, (GI) com tumores grau I e II (n = 13), (GII) com neoplasias grau III (n = 7) e grupo controle (GC) (n = 10). A

definição dos grupos GI e GII foi baseada nos resultados do exame histopatológico do tumor mamário (CASSALI et al., 2019a) após a ressecção cirúrgica.

Isolamento das VEs

Após a colheita do sangue foram aguardados 15 a 20 minutos para a formação de coágulo, e em seguida iniciou uma série de 4 centrifugações. A primeira centrifugação (Celm, Ls4, Barueri, São Paulo, Brasil) foi a 716,8xg por 10 minutos em temperatura ambiente. O soro (sobrenadante) foi recolhido e centrifugado novamente a 4 °C, por 3 vezes (Eppendorf® 5810r, Hamburgo, Alemanha) para retirada de debris celulares e partículas maiores (300xg/10 minutos, 2000xg/10 e 16.500xg/30 minutos) seguindo o protocolo de THÉRY et al. (27). Após a última centrifugação, o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer a -80 °C para posterior isolamento das vesículas extracelulares.

O isolamento das VEs foi realizado por cromatografia de exclusão de tamanho, usando uma coluna de cromatografia comercial (qEV original35 nm Gen. 2, Izon Science LTDA, Christchurch, Nova Zelândia). Brevemente, a válvula de gotejamento foi aberta para permitir que o líquido contido na coluna fosse reduzido até próximo a fase estacionária. Então, 15 mL de tampão fosfato salina da fase móvel (137 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl, 10 mmol Na₂HPO₄, 2 mmol KH₂PO sem Ca⁺² ou Mg⁺²) foi adicionado sobre a fase estacionária para lavagem inicial. Da mesma forma, foi permitido o gotejamento do PBS, até próximo da fase estacionária, quando foi adicionado 500 µL da amostra de soro. Após o gotejamento de toda amostra, outra alíquota de PBS foi adicionada para dar continuidade ao processo de separação. Após a adição da amostra na coluna, 3 mL foram colhidos e descartados (void), uma vez, que nesse método, as partículas maiores são as primeiras a passarem pela coluna. A seguir, 2 mL foram colhidos e armazenados, já que esse volume contém as partículas menores.

Após a colheita das VEs, as colunas foram lavadas com 15 mL de PBS, acrescidas de 20 mL de solução de 7,7 mmol de azida sódica e conservadas em geladeira para reutilização. As amostras obtidas da coluna foram mantidas em gelo até a quantificação e caracterização das VEs.

Quantificação e caracterização das VEs

Para a caracterização das VEs foram utilizadas a quantificação e caracterização por tamanho pelo método de rastreamento de nanopartículas. O tamanho das VEs também foi confirmado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET), ambas as metodologias foram de acordo com De Ávila et al. (2020) e Garnica et al. (2020). Brevemente, após o isolamento das VEs, as amostras foram diluídas 1:20 e 1:4000 em PBS e uma alíquota foi utilizada para o rastreamento de nanopartículas (NanoSight NS 300, Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido). Cinco vídeos de 30 segundos foram capturados com o nível 12 na câmera, utilizando entre 20 e 100 partículas por quadro e temperatura controlada de 38,5 °C. As imagens capturadas foram analisadas pelo software específico (NanoSight NTA 3.4, Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido).

Para a MET, as amostras foram concentradas por ultracentrifugação a 120.000 xg, durante 70 minutos, a 4 °C (Ultracentrifuga Optima XE-90; rotor 70 Ti; Beckman Coulter, Brea, California, EUA), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 50 µL de PBS, seguido da adição de 400 µL de fixador (Cacodilato de sódio a 0,1mmol, glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% com pH 7.2–7.4) e incubado por 2 horas na temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 2 mL de PBS e a amostra foi novamente ultracentrifugada na mesma velocidade, tempo e temperatura. Novamente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 100 µL de água ultrapura (MilliQ). As amostras foram refrigeradas até a análise. Para a MET, a solução contendo as VEs foi colocada em grade de cobre por 20 minutos em temperatura ambiente, acrescida de 2% de acetato de uranila analisada em microscópio eletrônico de transmissão (FEI Tecnai 20; LAB6 emission; 200 kV, Hillsboro, Oregon, EUA).

Preparo das amostras para espectrometria de massas

Após o isolamento das VEs, as proteínas foram preparadas para espectrometria de massas. Para extração das proteínas das VEs séricas foram

utilizadas $1,2 \times 10^{10}$ partículas/1,5 mL de tampão. As amostras de VEs séricas foram acrescidas de tampão RIPA (150 mmol NaCl, 1% de Triton X-100, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS em 50 mmol de TRIS-HCl pH 7,5, (PEACH; MARSH; MACPHEE, 2012) contendo inibidores de proteases (0,8 mmol EDTA, 1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina e 35 µg/mL PMSF [phenylmethylsulfonil fluoride] em 50 mmol Tris-HCl pH 7,2 (BOLLAG, et al., 1996). As amostras foram sonicadas seguindo o protocolo proposto por Souza et al. (2009), seguida da centrifugação a 10.000xg por 30 minutos a 4 °C. Após a sonicação e centrifugação as amostras foram concentradas em ultrafiltro (Amicon® 3 kDa, Merck-Sigma Aldrich, Sant Louis, Michigan, EUA) por 3 vezes a 4 °C (2x a 14.000xg/30 minutos e 1x a 14.000xg/10 minutos), sendo o volume final de 120 µL. Posteriormente, o volume foi lavado com solução de 50 mmol de bicarbonato de amônia (AmBic) em tubo ultrafiltro por 5 vezes, a 14.000xg, por 10 minutos, a 4 °C conforme orientações do fabricante.

A seguir a concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford utilizando nanoespectrofotômetro (NanoDrop™ One/One, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), usando conhecidas concentrações de albumina sérica bovina para estabelecer uma curva padrão. Após a determinação da concentração de proteínas totais, as amostras foram preparadas para eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, com gel de separação a 10%, utilizando 25 µg. A corrida foi interrompida quando as amostras atingiram o gel de separação. O gel foi fixado (40% etanol e 10% ácido acético glacial) e corado por 12 horas com azul de Coomassie G-250 (solução estoque: 2% de ácido fosfórico a 85%, 10% de sulfato de amônia, 0,1% de coomassie G-250 e 500 mL de água ultrapura; solução trabalho 80% de solução estoque e 20% de metanol). Então, as amostras foram digeridas utilizando protocolo proposto por Shevchenko et al. (34), com modificações. As bandas únicas foram recortadas e a descoloração foi realizada 5 vezes com 50% de acetonitrila 50% em 25 mmol de bicarbonato de amônia (AmBic). Os fragmentos de gel foram desidratados com 100% de acetonitrila. A redução das pontes dissulfeto foi conduzida com 20 mmol de DTT em 50 mmol de AmBic e a alquilação com 55 mmol de iodoacetamida em 50 mmol de AmBic. A seguir a digestão foi realizada com tripsina (1: 25

substrato/tripsina) (Promega Trypsin, *Part* No V511, 20 ng/μL) durante 14 horas. Após este período a tripsina foi bloqueada com 5% de ácido fórmico (96%) em 50% de acetonitrila. Os peptídeos foram eluídos com 1% de ácido fórmico (96%) em 60% de metanol, e posteriormente com 50% de ácido fórmico (96%) em 50% de acetonitrila. O volume das amostras foi reduzido (Speed Vac™, SPD1010 Integrated SpeedVac™ Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA) e armazenados a -80 °C até a espectrometria de massas.

Para a espectrometria de massas as amostras foram descongeladas e diluídas em ácido fórmico a 0,1% (0,7 μg de proteína/ μL) e centrifugadas a 1.100xg por 5 minutos. Em seguida 15 μL do sobrenadante foi colocado em tubo específico com tampa de rosca para a análise no espectrômetro de massas (Clear glass 12 x 32 mm, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). Em seguida uma alíquota de 4,5 μL foi separada em uma coluna C18 (100 μm x 100 mm) de cromatografia (nanoACQUITY UPLC®, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) acoplada a um espectrômetro Q-Tof (Micromass® Q-Tof PREMIER® Mass 12 Spectrometer, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) com fonte de *electrospray* com um fluxo de 0,60 μL/minuto, com voltagem mantida a 3,5 kV, e um cone de voltagem de 30V e temperatura de 100 °C. O gradiente de acetonitrila (2-90%) em 0,1% de ácido fórmico foi mantido por 45 minutos. O equipamento foi operado em *top three mode*, no qual um espectro MS foi adquirido, seguido por MS/MS dos 3 mais intensos picos detectados. Após a fragmentação MS/MS, os íons foram colocados numa lista de exclusão por 60 segundos.

Para os parâmetros de busca foram utilizados a tripsina como protease, 1 clivagem permitida, a carboxamidometilação da cisteína como modificação fixa, a oxidação metionina como modificação variável, tolerância de erro de 1 Da para ambos os íons de espectro de massa (MS) e fragmento de massa (MS/MS), e massa molecular monoisotopa.

Os espectros foram adquiridos usando o software MassLynx™ v.4.1 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) e os dados brutos convertidos para uma lista com picos (.mgf) sem adição dos *scans* e analisados pelo software Mascot Distiller 2.4.0.0 (Matrix Science Inc., Boston, Massachusetts, EUA) para obter a

quantificação relativa de cada proteína na mistura foi determinada pelo *exponentially modified protein abundance index* (emPAI) (ISHIHAMA et al., 2005) (ISHIHAMA et al., 2005) . Os resultados foram buscados na base de dados UniProt KB (www.uniprot.org/) com a taxonomia *Canis lupus familiaris* (UP000002254). Em seguida os resultados foram analisados no software Protein Pilot 4.0 (AB Sciex, Framingham, Massachusetts, EUA) para validação dos espectros de massas e identificação das proteínas.

Análise estatística

As variáveis concentração e tamanho das VEs descritas pela média e erro padrão, e analisadas pelo software Sigma Plot v.11.0. As variáveis foram submetidas ao teste normalidade de Smirnov Komolgorov e teste de Levene para avaliar a igualdade das variâncias. A comparação do tamanho das VEs entre os grupos foi conduzida pelo ANOVA *one way* e para as comparações múltiplas foi utilizado o teste de Tukey. Já para análise da concentração de VEs foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e para comparações múltiplas o teste de Tukey. As variáveis foram descritas pela média $\pm$ erro padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Os dados foram normalizados para excluir as proteínas que não representasse a população. Desta maneira, proteínas que não estavam presentes em pelo menos 40% das amostras em cada grupo, foram consideradas ausentes no grupo e se a mesma situação ocorreu em todos os grupos, a proteína foi excluída da análise. Os outliers foram corrigidos por dividir o emPAI de cada proteína de cada amostra pela somatória dos emPAIs da mesma proteína de todas as amostras. Para análise dos resultados da proteômica utilizou-se a clusterização não-hierárquica da análise multivariada no software MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca/) (XIA; WISHART, 2016). Foi obtida a análise de componentes principais (PCA) para descrever a variação da amostra na matriz de pontuação. Um *heatmap* foi construído para a comparação dos grupos. ANOVA foi usada para determinar a diferença entre os grupos, utilizando o teste de Fisher LSD, considerando como valores significativos quando *false discovery rate* (FDR) foi <

0,05. As funções moleculares, processos biológicos e componente celular das proteínas foi descrito utilizando o UniProt (<https://www.uniprot.org>).

RESULTADOS

As neoplasias foram classificadas histologicamente para definição dos grupos e estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

A média $\pm$ erro padrão da idade das cadelas do GC foi de $1,95 \pm 0,33$ anos, do GI de $10,07 \pm 0,60$ anos e do GII de $12,10 \pm 0,70$ anos. Já o peso médio $\pm$ erro padrão foi $16,2 \pm 2,4$ kg, $10,1 \pm 3,6$ kg e $10,9 \pm 3,3$ kg, respectivamente para o GC, GI e GII.

Os tutores das cadelas com neoplasia (GI e GII) afirmaram ter usado progestágenos em 5% (1/20) dos animais, 70% (15/20) informaram nunca ter feito uso e 25% (4/20) não souberam informar.

A concentração de VEs não variou entre os grupos ($P = 0,124$). A média $\pm$ erro padrão da concentração de VEs do GC foi de $5,5 \pm 4,4 \times 10^{12}$ partículas/mL, do GI foi de $1,32 \pm 0,66 \times 10^{12}$ partículas/mL e para o GII foi $1,06 \pm 0,88 \times 10^{12}$ partículas/mL (Figura 1).

Para análise do tamanho das partículas foi utilizada a moda e a média $\pm$ erro padrão no GC foi $136,2 \pm 6,0$ nm, no GI $129,3 \pm 4,0$ nm e GII $125,5 \pm 6,1$ nm. Também não houve diferença estatística entre os grupos para o tamanho das partículas ($P = 0,396$). Na caracterização das VEs na microscopia eletrônica foram encontradas partículas de formato esférico/oval (Figura 2).

Na espectrometria de massas das proteínas de VEs foram identificadas 91 proteínas em todos os grupos (Figura 3). A PCA (Figura 4A) e dendrograma (Figura 4B) indicaram uma sobreposição dos grupos, com destaque para o grupo controle. Os resultados da análise univariada (ANOVA) indicaram 6 proteínas diferente abundância entre os grupos ($FDR < 0,05$, Figura 5). A proteína *keratin 18* (A0A8I3PJ84) foi a mais abundante no GI, enquanto GII apresentou as proteínas *CABP4* (A0A8I3ML63), *EvC ciliary complex subunit 2* (A0A8I3MIA3) e *joining chain of multimeric IgA e IgM* (A0A8I3RW25) como as proteínas em maior abundância. Já as proteínas *protocadherin 17* (A0A8I3PDN1) e *albumin* (A0A8I3MY51) foram as

355 mais abundantes em ambos os grupos compostos por animais com neoplasias (GI
356 e GII) (Figura 6).

357

Tabela 1. Descrição da raça, *status* reprodutivo, resultado do exame histopatológico da neoplasia mamária e estadiamento das cadelas do GI (n = 13).

Raça	Status reprodutivo	Histopatológico	Estadiamento
Sem raça definida	Castrada	Carcinoma em tumor misto grau I Carcinoma misto grau I Carcinoma complexo grau I	I
Shi-tzu	Castrada	Carcinoma misto grau I Ectasia ductal	I
Dachshund	Castrada	Carcinoma sugerindo misto benigno Tumor misto benigno Adenoma complexo	II
Sem raça definida	Castrada	Carcinoma tubular grau II	II
Lhasa-Apso	Não castrada	Carcinoma complexo grau I Carcinoma em tumor misto grau I	III
Pastor alemão	Não castrada	Carcinoma em tumor misto grau II	III
Labrador	Castrada	Carcinoma complexo grau I	III
Sem raça definida	Não castrada	Carcinoma complexo grau I Carcinoma tubular grau I	III
Sem raça definida	Não castrada	Carcinoma complexo grau I Carcinoma complexo grau II	III
Pastor Alemão	Não castrada	Carcinoma em tumor misto grau I Carcinoma complexo grau II	IV
Poodle	Castrada	Hiperplasia lobular Carcinoma rico em lipídio	IV
Sem raça definida	Não castrada	Carcinoma complexo grau I Carcinoma em tumor misto grau I	IV
Lhasa-Apso	Castrada	Carcinoma tubulopapilífero intraductal grau I Carcinoma complexo grau I Carcinoma micropapilífero grau I Adenoma complexo associado a mastite	IV

361 **Tabela 2.** Descrição da raça, *status* reprodutivo, resultado do exame
 362 histopatológico da neoplasia mamária e estadiamento das cadelas do GII (n = 7).

Raça	Status reprodutivo	Histopatológico	Estadiamento
Cocker Spaniel	Castrada	Comedocarcinoma com área focalmente extensa de carcinoma micropapilar grau I Carcinoma complexo grau I	I
Lhasa Apso	Castrada	Carcinoma sólido grau III	III
Sem raça definida	Castrada	Carcinoma misto sólido grau II Adenoma associado a epiteliomose com metaplasia escamosa com área focal de carcinoma sólido intraductal I Adenoma complexo Carcinoma e mioepitelioma maligno grau II	III
Dachshund	Castrada	Adenoma tubular com área focal de carcinoma invasor Adenoma complexo	IV
Maltês	Castrada	Carcinoma complexo grau I Carcinoma cribriforme grau II	IV
Sem raça definida	Não castrada	Carcinoma sólido grau III Carcinoma sólido grau III	IV
Boiadeiro australiano	Não castrada	Osteossarcoma mamário Carcinoma tubulopapilífero grau I	IV

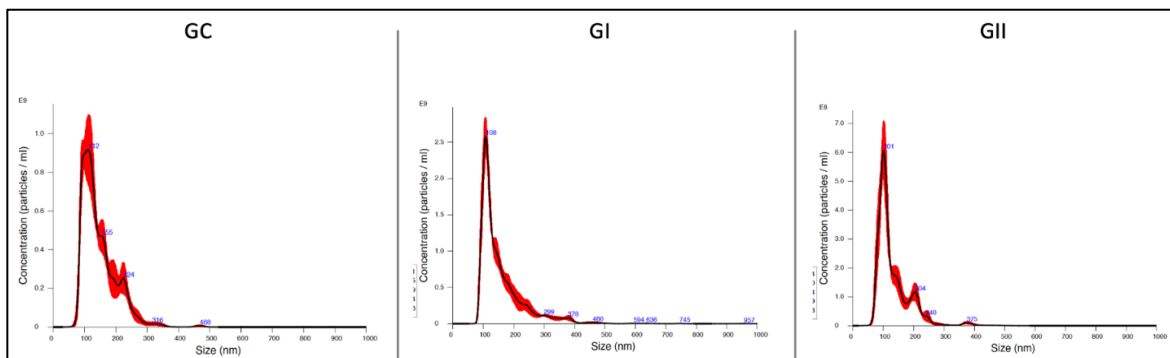


Figura 1. Gráfico demonstrativo da análise de tamanho em nm de VEs realizado por rastreamento de nanopartículas (NanoSight). VEs isoladas do GC, GI e GII com partículas de tamanho entre 30 e 150 nm de diâmetro.

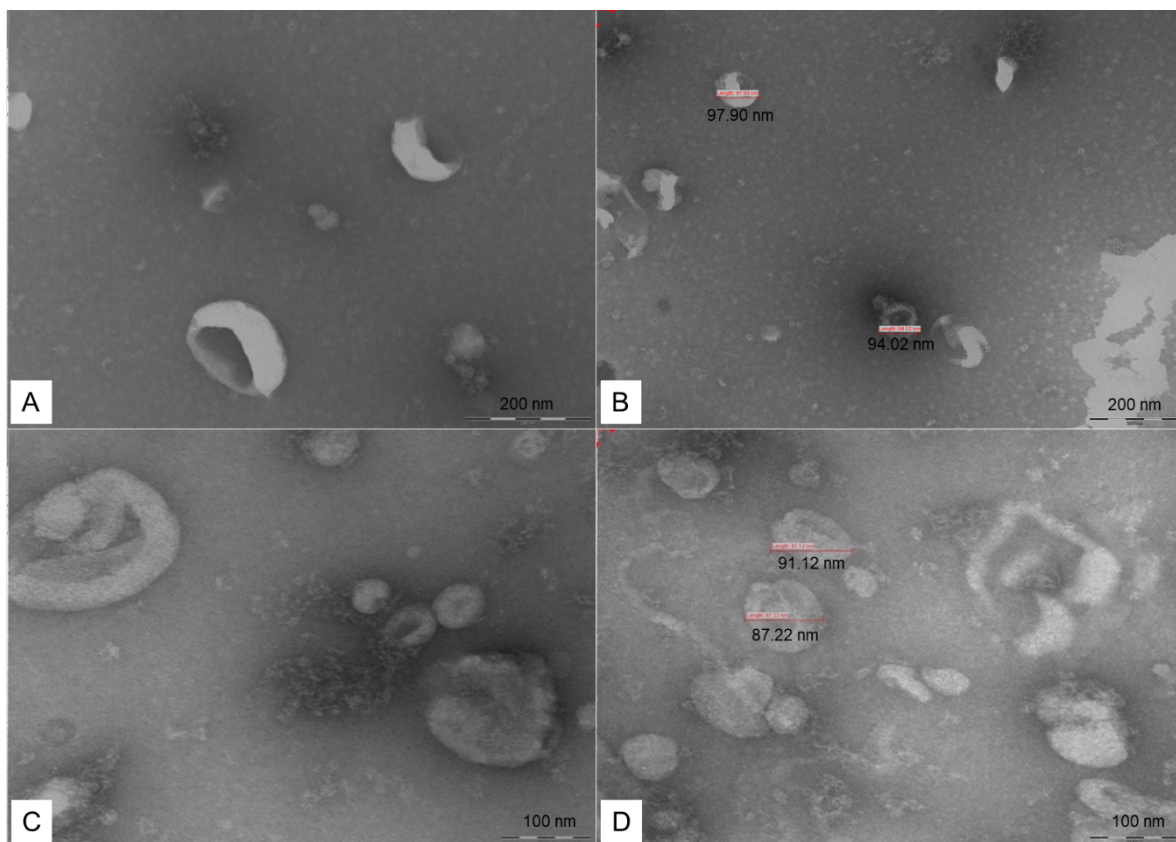


Figura 2. Imagem da MET de VEs separadas do soro de cadelas. Note o formato esférico/oval e as medidas que estão entre 30 e 150 nm.

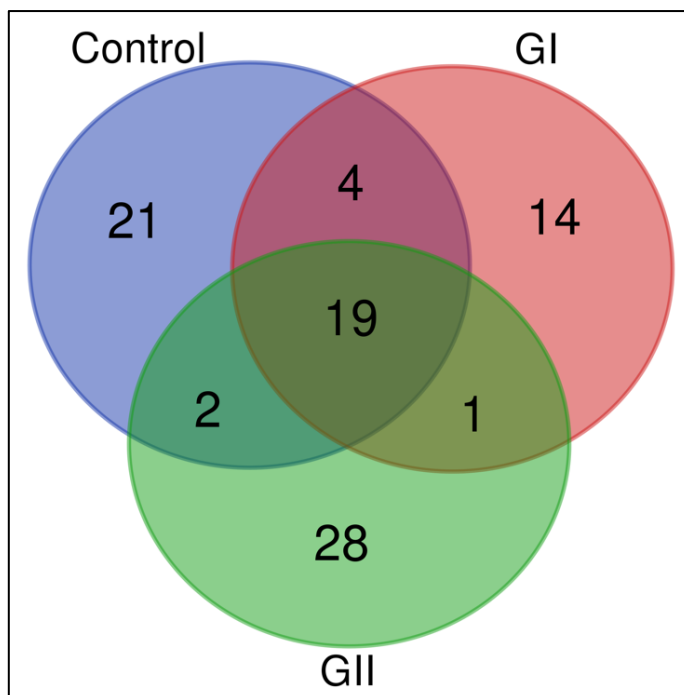


Figura 3. Diagrama de *Venn* representando as proteínas encontradas nos grupos controle, GI e GII.

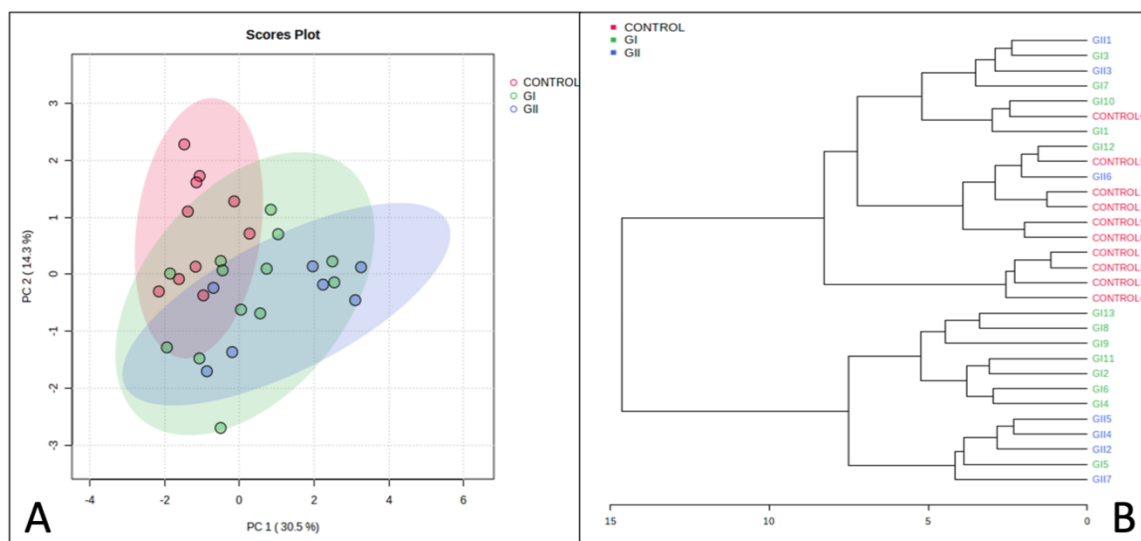


Figure 4. (A) Análise de componente principal e (B) dendrograma de proteínas dos grupos controle, GI e GII.

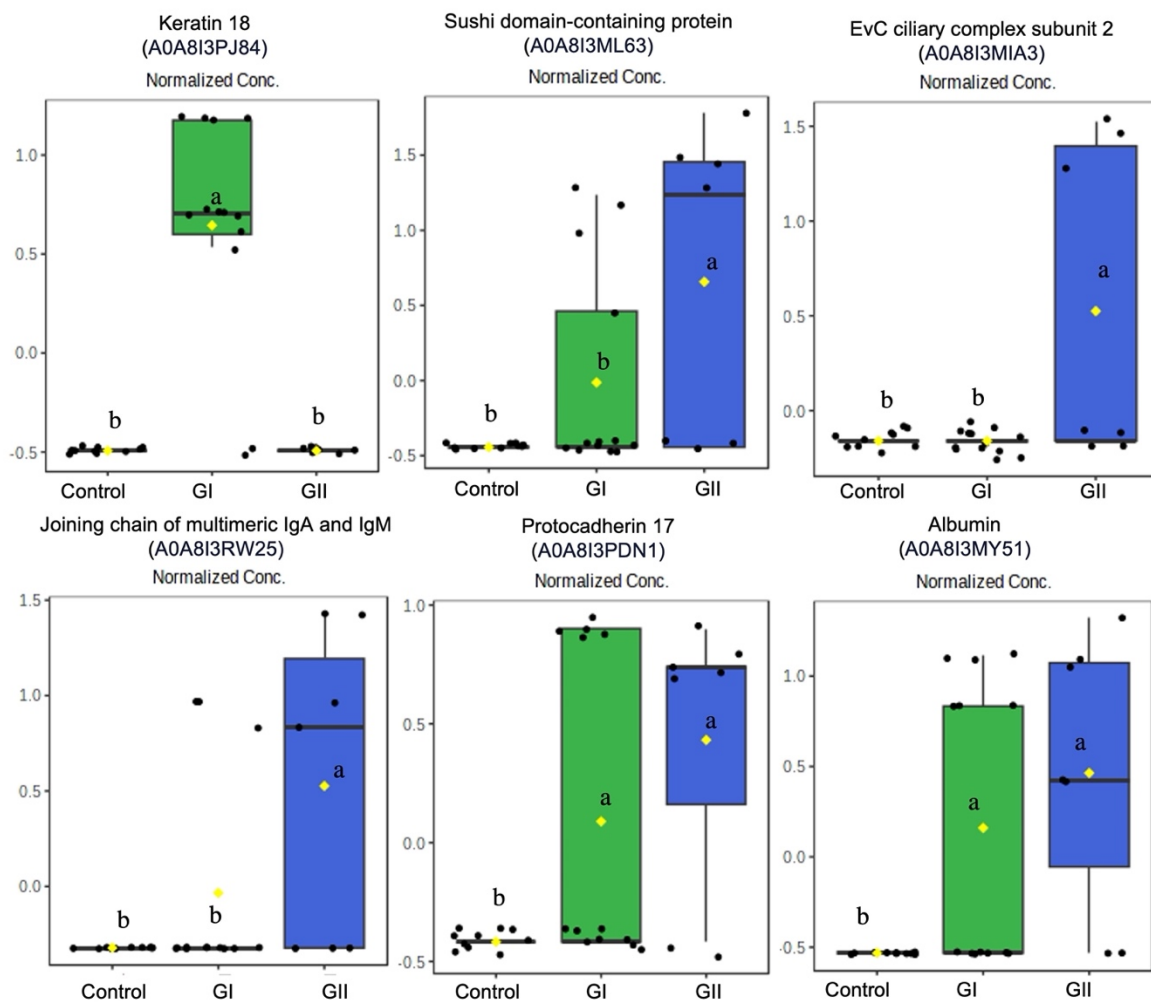


Figure 5. Concentração de proteínas alteradas positivas e negativamente. letras iguais representam ausência de diferença, e letras diferentes representam diferença estatística FDR <0,05.

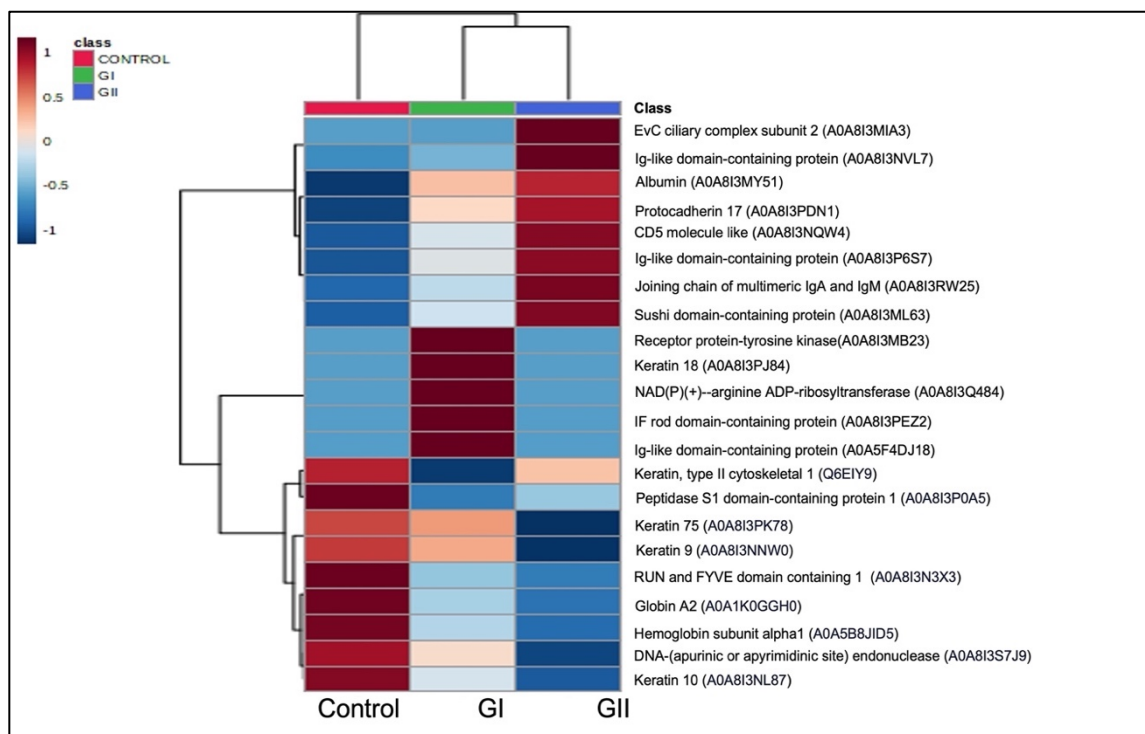


Figure 6. Heat map demonstrando a abundância relativa de proteínas em cada grupo, sendo vermelha representando uma maior abundância e a cor azul, menor abundância de proteína.

DISCUSSÃO

Esse estudo foi desenvolvido com objetivo de investigar as VEs do soro sanguíneo de cadelas acometidas pela neoplasia mamária e sua relação com a malignidade da doença, a fim de encontrar biomarcadores por um método minimamente invasivo, ou sugerir possíveis alvos terapêuticos.

Os animais foram divididos em subgrupos de acordo com grau de diferenciação das neoplasias de maior agressividade na tentativa de agrupar os subtipos histológicos de características mais similares, baseada na literatura (GOLDSCHMIDT et al., 2011; CASSALI et al., 2019b). O grande número de subtipos é um fator importante em estudos com neoplasias mamárias em cadelas, uma vez que torna difícil a padronização dos resultados encontrados nas populações (RASOTTO et al., 2017; CASSALI et al., 2019b). As neoplasias mamárias acometem principalmente mulheres acima de 55 anos e cadelas de meia idade e idosas (SORENMO, 2003; PASTOR et al., 2018). Nas cadelas, os fatores de risco,

além da idade, incluem o *status* reprodutivo e fatores genéticos que parecem predispor o aparecimento da neoplasia em determinadas raças (ARIYARATHNA et al., 2021). Nesse estudo a idade média das cadelas acometidas por neoplasias foram de acordo com os resultados de outros estudos, que encontraram maior ocorrência em animais na faixa etária entre 8 e 10 anos (PASTOR et al., 2018; BURRAI et al., 2020; ARIYARATHNA et al., 2021).

O peso médio das cadelas com neoplasias mamárias pode variar de acordo com a população estudada (PÉREZ ALENZA et al., 1997; GEDON et al., 2020), nossos resultados para a média de peso dos grupos neoplasia foram 10,1 e 10,9 kg, contudo uma limitação do estudo foi a ausência de classificação individual do *score* de condição corporal, o qual poderia determinar a real condição da fêmea e a classificação em magro, peso adequado, sobrepeso ou obeso. Este parâmetro pode ser importante e é pouco mencionado em estudos na medicina veterinária, mas em mulheres foi demonstrado um maior risco de recidivas, tratamento menos efetivo e maior chance de complicações cirúrgicas devido ao sobrepeso e a obesidade (LEE et al., 2019; MOHANTY; MOHANTY, 2021). Apesar disso, o sobrepeso e a obesidade podem ser considerados fatores de risco no desenvolvimento e progressão de neoplasias mamárias em mulheres e em cadelas, entretanto o mecanismo fisiológico ainda não foi completamente esclarecido. Sugere-se que o acúmulo de tecido adiposo e a exposição do tecido mamário a fatores de crescimento e hormônios como estrógeno e progesterona predispõe o aparecimento de tumores, assim com maior grau de malignidade e o pior prognóstico (LIM et al., 2015a; TESI et al., 2020). O tecido adiposo também é produtor de fatores pró-inflamatórios que estão associados ao desenvolvimento de neoplasias (DUMAS; BRISSON, 2021). Cadelas com sobrepeso ou obesas foram diagnosticadas com neoplasias mamárias mais jovens que cadelas classificadas como magras ou com peso adequado, além disso apresentam uma maior infiltração linfática pelas células neoplásicas, que é um fator predisponente ao aparecimento de metástases (LIM et al., 2015b).

Hormônios exógenos, especialmente progestágenos, usados para supressão do estro está associado ao desenvolvimento de neoplasias mamárias

devido doses de aplicação incorretas e apresentações de ação prolongada (RUTTEMAN; MISDORP, 1993; STØOVRING; MOE; GLATTRE, 1997). Em nosso estudo, apenas 1 dos 20 tutores (5%), das cadelas com neoplasias mamárias, afirmou ter realizado uso anterior de progestágenos para supressão do estro, entretanto, 25% (4/20) não souberam informar sobre o uso anterior de hormônios com essa finalidade. O uso de progestágenos com objetivo de supressão de ciclo estral e prevenção da gestação indesejada é uma prática comumente observada na clínica de pequenos animais (BELL; CHRISTIE, 1971). A falta de informação ao tutor sobre o período adequado de utilização desses hormônios assim como os efeitos adversos é o principal problema enfrentado na tentativa de reduzir o uso dessa medicação.

Em nosso estudo não foi realizada estatística para verificar se houve uma relação entre o uso de progestágenos e o desenvolvimento de neoplasias mamárias, todavia, dada a relação entre tumores de mama e os hormônios esteróides endógenos e exógenos (RUTTEMAN; MISDORP, 1993; SPOERRI et al., 2015), se faz necessário que esse questionamento sobre o uso exógeno de hormônios seja sempre considerado durante a anamnese dos pacientes com nódulos mamários, assim como o esclarecimento sobre seu uso e efeitos adversos.

Em vista da importância dos estudos de nódulos mamários em cadelas, as VEs têm se mostrado promissoras na busca por métodos minimamente invasivos e que busquem identificar biomarcadores que possam auxiliar no monitoramento das neoplasias mamárias (FISH et al., 2018; SAMMARCO et al., 2018; ŻMIGRODZKA et al., 2019a) Em nosso estudo, para validação das VEs após o isolamento, foi utilizado a concentração e caracterização por tamanho e pelo formato das VEs, sendo esses realizados por 2 métodos indicados na literatura, pelo rastreamento de nanopartículas e pelo MET (THÉRY et al., 2006; GARDINER et al., 2016; CANADAS et al., 2019). O rastreamento de nanopartículas investiga a distribuição por quantidade e tamanho das VEs, utilizando movimento browniano de partículas em suspensão (SZATANEK et al., 2011). Os resultados encontrados no presente estudo, quando relacionados ao tamanho das partículas, foram similares as VEs descritas no soro sanguíneo de humanos (DOBRA et al., 2020) e animais (BRADY

et al., 2018; GARNICA et al., 2020). Ademais, o tamanho das partículas foi o esperado para caracterização de vesículas como pequenas, de acordo com a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelular – ISEV (THÉRY et al., 2018).

A concentração de VEs/mL de soro sanguíneo das cadelas com neoplasias mamárias não apresentou diferença em relação ao controle. As VEs são secretadas por diversos tipos celulares e a concentração de VEs/mL é um valor que pode ter interferências de diversos fatores como o tipo de colheita e a armazenamento da amostra, pH da célula secretora, condição de hipóxia, estresse oxidativo, morte celular, alterações individuais, estado clínico do paciente, câncer e inflamação. Estes fatores foram relacionados ao aumento ou diminuição da concentração de VEs nos tecidos e fluídos (PAROLINI et al., 2009; CHOI et al., 2013; CLAYTON et al., 2019; LUDWIG; WHITESIDE; REICHERT, 2019). Apesar de diversos estudos realizados com vesículas, ainda não foi possível identificar um valor ou um intervalo de concentração média de VEs em fluidos corporais como o soro sanguíneo (JOHNSEN et al., 2019). A ausência de alterações sistêmicas no grupo de animais selecionados para o nosso estudo poderia justificar os resultados similares entre os grupos o que já foi também encontrado em outro estudo com VEs do soro em mulheres com tumor de mama (OZAWA et al., 2020).

Resultados são contraditórios em relação ao aumento, diminuição ou ausência de diferença nas concentrações de VEs em pacientes oncológicos. Em mulheres com câncer de mama, estudos não observaram diferenças nas concentrações de VEs no soro sanguíneo quando comparados com pacientes sem neoplasia (OZAWA et al., 2020). Outros estudos encontraram aumento na concentração de VEs em humanos com carcinoma hepatocelular quando comparados ao grupo controle ou a grupos neoplásicos de diferentes estádios (ARBELAIZ et al., 2017). Estes achados foram correlacionados à maior secreção de VEs pelas células tumorais, agressividade tumoral e prognóstico dos pacientes (LIN et al., 2022).

Na veterinária também não há uma definição em relação à concentração de VEs em animais acometidos por neoplasias. Estudo observou diferenças individuais entre pacientes com ou sem câncer, porém sem ser possível avaliar a significância

estatística (AGUILERA-ROJAS et al., 2018), enquanto outros demonstraram um aumento da VEs derivadas de plaquetas, leucócitos e linfócitos T no plasma em animais com diferentes tipos de neoplasias (ŽMIGRODZKA et al., 2019b). Alteração na concentração de VEs no soro de cães com linfoma também foi relacionada a resposta a quimioterapia, onde pacientes em remissão tiveram concentrações séricas de VEs menores do que animais onde a resposta à quimioterapia não foi satisfatória ou tinha a doença em progressão (GARNICA et al., 2020).

O formato das VEs foi analisado pela MET, optou-se por essa técnica pela maior facilidade de acesso, reduzido custo e amplo uso em estudos com VEs (GARDINER et al., 2016). Foram observadas partículas de formato esférico/oval, resultado similar aos descritos em estudos com o mesmo tipo de biofluidos (AGUILERA-ROJAS et al., 2018) e espécie (FISH et al., 2018). Todavia, estudos também sinalizam uma possível interferência no processo de fixação da lâmina para leitura da amostra na MET, a qual pode alterar, de forma discreta, o formato esférico das VEs, sendo assim, outra opção para a caracterização do formato é a criomicroscopia eletrônica, uma vez que essa técnica permite a visualização 3D das nanopartículas com menor interferência da fixação da amostra para análise do formato das VEs (ADRIAN et al., 1984; THÉRY et al., 2006; SZATANEK et al., 2011; CANADAS et al., 2019).

As proteínas são macromoléculas compostas por um conjunto de aminoácidos e que são importantes para estrutura e desempenho de funções celulares. As VEs contêm informações sobre suas células de origem, sendo assim as proteínas podem desempenhar um papel fundamental na identificação de biomarcadores que possam auxiliar o esclarecimento de processos biológicos envolvidos na carcinogênese (RAIMONDO et al., 2011; TIAN et al., 2021).

A proteína *CD5 like-molecule* (A0A8I3NQW4), foi identificada em todos os grupos em nosso estudo, entretanto sem apresentar diferença entre eles. Essa proteína é secretada juntamente com VEs (THÉRY et al., 2018), e foi também identificada em amostras de soro (DOBRA et al., 2020) e sugerida como um dos biomarcadores de VEs isoladas de plasma sanguíneo em humanos (DE MENEZES-NETO et al., 2015; GÁMEZ-VALERO et al., 2016), sendo também identificada em

estudo com câncer de mama em mulheres (KOH et al., 2021) (Koh. et al, 2021), e em cães com leishmaniose (ESTEVEZ et al., 2023), desta forma a espectrometria de massas foi considerada como um método adicional aos métodos *nanotracking analysis* (NTA) e MET para a de caracterização e validação do isolamento de VEs do nosso estudo.

A *keratin 18* (A0A8I3PJ84), é uma proteína de citoesqueleto do tipo I, de filamento intermediário com função estrutural, expressa em tecidos epiteliais de camada simples, podendo assim ser considerada como um marcador epitelial (WENG et al., 2012). Essa proteína geralmente é secretada por células em apoptose podendo também ser utilizada como um marcador sérico de morte celular (UENO et al., 2005). É objeto de investigação combinada entre proteômica e a técnica de imuno-histoquímica, na busca de biomarcadores para neoplasias mamárias, onde primariamente observa-se uma relação da expressão de cito queratinas e a origem epitelial dessa neoplasia, e a relação entre a alta expressão da *keratin 18* e a menor invasividade de carcinomas mamários em felinos (PEÑAFIEL-VERDU et al., 2012). Essa proteína já foi sugerida como biomarcador de grandes oncossomos, que são VEs derivadas de células cancerígenas com diâmetro entre 1000 e 10.000 nm, pois VEs de maior tamanho apresentam diferente perfil proteico. Esse mesmo estudo demonstrou por *Western blotting* uma maior quantidade de *keratin 18* em VEs derivadas do plasma de pacientes com câncer de próstata, comparada a pacientes saudáveis (MINCIACCHI et al., 2015).

Em nosso estudo a *keratin 18* apresentou maior abundância no GI em relação a GC e GII sugerindo assim um potencial regulador do processo de crescimento tumoral, uma vez que estudos indicam que essa menor abundância dessa proteína em pacientes com câncer em estádios mais avançados, está relacionado com uma maior invasividade tumoral e consequente pior prognóstico (SCHALLER et al., 1996). Sugere-se que a menor abundância em GII, grupo com neoplasias mais complexas, pode ser relacionada com uma metilação aberrante do gene KRT18 (BUTLER et al., 2020), fazendo assim com que haja um silenciamento desse gene e menor expressão da proteína nesse grupo. A menor abundância da proteína *keratin 18* nas linhagens celulares de neoplasias mamárias em humanos,

já foi relacionada a indução parcial da transição mesenquimal-epitelial (EMT) pelo aumento da expressão EpCam e ativação da via de Wnt/ β -catenin, promovendo um aumento das características metastáticas das neoplasias mamárias (SHI et al., 2020), todavia, mais estudos são necessários para que haja comprovação dessa hipótese em neoplasias mamárias de cadelas.

No GII as proteínas em maior abundância foram *sushi domain containing protein* (A0A8I3ML63), *Evc ciliary subunit 2* (A0A8I3MIA3) e *joining chain of multimeric IgA and IgM* (A0A8I3RW25). A *sushi domain-containing protein* é uma proteína homóloga a *complement component binding 4 protein alpha* (C4BPA – A0A8C0P5M3), a C4BPA está envolvida na resposta imune inata por meio da ativação, e metabolismo de gordura e regulação sistema complemento, sistema esse que vem sendo estudado por seu papel na carcinogênese (TVARIJONAVICIUTE et al., 2016; REIS et al., 2018). Essa proteína já foi anteriormente identificada, sem diferenças entre grupos, em soro de cadelas com neoplasias mamárias e saudáveis (FRANCO-MARTÍNEZ et al., 2020) e em cães obesos, sendo mais abundante nos animais com desordem metabólica (TVARIJONAVICIUTE et al., 2016). Em VEs, estudos em humanos já identificaram a C4BPA em VEs séricas de pacientes com melanoma (KURG et al., 2022). Em VEs derivadas de plasma sanguíneo, foi sugerido uma correlação entre a C4BPA, modulação do microambiente tumoral e escape imunológico através do sistema complemento, em pacientes com carcinoma hepatocelular, que apresentaram maior abundância de C4BPA quando comparados a pacientes controle (DONG et al., 2022), essa hipótese de um efeito proteção e escape tumoral pelo sistema complemento pode ser sugerida aos nossos resultados, onde o grupo com neoplasias de maior grau e complexidade apresentaram maior abundância da proteína homóloga *sushi domain containing protein*, entretanto são necessários mais análises para comprovar tal hipótese, especificamente em neoplasias mamárias em cadelas.

Já *EvC ciliary subunit 2* é uma proteína transmembrana que tem função em processos biológicos, desenvolvimento embrionário, formação dos ossos e esqueleto (HUBER; CORMIER-DAIRE, 2012). Mutações no gene dessa proteína

podem causar as chamadas ciliopatias, como a síndrome de Ellis-van-Creveld em humanos, também conhecida como displasia condroectodérmica (GALDZICKA et al., 2002; GERHARDT et al., 2016). Outra possível consequência da mutação gênica é promover disfunções na sinalização de hedgehog, e sugere-se que a sinalização hedgehog está envolvida em diversos estágios da carcinogênese e como alvo terapêutico, porém esse mecanismo ainda não está completamente esclarecido (KUBO et al., 2004; DORN et al., 2012; JIANG, 2022). Em estudo com diversas neoplasias, em tumores de mama foram encontradas mutações significativas no gene *EVC2*, mas não no tumor primário e sim nas metástases, sugerindo assim alvos para a inibição de metástase (PAUL et al., 2020). Esse gene também foi identificado com uma maior metilação em células de neoplasias mamárias triplo negativo, de pacientes que foram considerados não responsivos ao tratamento com quimioterapia neoadjuvante (PINEDA et al., 2019). Uma maior metilação em determinado gene, sugere uma menor síntese e consequente menor abundância dessa proteína, entretanto, nossos resultados apresentaram maior abundância da proteína *EVC ciliary subunit 2* no GII grupo, diferente dos propostos pela literatura.

A *joining chain of multimeric IgA and IgM*, é uma proteína com peso de aproximadamente 15 kDa, que conecta os monômeros IgA e IgM para formação de anticorpos multiméricos IgA (dímero) e IgM, (pentamérico), sendo assim transportados pelo epitélio, e que possuem função de proteção na superfície da mucosa, na resposta imune e mediador de inflamação (BRANDTZAEG; PRYDZ, 1984; WEI; WANG, 2021). Essa proteína também foi identificada em VEs de humanos, e na ontologia gênica, em conjunto como outras proteínas, com possível função de marcador de endocitose e exocitose, em trabalho que investigou diferentes origens de VEs como tecido, plasma e soro (HOSHINO et al., 2020). Em estudo *cohort* a maior expressão de RNA mensageiro do gene *JCHAIN* foi correlacionado a sobrevida favorável em câncer de mama em mulheres de origem luminal, e proposto como possível biomarcador (WANG et al., 2020). Essa proteína já foi identificada em amostras de soro e saliva de cães com neoplasias mamária,

sem apresentar diferença em abundância entres grupos com e sem neoplasia (FRANCO-MARTÍNEZ et al., 2020).

Os grupos de animais com neoplasias mamárias (GI e GII) apresentaram maior abundância das proteínas *protocadherin 17* e *albumin*. A *protocadherin 17*, codificada pelo gene PCDH17, é uma proteína de membrana do tipo I da subfamília das caderinas, são cálcio-dependentes e estão envolvidas em processos de adesão celular, inibição de crescimento tumoral, migração e invasividade (HAN et al., 2010). No câncer de próstata em homens a metilação exacerbada do gene codificador dessa proteína, obtido por PCR em tecido, foi relacionada a grau patológico maior, linfonodos com metástases e menor sobrevida, sendo a hipermetilação do PCDH17 sugerida como possível biomarcador dessa neoplasia (LIN et al., 2014). Em neoplasia de mama em mulheres, essa proteína apresentou maior abundância em tecido neoplásico com metástase em osso e quando comparada não metastáticos, promovendo a invasão celular (LI et al., 2013). Por outro lado, estudos demonstraram uma menor expressão do gene PCDH17 nos tecidos neoplásicos foi correlacionada com uma maior abundância de marcadores de angiogênese e hipoxia no soro dessas pacientes (EL-BENHAWY et al., 2021), e o aumento da expressão ectópica do PCDH17 promoveu inibição da proliferação e mobilidade celular (YIN et al., 2016). Já cães com linfoma difuso de grandes células B também foi observada uma menor expressão do gene PCDH17 em cultivo celular dessa neoplasia, o que foi relacionado com a hipermetilação desse gene supressor de tumor (ZORZAN et al., 2022).

A *albumina* (A0A8I3MY51) é uma proteína mais abundante no soro, é considerada um co-isolamento nas amostras enriquecidas com VEs, e já foi previamente reportado (THÉRY et al., 2018). Se considerarmos a albumina como possível contaminante das amostras, sugere-se que esse parâmetro não deveria apresentar diferença entre os grupos, uma vez que o método de isolamento e processamento das amostras foi similar em todos os grupos, além disso há estudo demonstrando a utilização da SEC para isolamento das VEs teve um menor co-isolamento dessa proteína, quando comparado a ultracentrifugação e precipitação (BUSCHMANN et al., 2018). Contudo, em nosso estudo foi observado que os

animais dos grupos com neoplasias, apresentaram maior abundância dessa proteína. A albumina com peso de aproximadamente de 66 kDa, é sintetizada pelo fígado e possui funções no metabolismo celular, transporte de compostos endógenos e exógenos (RABBANI; AHN, 2019). Essa proteína foi encontrada em menor abundância na espectrometria (FRANCO-MARTÍNEZ et al., 2020) e em menor concentração livre em soro sanguíneo de animais com neoplasias mamária, incluindo animais com metástases e doenças concomitantes é menor quando comparado a pacientes saudáveis (TECLES et al., 2009; FRANCO-MARTÍNEZ et al., 2020).

Em nossos resultados as proteínas *EvC ciliary subunit 2, joining chain of multimeric IgA and IgM, protocadherin 17* e *albumin* foram identificadas em maior abundância nos grupos neoplasia de amostras enriquecidas com VEs séricas, entretanto, na literatura é possível observar que na maior parte dos estudos, essas proteínas e seus genes codificadores geralmente se encontram em menor abundância e expressão quando estudadas em tecidos neoplásicos, livres no soro sanguíneo e em VEs derivadas de tumores (YIN et al., 2016; PINEDA et al., 2019; FRANCO-MARTÍNEZ et al., 2020; WANG et al., 2020). É sabido que as VEs carregam informações da sua célula de origem, todavia, quando investigadas no sangue é possível sugerir que há uma heterogeneidade na origem das populações de VEs, uma vez que serão secretadas tanto por células tumorais, quanto por células de outras origens como leucócitos e plaquetas (GEORGE et al., 1982; PUGHOLM et al., 2016), o que também é observado em animais (ŻMIGRODZKA et al., 2019b) Sendo assim, sugerimos que o perfil e abundância proteica encontrada em VEs séricas podem se diferir dos achados em tecidos neoplásicos, e em VEs derivadas desses tecidos, como também proposto em humanos quando comparado o perfil proteico de VEs de plasma e VEs derivadas de tecido neoplásico (HOSHINO et al., 2020). Mais estudos comparativos entre VEs séricas e VEs derivadas de tecido são necessários na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos nessas diferenças de perfil proteico.

É importante ressaltar que as proteínas *keratin 18* e *protocadherin 17* e seus genes codificadores desempenham importante papel na supressão da proliferação

e crescimento tumoral no câncer de mama em mulheres (SCHALLER et al., 1996; YIN et al., 2016; BUTLER et al., 2020; EL-BENHAWY et al., 2021). A identificação dessas proteínas em nosso estudo ressalta que essas proteínas parecem também desempenhar funções nos processos biológicos envolvidos em tumores de mamas em cadelas, sugerindo assim que podem ser consideradas como alvos para futuros estudos de neoplasia mamária nessa espécie.

Concluimos que a heterogeneidade dos subtipos de neoplasias mamárias é um dos fatores limitantes para os estudos com esse tipo de neoplasia uma vez que torna difícil a padronização de metodologias, bem como dos achados. Os resultados de isolamento e caracterização das VEs, estão de acordo com o que foi anteriormente observado na literatura para esse tipo de amostra biológica e acrescentam dados a literatura veterinária a descrição e caracterização das nanopartículas. Entretanto, os resultados referentes as VEs não indicaram relação com o tipo e classificação do tumor e não podem ser sugeridos para auxiliar no diagnóstico e monitoramento das cadelas acometidas por neoplasias mamárias. As proteínas identificadas em nosso estudo auxiliam no esclarecimento de algumas funções e sugerem o possível comportamentos de invasividade das neoplasias mamárias em cadelas, sendo assim um importante avanço na investigação desse tipo de tumor na medicina veterinária, entretanto mais estudos são necessários para ampliar a caracterização das proteínas em amostras enriquecidas com VEs e para a validação dessas proteínas como possíveis marcadores.

Informação dos Autores

*Autor Correspondente

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

Autores

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

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

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

Notas

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

Agradecimentos

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

REFERÊNCIAS

- ADRIAN, M. et al. Cryo-electron microscopy of viruses. **Nature**, v. 308, n. 5954, p. 32–36, mar. 1984. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/308032a0>>.
- AGUILERA-ROJAS, M. et al. Exploration of serum- and cell culture-derived exosomes from dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ARBELAIZ, A. et al. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. **Hepatology**, v. 66, n. 4, p. 1125–1143, 2017.
- ARIYARATHNA, H. et al. Canine mammary gland disease in New Zealand: a review of samples from 797 dogs. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 70, n. 2, p. 95–100, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00480169.2021.2004953>>.
- BELL, E. T.; CHRISTIE, D. W. The use of progestagens in the control of the canine oestrous cycle*. **Journal of Small Animal Practice**, v. 12, n. 7, p. 375–382, jul. 1971. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1971.tb06244.x>>.
- BIONDI, L. R. et al. Canine mammary tumors in Santos, Brazil: clinicopathological and survival profile. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 252, 2014.
- BOLLAG, D.M.; ROZYCKII, M.D.; EDELSTEIN, S. . **Protein methods**. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- BOUKOURIS, S.; MATHIVANAN, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 9, n. 3–4, p. 358–367, abr. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prca.201400114>>.
- BRADY, J. V. et al. A Preliminary Proteomic Investigation of Circulating Exosomes and Discovery of Biomarkers Associated with the Progression of Osteosarcoma in a Clinical Model of Spontaneous Disease. **Translational Oncology**, v. 11, n. 5, p. 1137–1146, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.07.004>>.
- BRANDTZAEG, P.; PRYDZ, H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. **Nature**, v. 311, n. 5981, p. 71–73, set. 1984. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/311071a0>>.
- BURRAI, G. P. et al. A statistical analysis of risk factors and biological behavior in canine mammary tumors: A multicenter study. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1–12, 2020.
- BUSCHMANN, D. et al. Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, 2018.
- BUTLER, C. et al. Hypomethylating Agent Azacitidine Is Effective in Treating Brain Metastasis Triple-Negative Breast Cancer Through Regulation of DNA Methylation of Keratin 18 Gene. **Translational Oncology**, v. 13, n. 6, p. 100775, 2020. 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-](https://doi.org/10.1186/s12957-022-02849-y)
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.

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

Supplemental Files

Tables

Supplemental Table 1. Proteins extracted from serum extracellular vesicles in dogs in the GC, GI and GII groups.

Protein Name	ID	Gene	Group		
			Control	GI	GI
Acetyl-CoA acyltransferase 2	A0A8I3NU61	ACAA2		X	
A-kinase anchoring protein 3	A0A8I3Q3V5	AKAP3			X
Albumin	A0A8I3MY51	AFP	X	X	X
Apolipoprotein E	P18649	APOE	X		
Asparagine--tRNA ligase	A0A8I3MX22	NARS2			
Beta 3-glucosyltransferase	A0A8I3PAR3	B3GLCT	X		
Cardiotrophin like cytokine factor 1	A0A8I3N6Q7	CLCF1	X		X
Cupin superfamily member 1	A0A8I3MM27	C1H18orf54	X	X	X
C2 domain containing 3 centriole elongation regulator	A0A8I3MYR6	C2CD3			X
CD5 molecule like	A0A8I3NQW4	CD5L	X	X	X
Clock circadian regulator	A0A8I3NBB7				
C-type lectin domain-containing protein	A0A8I3PY16	CLEC1B			X
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) endonuclease	A0A8I3S7J9	APEX2	X	X	
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	A0A8I3NPE6	POLR2B			X
Double-strand break repair protein	A0A8I3P7Y4	MRE11	X		
Dynamin 1 like	A0A8I3P3R6	Dynamin 1 like	X		

Dynein axonemal heavy chain 2	A0A8I3PUB4	Dynein axonemal heavy chain 2		X	
Dystonin	A0A8I3NP68	DST			X
E3 ubiquitin-protein ligase	A0A8I3NIE2	DTX3	X		
EvC ciliary complex subunit 2	A0A8I3MIA3	EVC2	X	X	X
Family with sequence similarity 187 member B	A0A8I3N5J1	-		X	
FAST kinase domains 5	A0A8I3NZU0	FASTKD5		X	
Fetuin B	A0A8I3P629	FETUB		X	
FHA domain-containing protein	A0A8I3PZW2	MKI67	X		
Fibronectin	A0A8I3PED8	FN1	X		
Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	A0A8I3NLF4	FCN2			X
F-box and leucine rich repeat protein 8	A0A8I3NGN3	FBXL8			X
Focadhesin	A0A8I3NLD5	FOCAD			X
Globin A2	A0A1K0GGH0	GLNA2	X	X	X
Globin family profile domain-containing protein	A0A8I3MJ33	HBQ1			X
Glutamate receptor	A0A8I3MAF2	GRIA4	X		X
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial	A0A8I3Q0U3	GPAM	X	X	X
Hemoglobin subunit alpha1	A0A5B8JID5	HBQ1	X	X	
Hyaluronoglucosaminidase	A0A8I3MPD2	CEMIP	X		
60S ribosomal protein L30	A0A8I3MP22	-		X	
IF rod domain-containing protein	A0A8I3PEZ2	-		X	
Ig heavy chain V region MOO	P01785	-	X		
Ig heavy chain V region GOM	P01784	-			X
Ig-like domain-containing protein	A0A8I3P6S7, A0A8I3PB96, A0A8I3P3K1, A0A8I3RX63,	-	X	X	X

	A0A8I3PVB5, A0A8I3S0K3, A0A8I3NU27,A0 A8I3NRC4, A0A8I3NVL7				
Immunoglobulin V-set domain-containing protein	A0A8I3PGC2	-			X
Joining chain of multimeric IgA and IgM	A0A8I3RW25	JCHAIN	X	X	X
Kelch domain containing 9	A0A8I3Q1J8	KLHDC9	X		
Keratin, type I cytoskeletal 9	A0A8I3NNW0	KRT9	X	X	X
Keratin, type I cytoskeletal 10	A0A8I3NL87	KRT10	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 1	Q6EIIY9	KRT1	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	Q6EIZ1	KRT2	X		
Keratin 18	A0A8I3PJ84	KRT18	X	X	X
Keratin 74	A0A8I3PMV1	KRT74	X	X	
Keratin 75	A0A8I3PK78	KRT6A	X	X	X
Kinesin-like protein	A0A8I3N413	KIF5B			X
Lysozyme	A0A8I3NX55	LYZ	X		
Leucyl and cystinyl aminopeptidase	A0A8I3ML59	LNPEP			X
Mitochondrial ribosomal protein L21	A0A8I3PYK8	LOC1198688 76			X
Mitochondrial ribosomal protein L43	A0A8I3P6K3	MRPL43	X		
Membrane bound O- acyltransferase domain containing 2	A0A8I3PNZ4	MBOAT2			X
Multifunctional ROCO family signaling regulator 1	A0A8I3NEN2	MFHAS1			X
NAD(P)(+)- arginine ADP-ribosyltransferase	A0A8I3Q484	ART3	X	X	
Nestin	A0A8I3N5W6	NES		X	
Ninein like	A0A8I3Q2Q5	NINL			X
NLR family pyrin domain containing 14	A0A8I3N8P2	NLRP14		X	
Nuclear receptor corepressor 2	A0A8I3NQ55	NCOR2			X

Peptidase S1 domain-containing protein	A0A8I3P0A5	LOC475521	X	X	X
Peptidase S1 domain-containing protein	A0A8I3MX03	LOC479668		X	X
Protocadherin 17	A0A8I3PDN1	PCDH17	X	X	X
Protocadherin 9	A0A8I3PB28	PCDH9		X	
POU domain protein	A0A8I3P3I7	LOC481709	X		
RAB23, member RAS onco family	A0A8I3NF40	RAB23		X	
receptor protein-tyrosine kinase	A0A8I3MB23	EPHA8	X	X	X
Ring finger protein 214	A0A8I3MLN4	R14			X
RING-type E3 ubiquitin transferase	A0A8I3N3Q3	TRIM17	X		
RUN and FYVE domain containing 1	A0A8I3N3X3	RUFY1	X	X	X
Secernin 2	A0A8I3NUU3	SCRN2			X
Serine/threonine-protein kinase greatwall	A0A8I3MPU6	MASTL			X
SET binding factor 2	A0A8I3NHN5	SBF2		X	
Solute carrier family 2 member 6	A0A8I3N592	SLC2A6	X		
SRC kinase signaling inhibitor 1	A0A8I3NHM6	SRCIN1		X	
Spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2	A0A8I3MJS4	SYNE2			X
Sushi domain-containing protein	A0A8I3ML63	LOC100855476	X	X	X
Synaptic Ras GTPase activating protein 1	A0A8I3PL77	SYNGAP1		X	
Titin	A0A8I3PE72	TTN	X		
T-complex protein 1 subunit theta	A0A8I3P949	CCT8			X
Thymocyte selection associated high mobility group box	A0A8I3PZX4	TOX	X		
Transmembrane protein 191C	A0A8I3PRH2	TMEM191C			X
SEC63 homolog, protein translocation regulator	A0A8I3N658	SEC63	X		
Tubulin polymerization promoting protein family member 3	A0A8I3N563	TPPP3			X

Tumor protein p53 binding protein 1	A0A8I3S3V8	TP53BP1			X
Vang-like protein	A0A8I3Q337	VANGL1	X		
Vesicle amine transport 1	A0A8I3RT77	VAT1			X
WD repeat domain 41	A0A8I3N5E9	WDR41	X		
Uncharacterized protein	A0A5F4DJ18	-	X	X	X
Uncharacterized protein	A0A5F4BYG2	-			X

1068

1069

1070 **Supplemental Table 2.** Gene ontology of proteins extracted from serum extracellular vesicles in dogs. Data obtained of
 1071 UniprotKB (www.uniprot.org).

1072

Protein Name	ID	Gene	Gene Ontology		
			Molecular Function	Biological Process	Cellular Component
Acetyl-CoA acyltransferase 2	A0A8I3NU61	ACAA2	Acyltransferase activity, transferring groups other than amino-acyl groups	-	-
A-kinase anchoring protein 3	A0A8I3Q3V5	AKAP3	Protein kinase A binding	Blastocyst hatching; protein localization transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	Acrosomal vesicle; sperm fibrous sheath; sperm midpiece; sperm principal piece
Albumin	A0A8I3MY51	AFP	-	-	Extracellular space
Apolipoprotein E	P18649	APOE	Amyloid-beta binding; antioxidant activity; cholesterol transfer activity; enzyme binding; heparan sulfate proteoglycan binding; heparin binding; identical protein binding; lipoprotein particle binding; lipoprotein particle binding; lipoprotein particle binding; phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity; phospholipid binding; protein homodimerization activity;	AMPA glutamate receptor clustering; amyloid precursor protein metabolic process; artery morphogenesis; cGMP-mediated signaling; cholesterol catabolic process; cholesterol efflux; cholesterol homeostasis; chylomicron remnant clearance; fatty acid homeostasis; fatty acid homeostasis; gene expression; high-density lipoprotein particle assembly; high-density lipoprotein particle clearance; high-density lipoprotein particle remodeling; intermediate-density lipoprotein particle clearance intracellular calcium ion homeostasis; lipid transport involved in lipid storage; lipoprotein biosynthetic process; lipoprotein	Chylomicron; extracellular exosome; extracellular space; Golgi apparatus; intermediate-density lipoprotein particle; low-density lipoprotein particle; melanosome; multivesicular body, internal vesicle; plasma membrane; synaptic cleft; very-low-density lipoprotein particle

			tau protein binding; very-low-density lipoprotein	biosynthetic process; locomotory exploration behavior; long-chain fatty acid transport; long-term memory; long-term memory; maintenance of location in cell; melanosome organization; negative regulation of amyloid fibril formation; negative regulation of amyloid-beta formation; negative regulation of blood vessel endothelial cell migration; negative regulation of canonical Wnt signaling pathway; negative regulation of cholesterol biosynthetic process; negative regulation of endothelial cell proliferation; negative regulation of gene expression; negative regulation of inflammatory response; negative regulation of inflammatory response; negative regulation of inflammatory response; negative regulation of neuron apoptotic process; negative regulation of neuron projection development; negative regulation of platelet activation; negative regulation of protein secretion; negative regulation of smooth muscle cell proliferation; negative regulation of triglyceride metabolic process; neuron projection development; nitric oxide mediated signal transduction; NMDA glutamate receptor clustering; phospholipid efflux; positive regulation by host of viral process; positive regulation by host of viral process; positive regulation of cholesterol efflux; positive	
--	--	--	--	--	--

				regulation of cholesterol metabolic process; positive regulation of CoA-transferase activity; positive regulation of dendritic spine development; positive regulation of dendritic spine maintenance; positive regulation of DNA-templated transcription; positive regulation of endocytosis; positive regulation of endocytosis; positive regulation of heparan sulfate binding; positive regulation of heparan sulfate proteoglycan binding; positive regulation of heparan sulfate proteoglycan binding; positive regulation of lipid transport across blood-brain barrier; positive regulation of low-density lipoprotein particle receptor catabolic process; positive regulation of membrane protein ectodomain proteolysis; positive regulation of neuron projection development; positive regulation of nitric-oxide synthase activity; positive regulation of phospholipid efflux; protein import receptor-mediated endocytosis; regulation of amyloid-beta clearance; regulation of behavioral fear response; regulation of Cdc42 protein signal transduction; regulation of cellular response to very-low-density lipoprotein particle stimulus; regulation of innate immune response; regulation of proteasomal protein catabolic process; regulation of protein-containing complex	
--	--	--	--	--	--

				assembly; response to caloric restriction; response to dietary excess; response to dietary excess; reverse cholesterol transport; reverse cholesterol transport; triglyceride metabolic process; triglyceride-rich lipoprotein particle clearance; vasodilation; very-low-density lipoprotein particle clearance; very-low-density lipoprotein particle clearance virion assembly.	
Asparagine-tRNA ligase	A0A8I3MX22	NARS2	Asparagine-tRNA ligase activity; ATP binding; nucleic acid binding ;	AsparaginyI-tRNA aminoacylation	-
Beta 3-glucosyltransferase	A0A8I3PAR3	B3GLCT	-	Glycosyltransferase activity	Membrane
Cardiotrophin like cytokine factor 1	A0A8I3N6Q7	CLCF1	-	-	Extracellular region
Cupin superfamily member 1	A0A8I3M27	C1H18orf54	-	-	-
C2 domain containing 3 centriole elongation regulator	A0A8I3MYR6	C2CD3	-	Brain development; centriole elongation; embryonic digit morphogenesis; heart looping; in utero embryonic development; neural plate axis specification; neural tube development; non-motile cilium assembly; protein localization to centrosome; protein processing; regulation of proteolysis; regulation of smoothened signaling pathway	Centriolar satellite; centriole; ciliary basal body

CD5 molecule like	A0A8I3N QW4	CD5L	Scavenger receptor activity	-	Membrane
Clock circadian regulator	A0A8I3N BB7		Cellular response to ionizing radiation; circadian regulation of gene expression; DNA damage checkpoint signaling; negative regulation of DNA-templated transcription; negative regulation of glucocorticoid receptor signaling pathway; positive regulation of circadian rhythm; positive regulation of inflammatory response; positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity; proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process; protein acetylation; regulation of hair cycle; regulation of insulin secretion; regulation of type B pancreatic cell development; response to redox state; spermatogenesis	Chromatin DNA binding; DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific; E-box binding; histone acetyltransferase activity; protein dimerization activity	Chromatoid body; chromosome; CLOCK-BMAL transcription complex; cytosol; nucleoplasm
C-type lectin domain-	A0A8I3P Y16	CLEC1 B	-	Receptor-mediated endocytosis	Membrane

containing protein					
DNA- (apurinic or apyrimidinic site) endonuclease	A0A8I3S 7J9	APEX2	DNA binding; endonuclease activity;	DNA recombination; DNA repair	Fibrillar center; mitochondrion; nucleoplasm
DNA- directed RNA polymerase subunit beta	A0A8I3N PE6	POLR 2B	Chromatin binding; DNA binding; DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity; metal ion binding; ribonucleoside binding	Transcription by RNA polymerase II	Chromosome, telomeric region; RNA polymerase II, core complex
Double- strand break repair protein	A0A8I3P 7Y4	MRE1 1	3'-5'-DNA exonuclease activity; 5'-3' exonuclease activity; DNA binding; DNA helicase activity; identical protein binding; manganese ion binding; single-stranded DNA endodeoxyribonuclease activity	Cell population proliferation; DNA strand resection involved in replication fork processing; double-strand break repair via homologous recombination; double- strand break repair via nonhomologous end joining; homologous chromosome pairing at meiosis ; mitotic G2 DNA damage checkpoint signaling; mitotic intra-S DNA damage checkpoint signaling; negative regulation of apoptotic process; positive regulation of kinase activity; positive regulation of protein autophosphorylation; positive regulation of telomere maintenance; sister chromatid cohesion; telomeric 3' overhang formation	BRCA1-C complex; chromosome, telomeric region; cytoplasm; Mre11 complex; PML body; replication fork; site of double-strand break
Dynamin 1 like	A0A8I3P 3R6	Dynam in 1 like	GTP binding; GTPase activity	-	-

Dynein axonemal heavy chain 2	A0A8I3PUB4	Dynein axonemal heavy chain 2	ATP binding; dynein intermediate chain binding; dynein light intermediate chain binding; minus-end-directed microtubule motor activity	Cilium-dependent cell motility; inner dynein arm assembly; microtubule-based movement	Inner dynein arm; microtubule; sperm flagellum
Dystonin	A0A8I3NP68	DST	Actin binding; calcium ion binding; microtubule binding	Intermediate filament cytoskeleton organization	Cell projection; cytoplasm; membrane; microtubule
E3 ubiquitin-protein ligase	A0A8I3NIE2	DTX3	Metal ion binding; ubiquitin protein ligase activity	Notch signaling pathway; protein ubiquitination	Cytoplasm
EvC ciliary complex subunit 2	A0A8I3MIA3	EVC2	-	Smoothened signaling pathway	Cytoskeleton; cytoplasm; ciliary membrane
Family with sequence similarity 187 member B	A0A8I3N5J1	-	-	-	Membrane-
FAST kinase domains 5	A0A8I3NZU0	FASTKD5	Metal ion binding; ubiquitin-protein transferase activity	Protein ubiquitination	-
Fetuin B	A0A8I3P629	FETUB	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	-	-
FHA domain-containing protein	A0A8I3PZW2	MKI67	-	Cell cycle	Nucleus
Fibronectin	A0A8I3PED8	FN1	Heparin binding; identical protein binding; integrin	Acute-phase response; biological process involved in interaction with symbiont;	Apical plasma membrane;

			binding; peptidase activator activity; protease binding; proteoglycan binding	calcium-independent cell-matrix adhesion; cell-substrate junction assembly; endodermal cell differentiation; integrin activation; integrin-mediated signaling pathway; negative regulation of monocyte activation; negative regulation of transforming growth factor beta production; neural crest cell migration involved in autonomic nervous system development; peptide cross-linking; positive regulation of axon extension; positive regulation of fibroblast proliferation; positive regulation of gene expression; positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling; positive regulation of substrate-dependent cell migration, cell attachment to substrate; regulation of cell shape; regulation of ERK1 and ERK2 cascade; regulation of protein phosphorylation; substrate adhesion-dependent cell spreading; wound healing	basement membrane; endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment; extracellular exosome; fibrinogen complex;
Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	A0A8I3N LF4	FCN2	-	-	-
F-box and leucine rich repeat protein 8	A0A8I3N GN3	FBXL8	-	-	-
Focadhesin	A0A8I3N LD5	FOCAD	-	Regulation of post-transcriptional gene silencing	-

Globin A2	A0A1K0GGH0	GLNA2	Heme binding; metal ion binding; oxygen binding; oxygen carrier activity	-	Hemoglobin complex
Globin family profile domain-containing protein	A0A8I3MJ33	HBQ1	Heme binding; iron ion binding; oxygen carrier activity; oxygen binding	-	Hemoglobin complex
Glutamate receptor	A0A8I3MAF2	GRIA4	Ionotropic glutamate receptor activity	-	Postsynaptic membrane
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial	A0A8I3Q0U3	GPAM	Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase activity	CDP-diacylglycerol biosynthetic process	Mitochondrial outer membrane; plasma membrane
Hemoglobin subunit alpha1	A0A5B8JID5	HBQ1	Heme binding; iron ion binding; oxygen carrier activity; oxygen binding	-	Hemoglobin complex
Hyaluronoglucosaminidase	A0A8I3MPD2	CEMIP	-	-	Plasma membrane
60S ribosomal protein L30	A0A8I3MP22	-	RNA binding; structural constituent of ribosome	-	Cytosolic large ribosomal subunit
IF rod domain-containing protein	A0A8I3PEZ2	-	-	-	Intermediate filament
Ig heavy chain V region MOO	P01785	-	-	Adaptive immune response	External side of plasma membrane;

					immunoglobulin complex
Ig heavy chain V region GOM	P01784	-	-	Adaptive immune response	External side of plasma membrane; immunoglobulin complex
Ig-like domain-containing protein	A0A8I3P6S7, A0A8I3PB96, A0A8I3P3K1, A0A8I3RX63, A0A8I3PVB5, A0A8I3S0K3, A0A8I3NU27, A0A8I3NRC4, A0A8I3NVL7	-	-	-	-
Immunoglobulin V-set domain-containing protein	A0A8I3PGC2	-	-	-	-
Joining chain of multimeric IgA and IgM	A0A8I3RW25	JCHAIN	IgA binding; immunoglobulin receptor binding; peptidoglycan binding; phosphatidylcholine binding; protein	Adaptive immune response; antibacterial humoral response; glomerular filtration; innate immune response; positive regulation of respiratory burst; protein-containing complex assembly	Monomeric IgA immunoglobulin complex; pentameric IgM immunoglobulin complex; secretory

			homodimerization activity; protein-macromolecule adaptor activity; single- stranded DNA binding;		dimeric IgA immunoglobulin complex
Kelch domain containing 9	A0A8I3Q 1J8	KLHD C9	-	-	-
Keratin, type I cytoskeletal 9	A0A8I3N NW0	KRT9	Structural molecule activity	Intermediate filament organization; skin development; spermatogenesis	Intermediate filament
Keratin, type I cytoskeletal 10	A0A8I3N L87	KRT10	Protein heterodimerization activity; structural constituent of skin epidermis	Keratinocyte differentiation; peptide cross-linking; protein heterotetramerization	Cornified envelope; cytoplasm; keratin filament
Keratin, type II cytoskeletal 1	Q6EIY9	KRT1	Protein heterodimerization activity; structural constituent of skin epidermis	Keratinization; protein heterotetramerization	Cytoplasm; keratin filament; plasma membrane
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	Q6EIZ1	KRT2	Structural constituent of skin epidermis	Structural constituent of skin epidermis; positive regulation of epidermis development	Cytoplasm; keratin filament
Keratin 18	A0A8I3P J84	KRT18	Structural molecule activity	-	Intermediate filament
Keratin 74	A0A8I3P MV1	KRT74	Keratin filament binding	Intermediate filament cytoskeleton organization	Cytoplasm; keratin filament
Keratin 75	A0A8I3P K78	KRT6A	-	Hematopoietic progenitor cell differentiation	Cornified envelope; keratin filament
Kinesin-like protein	A0A8I3N 413	KIF5B	ATP binding; identical protein binding; microtubule binding; microtubule motor activity;	Cellular response to type II interferon; centrosome localization; cytoplasm organization; lysosome localization; mitochondrion transport along	Centriolar satellite; ciliary rootlet; cytosol; microtubule; mitochondrion;

			protein-containing complex binding;	microtubule; mitocytosis; natural killer cell mediated cytotoxicity; plus-end-directed vesicle transport along microtubule; positive regulation of potassium ion transport; positive regulation of protein localization to plasma membrane; positive regulation of synaptic transmission, GABAergic; positive regulation of synaptic transmission, GABAergic; stress granule disassembly	neuron projection; phagocytic vesicle
Lysozyme	A0A8I3NX55	LYZ	Identical protein binding; lysozyme activity	Defense response to Gram-positive bacterium; killing of cells of another organism	Extracellular space
Leucyl and cystinyl aminopeptidase	A0A8I3ML59	LNPEP	Aminopeptidase activity; metallopeptidase activity; zinc ion binding	Proteolysis	Membrane
Mitochondrial ribosomal protein L21	A0A8I3PYK8	LOC119868876	-	-	Cytoplasm; ribosome
Mitochondrial ribosomal protein L43	A0A8I3P6K3	MRPL43	Structural constituent of ribosome	Mitochondrial translation	Mitochondrial large ribosomal subunit
Membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	A0A8I3PNZ4	MBOAT2	-	-	Membrane
Multifunctional ROCO family signaling regulator 1	A0A8I3NEN2	MFHAS1	GTP binding; protein phosphatase 2A binding; ubiquitin protein ligase binding	Erythrocyte differentiation; inflammatory response; innate immune response; negative regulation of inflammatory response; negative regulation of protein dephosphorylation; negative regulation of	Cytoplasm

				protein localization to nucleus; negative regulation of toll-like receptor 2 signaling pathway; negative regulation of toll-like receptor 4 signaling pathway; positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; positive regulation of JNK cascade; positive regulation of p38MAPK cascade; positive regulation of protein kinase B signaling; positive regulation of toll-like receptor 2 signaling pathway; positive regulation of toll-like receptor 2 signaling pathway; regulation of toll-like receptor signaling pathway	
NAD(P)(+)-arginine ADP-ribosyltransferase	A0A8I3Q484	ART3	NAD ⁺ -protein-arginine ADP-ribosyltransferase activity; nucleotidyltransferase activity	-	Membrane
Nestin	A0A8I3N5W6	NES	Intermediate filament binding	G2/M transition of mitotic cell cycle; negative regulation of catalytic activity; negative regulation of protein binding; stem cell proliferation	Cytoplasm; intermediate filament
Ninein like	A0A8I3Q2Q5	NINL	Calcium ion binding	-	Cytosol; intercellular bridge; microtubule cytoskeleton
NLR family pyrin domain containing 14	A0A8I3N8P2	NLRP14	-	Spermatogenesis	-
Nuclear receptor	A0A8I3NQ55	NCOR2	-	-	-

corepressor 2					
Peptidase S1 domain-containing protein	A0A8I3P0A5	LOC475521	Serine-type endopeptidase activity	Proteolysis	-
Peptidase S1 domain-containing protein	A0A8I3MX03	LOC479668	Hemoglobin binding; serine-type endopeptidase activity	Proteolysis	Extracellular region
Protocadherin 17	A0A8I3PDN1	PCDH17	Calcium ion binding	Homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	Plasma membrane
Protocadherin 9	A0A8I3PB28	PCDH9	Calcium ion binding	Homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	Cell-cell contact zone; growth cone; plasma membrane
POU domain protein	A0A8I3P3I7	LOC481709	DNA binding; DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	-	Nucleus
RAB23, member RAS onco family	A0A8I3NF40	RAB23	GTP binding; GTPase activity	-	-
Receptor protein-tyrosine kinase	A0A8I3MB23	EPHA8	ATP binding; GPI-linked ephrin receptor activity; growth factor binding	Axon guidance; cellular response to follicle-stimulating hormone stimulus; neuron remodeling; positive regulation of MAPK cascade; positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity; protein autophosphorylation; regulation of cell adhesion mediated by integrin; substrate-dependent cell migration	Neuron projection; plasma membrane
Ring finger protein 214	A0A8I3MLN4	RNF214	Metal ion binding	-	-

RING-type E3 ubiquitin transferase	A0A8I3N3Q3	TRIM17	Zinc ion binding	-	Cytoplasm
RUN and FYVE domain containing 1	A0A8I3N3X3	RUFY1	Metal ion binding; SH2 domain binding; SH3 domain binding	Protein transport; regulation of endocytosis; small GTPase mediated signal transduction	Cytosol; endosome; nuclear speck
Secernin 2	A0A8I3N UU3	SCRN2	Cysteine-type exopeptidase activity; dipeptidase activity	Proteolysis	-
Serine/threonine-protein kinase greatwall	A0A8I3M PU6	MASTL	ATP binding; protein serine/threonine kinase activity	Female meiosis II; positive regulation of ubiquitin protein ligase activity; protein phosphorylation	Microtubule organizing center; nucleus
SET binding factor 2	A0A8I3N HN5	SBF2	Guanyl-nucleotide exchange factor activity	-	-
Solute carrier family 2 member 6	A0A8I3N 592	SLC2A6	Transmembrane transporter activity	-	Membrane
SRC kinase signaling inhibitor 1	A0A8I3N HM6	SRCIN1	Protein kinase binding	Protein kinase binding; positive regulation of protein tyrosine kinase activity; postsynaptic actin cytoskeleton organization; regulation of cell migration; regulation of dendritic spine morphogenesis; substrate adhesion-dependent cell spreading	Actin cytoskeleton; cytoplasm; glutamatergic synapse
Spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2	A0A8I3M JS4	SYNE2	Actin binding; cytoskeleton-nuclear membrane anchor activity	Centrosome localization; nuclear migration along microfilament; nucleokinesis involved in cell motility in cerebral cortex radial glia guided migration; positive regulation of cell migration; regulation of cilium assembly	Filopodium membrane; focal adhesion; intermediate filament cytoskeleton;

					lamellipodium membrane; meiotic nuclear membrane microtubule tethering complex; mitochondrion; nuclear lumen; nuclear membrane; sarcoplasmic reticulum; Z disc
Sushi domain- containing protein	A0A8I3M L63	LOC10 08554 76	-	Involved in many recognition processes, including the binding of several complement factors to fragments C3b and C4b.	-
Synaptic Ras GTPase activating protein 1	A0A8I3P L77	SYNG AP1	GTPase activator activity;	GTPase activator activity; regulation of GTPase activity	-
Titin	A0A8I3P E72	TTN	ATP binding; protein kinase activity	Protein phosphorylation	Intracellular organelle
T-complex protein 1 subunit theta	A0A8I3P 949	CCT8	ATP binding; ATP hydrolysis activity; ATP hydrolysis activity; unfolded protein binding	Binding of sperm to zona pellucida; chaperone-mediated protein folding; pore complex assembly; positive regulation of establishment of protein localization to telomere; positive regulation of telomere maintenance via telomerase; protein stabilization; toxin transport	Cell body; centrosome; chaperonin- containing T- complex; cilium; intermediate filament cytoskeleton; microtubule; microtubule; zona pellucida receptor complex

Thymocyte selection associated high mobility group box	A0A8I3PZX4	TOX	Chromatin DNA binding	CD4-positive, CD25-positive, alpha-beta regulatory T cell lineage commitment; CD8-positive, alpha-beta T cell lineage commitment; cerebral cortex neuron differentiation; lymph node development; natural killer cell differentiation; NK T cell lineage commitment; nucleic acid metabolic process; Peyer's patch development; positive regulation of DNA demethylation; positive regulation of natural killer cell differentiation; positive regulation of neural precursor cell proliferation; positive regulation of neuron projection development; regulation of positive thymic T cell selection	Nucleus
Transmembrane protein 191C	A0A8I3PRH2	TMEM191C	-		-
SEC63 homolog, protein translocation regulator	A0A8I3N658	SEC63	-	Liver development; liver development; multicellular organism aging; nitrogen compound metabolic process; post-translational protein targeting to membrane, translocation; SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	Endoplasmic reticulum; membrane
Tubulin polymerization promoting protein family member 3	A0A8I3N563	TPPP3	Tubulin binding	Decidualization; embryo implantation; microtubule bundle formation; microtubule polymerization	Microtubule bundle; perinuclear region of cytoplasm

Tumor protein p53 binding protein 1	A0A8I3S3V8	TP53BP1	-	DNA damage	-
Vang-like protein	A0A8I3Q337	VANG L1	-	Pigmentation	Lateral plasma membrane
Vesicle amine transport 1	A0A8I3RT77	VAT1	Oxidoreductase activity; zinc ion binding	Negative regulation of mitochondrial fusion	-
WD repeat domain 41	A0A8I3N5E9	WDR4 1	-	Regulation of autophagy	-
Uncharacterized protein	A0A5F4DJ18	-	-	Immune response	Extracellular space
Uncharacterized protein	A0A5F4BYG2	-	-	Immune response	Extracellular space