



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

Fabrizio Grandi

**Perfil fenotípico de potenciais células iniciadoras tumorais
no tumor venéreo transmissível canino *ex vivo***

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

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Noeme Sousa Rocha
Co-orientador(a): Prof. Dr. Bruno Cogliati

**Botucatu
2016**

Fabrizio Grandi

Perfil fenotípico de potenciais células iniciadoras tumorais no tumor venéreo transmissível canino *ex vivo*

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

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Noeme Sousa Rocha
Co-orientador(a): Prof. Dr. Bruno Cogliati

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Grandi, Fabrizioo.

Perfil fenotípico de potenciais células iniciadoras tumorais no tumor venéreo transmissível canino *ex vivo* / Fabrizioo Grandi. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Bruno Cogliati

Capes: 40105008

1. Tumores em animais. 2. Cão - Doenças. 3. Neoplasias.
4. Células-tronco.

Palavras-chave: TVT; cão; células-tronco; neoplasia; tumor.

Fabrizio Grandi

Perfil fenotípico de potenciais células iniciadoras tumorais no tumor venéreo transmissível canino *ex vivo*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientador: Prof(a) Dr(a) Noeme Sousa Rocha

Comissão examinadora

Prof(a). Dr(a) Deilson Elgui de Oliveira
Universidade Estadual Paulista

Prof(a). Dr(a) Maria Lúcia Zaidan Dagi
Universidade de São Paulo

Prof(a). Dr(a) Mirela Tinucci Costa
Universidade Estadual Paulista

Prof(a). Dr(a) Valéria Barbosa de Souza
Universidade Estadual de Campinas

Botucatu, 29 de fevereiro de 2016.

Agradecimentos

A minha família, agradeço a oportunidade de permitir minha contínua formação profissional e pessoal.

A todos os colaboradores que participaram direta ou indiretamente nas diferentes fases do estudo.

Resumo

GRANDI, F. **Perfil fenotípico de potenciais células iniciadoras tumorais no tumor venéreo transmissível canino *ex vivo***. 2016. 122 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

O tumor venéreo transmissível (TVT) canino é uma neoplasia transplantável, considerada um alo-enxerto. Entretanto, pouco se sabe a respeito da origem e processo de carcinogênese. Atualmente, postula-se que alguns tumores originem-se de células iniciadoras tumorais, classicamente descritas nas leucemias mielóide humanas. As características intrínsecas do TVT fornecem indícios de uma possível participação de células iniciadoras tumorais no processo de carcinogênese nesse tumor. Foi realizado estudo de fenotipagem do TVT canino para avaliar a marcação das proteínas CD44, CD133, CD90 e CD34, comumente associadas ao potencial iniciador tumoral. Para tanto utilizou-se a citometria de fluxo, imuno-histoquímica e RTq-PCR. Foram analisados também as frações de crescimento pelo Ki-67) e o número de células em apoptose pela caspase-3 clivada. Trinta e oito amostras de TVT foram obtidas de pacientes sem tratamento quimioterápico prévio. As amostras foram classificadas em plasmocitóide ou mistas, de acordo com o subtipo citológico; as células positivas na citometria de fluxo foram representadas em termos percentuais para os marcadores CD44, CD34, CD90 e CD133; a fração de crescimento foi representada pela técnica do H-Score; a quantidade de células apoptóticas foi representada pelo somatório de células positivas para a caspase-3 clivada; as imunomarcações das proteínas CD44 e CD34 foram representadas por escores semi-quantitativos baseados na intensidade e percentual de células positivas; as expressões de RNAm foram calculadas em termos relativos; ainda, os pacientes foram divididos em grupos resistente e não resistente e comparados quanto a expressão dos marcadores de células iniciadoras supracitados. Não foram observadas diferenças significativas entre os marcadores e os grupos citológicos plasmocitóide e misto; o percentual de células CD44⁺ comumente foi superior a 90%, enquanto que o percentual de células CD34⁺, menor que 0,5%; o percentual de células CD90⁺ e CD133⁺ variou amplamente; houve uma tendência em termos de diferença estatística entre os grupos quimiorresistente e não resistente; houve correlação forte

entre o percentual de células CD133⁺ e CD90⁺ na citometria de fluxo. O estudo permitiu verificar diferentes níveis de expressão protéica e gênica nas amostras de TVT canino; ainda, os grupos citológicos aparentam não possuir diferenças com relação a expressão dos marcadores CD44, CD90, CD133 e CD34; os grupos quimiorresistentes e não-resistentes parecem diferir com relação a expressão dos marcadores de células iniciadoras tumorais.

Palavras-chave: tumor venéreo transmissível canino, célula tronco, células tronco tumorais, neoplasia, carcinogênese.

Abstract

GRANDI, F. **Phenotypic profile related to potential tumor initiating cells in *ex vivo* canine transmissible venereal tumor**. 2016. 122 p. Thesis (Doctoral) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is a transplantable neoplasia considered an allograft. Information about the origin and carcinogenesis process is scarcely known. Currently, some neoplasms are believed to arise from a tumor-initiating cell (TIC's) classically described in human myeloid leukemia. TVT intrinsic characteristics provide evidence of a possible TIC's participation in carcinogenesis process of this malignancy. Thus, a phenotyping study of CTVT was conducted to assess the immunophenotyping properties of the proteins CD44, CD133, CD90 and CD34, already known to be associated to tumor initiator potential. The use of flow cytometry and immunohistochemistry contributed to this purpose. In addition, growth fractions and cells undergoing apoptosis were examined by Ki-67 and caspase-3 cleaved, respectively. Thirty-eight samples were chosen from patients having no previous chemotherapy and cytological diagnosis of CTVT. Samples were classified into plasmacytoid or mixed according to cytological subtype.

Positive cells in the flow cytometry were expressed in percentage for the markers CD44, CD34, CD90 and CD133. H-score technique helped to represent growth fractions. Apoptotic cell quantity was calculated by summing positive cells. Immunohistochemical marking of CD44 and CD34 proteins were determined by semiquantitative scores based on the intensity and percentage of positive cells. Moreover, specimens were divided into resistant and non-resistant groups and compared according cell marker expressions cited before. No significant differences appeared between the markers, and cytological plasmacytoid and mixed groups. The CD44 + cells and CD34 + percentages showed up high and low values, respectively. CD90 + and CD133 + cell percentages presented variable values. Amplitudes of the gene expression values among markers were similar to those observed in flow cytometry with a low expression of CD34, and a high expression of CD44. There was a positive statistical tendency between chemo-resistant and non-resistant groups, as well as a strong correlation between the percentage of CD133 + and CD90 + in flow

cytometry. Besides, cytological groups apparently have no differences with the marker expression of CD44, CD90, CD133 and CD34. Resistant and non-resistant groups to chemotherapy seems to differ with respect to the marker expression of TIC's.

Key words: canine transmissible venereal tumor, stem cells, cancer stem cells, neoplasia, carcinogenesis.

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Perfil fenotípico de potenciais células iniciadoras tumorais no tumor venéreo transmissível canino *ex vivo***" Protocolo nº 93/2014-CEUA, da Professora Noeme Sousa Rocha, a ser conduzido por Fabrizio Grandi, desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 15 de janeiro de 2016.



Profª. Ass. Drª. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Lista de ilustrações

Fotografia 1 - Tumor venéreo transmissível em cão, sexo masculino. Apresentação clínica	84
Fotografia 2 - Tumor venéreo transmissível em cão, sexo feminino. Apresentação clínica	85
Fotomicrografia 1 - Punção aspirativa por agulha fina, tumor venéreo transmissível canino. Apresentação cito-morfológica	86
Fotomicrografia 2 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Apresentação histo-morfológica	87
Fotomicrografia 3 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imuno-histoquímica CD44	88
Fotomicrografia 4. Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imuno-histoquímica CD44	89
Fotomicrografia 5 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imuno-histoquímica Ki-67 (H-Score)	90
Fotomicrografia 6 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imuno-histoquímica caspase-3 clivada	91
Fotomicrografia 7 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imuno-histoquímica CD34	92
Fluxograma de análise 1 - A) Imagem representativa da distribuição das células segundo tamanho e complexidade. Seleção de 79,2% das células. B) Seleção da população CD45 ⁻ . C) Análise da população de células CD44 ⁺	93

Fluxograma de análise 2 - A) Imagem representativa da distribuição das células segundo tamanho e complexidade. Seleção de 79,2% das células. B) Seleção da população CD45 ⁻ . C) Controle isotípico PE (linha azul); controle isotípico APC (linha vermelha)	94
Fluxograma de análise 3 - A) Imagem representativa da distribuição das células segundo tamanho e complexidade. Seleção de 79,2% das células. B) Seleção da população CD45 ⁻ . C) Controle branco (linha vermelha)	95
Fluxograma de análise 4 - A) Imagem representativa da distribuição das células segundo tamanho e complexidade. Seleção de 79,2% das células. B) Seleção da população CD45 ⁻ . C) Seleção da população CD44 ⁺ e discriminação de 10% das subpopulações com maior e menor sinal através da mensuração da intensidade média de fluorescência	96
Desenho 1 – Distribuição mundial do TVT	113
Desenho 2 – Modelos de heterogeneidade e propagação tumoral	114
Desenho 3 – Padrões de divisão das células-tronco	115
Desenho 4 – Origem das células tronco-tumorais e pontos de mutação oncogênica	116
Desenho 5 – Teoria da origem das células iniciadoras tumorais	117
Quadro 1 – Principais marcadores de superfície utilizados na identificação de células iniciadoras tumorais em neoplasias de cães e gatos	83
Quadro 2 – Número do caso, sexo, idade (em anos), raça, tempo para remissão tumoral completa (RTC, em dias) de 38 pacientes. Pacientes perdidos no seguimento clínico (P)	97

Quadro 3 – Número do caso, tipo citológico, percentual de células CD90+, CD44+, CD133+ e CD34+ na citometria de fluxo de 38 pacientes	98
Quadro 4 – Número do caso e expressões relativas dos genes CD90, CD44, CD133 e CD34 por RT-PCR em 28 pacientes	99
Quadro 5 – Número do caso, escores imuno-histoquímicos CD44 e CD34, Ki-67 (H-Score), caspase-3 clivada e índice mitótico em 38 pacientes	100
Quadro 6 - Comparações entre as características das células tronco adultas normais (CTA) e iniciadoras tumorais (CIT).....	118

Lista de tabelas

Tabela 1 - Testes de normalidade de Shapiro-Wilk em 38 amostras de tumor venéreo transmissível submetidas a análise por citometria de fluxo	101
Tabela 2 - Padrão de distribuição dos dados e diferenças no percentual de células positivas entre os grupos citológicos de 38 amostras de tumor venéreo transmissível canino submetidos a análise por citometria de fluxo	102
Tabela 3 - Padrão de distribuição dos dados das populações CD44 ^{alta} e CD44 ^{baixa} de 38 amostras de tumor venéreo transmissível canino submetidas a análise por citometria de fluxo	104
Tabela 4 - Padrão de distribuição dos dados e diferenças entre os grupos citológicos em relação aos 10% da população com maior e menor intensidade média de fluorescência de 38 amostras de tumor venéreo transmissível canino submetidos a análise por citometria de fluxo	105
Tabela 5 - Testes de normalidade de Shapiro-Wilk em 28 amostras de tumor venéreo transmissível submetidos a análise por qRT-PCR	106
Tabela 6 - Padrão de distribuição dos dados e diferenças na expressão de RNAm nos grupos plasmocitóide e misto em 28 amostras de tumor venéreo transmissível canino submetidos a análise por qRT-PCR	108
Tabela 7 - Diferença no escore imuno-histoquímico entre os grupos plasmocitóide e misto em 28 amostras de tumor venéreo transmissível submetidos a análise imuno-histoquímica	110

Tabela 8 - Diferença entre os grupos quimio-resistente e não resistente em 16 pacientes com seguimento clínico completo no quesito expressão de CD133 e CD34 por citometria de fluxo111

Tabela 9 - Graus de correlação entre os marcadores em 38 pacientes com tumor venéreo transmissível submetidos a análise por citometria de fluxo.112

Tabela 10 - Grau de correlação entre os marcadores em 28 pacientes com tumor venéreo transmissível submetidos a análise por RT-PCR.....112

Tabela 11 - Grau de correlação entre a RT-PCR e a citometria de fluxo em 28 pacientes com tumor venéreo transmissível.....112

Lista de abreviaturas e siglas

- AACR Associação Americana para Pesquisa do Câncer
ACM-1 activated macrophage-specific antigen
ALDH aldeído desidrogenase
CIT células iniciadoras tumorais
DFDT doença facial dos diabos da Tasmânia
DNA ácido desoxi-ribunocléico
FACS separação de células ativadas por fluorescência
LLA leucemia linfoblástica aguda
LMC leucemia mielóide crônica
MACS separação de células ativadas magneticamente
MHC II Complexo de histocompatibilidade maior, classe II
NK natural killer
NOD diabéticos não obesos
NOD/SCID camundongos diabéticos não obesos com imunodeficiência severa combinada
OSA osteossarcoma
qRT-PCR Reação em cadeia da polimerase acoplada à transcriptase reversa
RNAm ácido ribo-nucleico mensageiro
TVTC tumor venéreo transmissível canino
UNESP Universidade Estadual Paulista

Sumário

1. Introdução	17
2. Revisão de literatura.....	19
3. Hipóteses do estudo.....	39
4. Objetivos	40
5. Periódico e Artigo	41
Abstract.....	43
Introduction	44
Material and Methods.....	45
Results	50
Discussion.....	52
Conclusion	56
References.....	57
Figure legends	63
Referências	68
Apêndices.....	82
Anexos	112

1. INTRODUÇÃO

O estudo do tumor venéreo transmissível canino (TVTC) tem contemplado sua origem, clonalidade, biologia, imunoterapia e tratamento. Recentemente, as propriedades morfológicas, moleculares e biológicas do TVTC permitiram elaborar a hipótese de que esse tumor represente um modelo à exploração do ínico da tumorigênese associado às células iniciadoras tumorais (CIT's) (O'NEILL, 2011). Entretanto, nenhum estudo sob essa perspectiva foi formalmente delineado para o TVTC.

A teoria das células iniciadoras tumorais propõe que o câncer seja composto por populações heterogêneas de células neoplásicas, organizadas de forma hierárquica e com diferentes capacidades de autorenovação, proliferação e diferenciação. Apenas uma parcela restrita da população total teria capacidade tumorigênica prolongada e de recapitular a heterogeneidade inerente aos tumores (WANG; DICK, 2005).

Nas últimas décadas, as pesquisas disponibilizaram diversas técnicas de identificação, isolamento e caracterização de células tumorais com potencial tumorigênico *in vivo* e *in vitro* (TIRINO et al., 2013). Entretanto, a dissociação celular e exposição aos meios de cultivo podem influenciar a expressão de genes, proteínas e o comportamento biológico das células tumorais, dificultando a extrapolação exata dos resultados para a condição original no paciente (HILL, 2006; WELTE et al., 2010). Os ensaios mais utilizados incluem a identificação por marcadores de superfície e o isolamento por citometria de fluxo, teste do corante *Hoechst* (população *side*), atividade aumentada da aldeido-desidrogenase (ALDH), potencial clonogênico (esferoides ou colônias), testes de quimio-resistência, tumorigenicidade e a análise do perfil molecular (TIRINO et al., 2013).

A seleção de moléculas indicadoras de CIT's varia de acordo com o tumor e inclui as proteínas CD20, CD24, CD117, CD44, CD34, CD133 e o CD90 (TIRINO, 2013). Atualmente, não foi descoberto nenhum marcador universal de CIT's (LISA; ARGYLE, 2010).

As CIT's foram descritas em diversos tumores de cães e gatos. Entretanto, até o presente momento, nenhum trabalho abordou a questão no TVTC, o que abre a

possibilidade de um estudo inédito.

Atualmente, há uma carência de trabalhos com amostras de tumores sólidos *ex vivo*. Tais estudos são considerados padrão ouro na análise da expressão de moléculas indicadoras de CIT's (KEYSAR, JIMENO 2010), visto que pesquisas *in vitro* apresentam limitações relacionadas à manipulação.

Os resultados auferidos no estudo do TVTC, podem ampliar as opções estratégicas para o tratamento de outros tipos de câncer que representem o modelo das CIT's. Ainda pode haver considerável contribuição para a preservação de espécies sob risco de extinção devido a doenças relacionadas, como a Doença Facial dos Demônios da Tasmânia (DFDT) (O'NEILL, 2011).

O presente estudo foi delineado almejando fornecer indícios iniciais de que as existam populações de CIT's no TVTC, até agora inexplorados. A partir desses resultados, novos delineamentos experimentais tem sido desenvolvidos por nossa equipe de pesquisa com o objetivo de sedimentar a linha de estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Tumor venéreo transmissível canino

O tumor venéreo transmissível canino é uma das neoplasias somáticas mais antigas e que tem estimulado esforços contínuos na determinação da origem, modo de transmissão e fatores associados a regressão espontânea (MURCHINSON et al., 2014). Outros potenciais tumores transplantáveis incluem os sarcomas de células reticulares em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) e leucemia hemocítica em moluscos (*Mya arenaria*) (OSTRANDER, et al., 2016). Na espécie humana não há descrições de tumores naturalmente transplantáveis. Entretanto, a transplantação pode ocorrer em situações específicas como o parto, transplantes e procedimentos cirúrgicos. Em todas as ocasiões, deve existir um certo grau de privilégio imunológico (por ex. imunossupressão) (SIDDLER; KAUFMAN, 2014).

Inicialmente descrito em Londres em 1810 (STRAKOVA; MURCHISON, 2015) e posteriormente caracterizado por Novinski em 1826, atualmente o TVTC é considerado um aloenxerto transplantável. O cariótipo aneuplóide e as características cromossômicas específicas como a inserção da sequência LINE-1 próximo ao gene *C-MYC*, em todos os TVTC's de regiões geográficas distintas, sugerem uma origem comum e favorecem a teoria do transplante contínuo de células a gerações (HARMELIN et al., 2001; MURGIA et al., 2006).

Atualmente, acredita-se que o tumor venéreo transmissível originou-se há milhares de anos em lobos ancestrais do leste asiático. Ao longo da história evolutiva da doença, instabilidades genéticas teriam gerado mutações de caráter cumulativo, estabilizadas após passagens subsequentes (MURGIA et al., 2006).

O TVTC tem sido descrito na maioria dos continentes, exceto na Antártica. É comumente relatado em regiões tropicais e subtropicais, incluindo a região meridional dos Estados Unidos, Américas Central e do Sul, sudeste da Europa, Irlanda, China, Oriente Médio, África, Bahamas, Japão, Índia e no Brasil (GANGULY et al., 2013; AMARAL et al., 2004).

Strakova e Murchinson (2015) em uma análise da distribuição global do TVTC, tanto histórica quanto atual, observaram prevalências médias entre 1-10% na maioria

dos países da América do Sul e Central, Ásia e África (Anexo A). O Canadá, República Tcheca, Finlândia, Nova Zelândia, Suíça, Suécia e Reino Unido declararam-se livres da doença. Variações geográficas em algumas regiões da Europa e Estados Unidos também foram relatadas. Países desenvolvidos com economias estáveis, apresentam menor prevalência da doença.

Strakova e Murchinson (2015) na análise histórica de Londres e Tailândia, observaram reduções significativas na prevalência após o advento de políticas públicas de responsabilidade civil ou campanhas de esterilização, respectivamente, culminando na erradicação da doença nos dias atuais. De modo similar, rígidas políticas de quarentena para cães importados mantêm a Nova Zelândia livre da doença. Ainda, segundo os autores, o estado de saúde e o número de cães errantes também estão associados a maiores taxas.

No Brasil, em um estudo epidemiológico regional conduzido no Município de Botucatu durante os anos de 1994 e 2003, demonstrou que 17,1% dos resultados de exames citopatológicos oriundos do Serviço de Citopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, corresponderam ao diagnóstico de TVTC. No total, foram consultados 5.798 exames citológicos em cães. A taxa de incidência anual variou de 11,8% a 24,1% durante o período considerado (AMARAL et al., 2013).

Os dados referentes a predisposição racial, sexual ou etária são contraditórios e dependem principalmente da região ou país considerados. De forma geral, a doença prevalece em animais sexualmente maduros, comumente entre 2 e 8 anos de idade (GANGULY et al., 2013), não havendo predisposição racial ou sexual (GANGULY et al., 2013; STRAKOVA; MURCHINSON, 2015).

O modo de transmissão do tumor venéreo transmissível é um tanto peculiar. O sucesso da transplantação das células neoplásicas depende de inúmeros fatores dentre os quais, a presença de soluções de continuidade na barreira epitelial do tecido receptor, o *status* imunológico do hospedeiro e a viabilidade das células tumorais. O coito corresponde a via transversal mais comum; o transplante ocorre por esfoliação celular e nidação à mucosa genital. Entretanto, comportamentos sociais, incluindo lambeduras, arranhaduras, mordeduras e o ato de farejar, bem como hábitos maternos e o parto participam ativamente na transmissão, embora em menor escala (GANGULY et al., 2013).

As células neoplásicas do TVTC, após a transplantação, devem suplantam os

mecanismos de defesa antitumorais relacionados ao reconhecimento do complexo de histocompatibilidade da classe II (MHC II) das células tumorais por leucócitos do hospedeiro. A subexpressão das moléculas de MHC da classe II por parte das células neoplásicas e a conversão de seu microambiente para um estado de imunossupressão local, são as principais estratégias de evasão imune. Mais recentemente, modificações genéticas adquiridas nas células tumorais tem contribuído para a resistência (STRAKOVA; MURCHINSON, 2015).

O tumor venéreo transmissível apresenta três fases clínicas subsequentes denominadas fase progressiva (4-6 meses), estática e regressiva (MUKARATIRWA et al., 2006; GANGULY et al. 2013), em condições de não intervenção terapêutica. Em cada uma delas, há significativa variação no índice mitótico, apoptótico, número de linfócitos e mastócitos intratumorais, microdensidade vascular, e nas características estromais (MUKARATIRWA et al., 2006). Entretanto, pontos de corte referentes as variáveis citadas são inexistentes. Além disso, a definição exata do estágio, depende do acompanhamento clínico.

O tumor venéreo transmissível apresenta-se frequentemente como formações vegetantes ou polipoides multilobulares, friáveis, com superfície rosácea, branca ou vermelha, com hemorragia e ulceração, medindo até 15 cm (Apêndice B). Nas fêmeas, ocorre com maior frequência no vestíbulo, vagina e lábios vulvares; nos machos, no bulbo da glândula, *pars longa glandis* e a glândula peniana.

Os sítios extragenitais como a pele, cavidade oral, mucosas conjuntivais, linfonodos, baço, ovários, glândula mamária, região perianal, fígado, pulmão, músculo esquelético e testículos também podem ser acometidos, mesmo na ausência de lesões genitais (AMARAL et al., 2004; GANGULY et al., 2013). A localização anatômica dita os sinais clínicos, normalmente associados ao efeito de compressão ou invasão de tecidos nas adjacências. Apesar de incomuns, metástases em linfonodos inguinais, ilíacos externos, mesentéricos, rins, baço, fígado, globo ocular, tonsilas, encéfalo, pituitária, pele, osso e peritônio são relatados (GANGULY et al., 2013).

Os métodos diagnósticos utilizados no tumor venéreo transmissível incluem a análise citológica, histopatológica, imuno-histoquímica, cito-genética e a reação em cadeia da polimerase (GANGULY et al., 2013).

A análise citológica é o método de eleição para o diagnóstico do tumor venéreo transmissível (DUNCAN & PRASSE, 1979). De forma geral, a população celular é

representada por abundante quantidade de células redondas, medindo entre 14 a 30 µm individualizadas, caracterizadas por citoplasma com contornos distintos, discretamente basófilo, contendo múltiplos vacúolos claros e redondos dispersos. Os núcleos são excêntricos ou centrais, apresentam contornos regulares, cromatina agregada e nucléolos distintos. As figuras de mitose são frequentes (WELLMAN, 1990). Os subtipos citológicos são categorizados em plasmocitoide, linfocitoide e misto com base na quantidade e semelhança dos oncócitos com linfócitos e plasmócitos. FLÓREZ et al. (2012) descrevem o tipo linfocitoide como sendo composto por mais de 60% de células redondas, caracterizadas por citoplasma de aspecto granular fino, contendo discreta quantidade de vacúolos claros; os núcleos são redondos, tendendo a centralização, com heterocromatina evidente e com 1 a 2 nucléolos distintos. O tipo plasmocitoide é composto por mais de 60% de células ovais, com citoplasma em abundante quantidade, menor relação núcleo:citoplasma, maior quantidade de vacúolos claros e núcleo excêntrico. O tipo misto apresenta células plasmocitoides e linfocitoides, porém com nenhuma das populações excedendo 59% do total de células (Apêndice C).

A classificação citomorfológica apresenta importância prognóstica (AMARAL et al., 2007). Os plasmocitoides estão geralmente associados a maior frequência em sítios extragenitais, metástases, anormalidades nucleares (por ex. quantidade de micro-núcleos), lobulações nucleares, macrocariose, área nucleolar, relação nucléolo:núcleo, número de nucléolos, diâmetro nuclear e nucleolar (GASPAR, 2005). Apresentaram ainda, maiores frações de crescimento (índice Ki-67), expressão de glicoproteína P, danos ao DNA no teste do cometa e menor resposta a quimioterapia (AMARAL, 2005; AMARAL et al. 2007; BASSANI-SILVA et al., 2007; GASPAR et al., 2010).

As características histológicas comuns enquadram o tumor venéreo no espectro dos tumores de células redondas. O TVTC é caracterizado por lençóis e ninhos de células neoplásicas, distribuídas em padrão difuso e sustentadas por trabéculas de tecido estromal fibrovascular. As células são grandes, redondas e apresentam núcleos grandes, vesiculares, geralmente com nucléolo único e central proeminente. O citoplasma é granular, eosinófilo, vacuolizado e com bordos distintos (APÊNDICE D). Há infiltração variável por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, dependente da fase clínica (MOZOS et al., 1996).

As células do TVTC são caracterizadas por imunoreatividade a vimentina,

lisozima, α -1 antitripsina e antígeno específico de macrófagos (*ACM-1*) e negativas para as citoceratinas, S100, CD3, α -actina de músculo liso (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997; GANGULY et al., 2013; MUKARATIRWA et al., 2003). Alguns casos demonstram imunofenótipo positivo para NSE (Enolase Neurônio Específica), desmina, IgG, IgM e cadeias leves de imunoglobulinas (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997). Além disso, são negativas para Melan A, CD117, CD79, CD20, PAX-5 e E-caderina. A expressão dos marcadores supracitados suporta a hipótese de que o TVTC tenha uma origem histiocítica (MOZOS et al., 1996).

A reação em cadeia da polimerase também pode ser utilizada no diagnóstico do TVTC. Pesquisas detectaram um rearranjo no gene *C-MYC* por uma inserção de sequência denominada elemento intercalado longo (*LINE-1*) que está presente em todos os TVTC, independente da região geográfica (MURGIA et al., 2006; GANGULY et al., 2013).

TVTC e as células iniciadoras tumorais

Recentemente, O'Neill (2011) em uma revisão concisa, abordou o TVTC e outra doença correlata, denominada Doença Facial do Diabo da Tasmânia (*Sarcophilus harrisi*) ou DFDT, sob a perspectiva do modelo de carcinogênese relacionado as células iniciadoras tumorais. O autor elenca características comuns as CIT's e células-tronco normais incluindo a autorenovação ilimitada, divisão assimétrica e a expressão de genes associados ao potencial tronco, além de abordar o potencial de alotransplantação e xenotransplantação observados no TVTC.

O potencial de autorenovação contínua do tumor venéreo transmissível é apoiado pela história natural da doença e fundamentado por estudos experimentais de transplantação em camundongos, coiotes, chacais, raposas e cães domésticos (O'NEILL, 2011).

Os modelos experimentais murinos de xenotransplantação seriada do TVTC apoiam a hipótese de que existam células capazes de autorenovação (HOLMES et al., 1981; HARMELIN et al., 2001; KREISS et al., 2011). Camundongos com imunodeficiência combinada severa e diabéticos não obesos (*NOD/SCID*) inoculados com suspensões de células do tumor primário, cultivo celular primário ou células de segunda passagem de xenotransplantes murinos, desenvolveram tumores dentro de

semanas (HARMELIN et al., 2001; STETTNER et al., 2005; KREISS et al., 2011). Ainda é interessante notar que camundongos inoculados com suspensões de células tumorais inativadas por diferentes métodos não desenvolveram a neoplasia, afastando a hipótese de participação viral (KREISS et al., 2011).

O número de células necessárias para estabelecer um novo tumor em cães e modelos murinos é conhecido (GANGULY et al. 2013). Modelos experimentais de alotransplantação foram reproduzidos com sucesso em cães com inóculos subcutâneos de até 1×10^8 células tumorais do tumor primário ou oriundas de cultivo (MIZUNO et al., 1994; MIZUNO et al., 1996; HSIAO et al., 2002; LIU et al., 2008; CHUANG et al. 2009). Ainda, apenas 13% das células transplantadas no subcutâneo de cães, sobreviveram e contribuíram para a tumorigênese (HOLMES, 1981). Koike et al. (1979) em estudo de alotransplantação seriada com filhotes de cães, conseguiram manter as características histológicas e cariotípicas do tumor original por um período de 12 anos compreendendo um total de 50 passagens. Karlson et al. (1952) também conseguiram manter o TVTC por 40 gerações de cães durante 17 anos mantendo as características histopatológicas. A maioria dos estudos utilizou populações celulares não “enriquecidas” *in vitro* para qualquer CIT (O’NEILL, 2011), o que pode sugerir que exista grande quantidade desse tipo celular no TVTC. De fato, é altamente provável que tumores menos diferenciados e homogêneos contenham um alto número de células iniciadoras tumorais (VERMEULEN et al., 2008).

A expressão de genes comumente superexpressos em populações de células iniciadoras tumorais, foi descrita no tumor facial dos diabos da Tasmânia (O’NEILL, 2011). Em um estudo transcriptômico de amostras de DFDT, neoplasia análoga ao TVTC, Murchison et al. (2010), demonstraram superexpressão de *SOX-2*, *NESTINA*, *OCT6*, *CD44* e *CD133*, evidências moleculares sugestivas de um potencial iniciador. Entretanto, deve-se observar que a expressão gênica reflete o perfil da população tumoral total, não refletindo a hipótese de que apenas subpopulações do tumor portariam fenótipo de CIT (O’NEILL, 2011). Embora não se deva superestimar os resultados obtidos por Murchison et al. (2010), esses resultados abrem perspectivas para o estudo detalhado no tumor venéreo transmissível canino (O’NEILL, 2011).

Teoria das Células Iniciadoras Tumerais

O modelo de evolução clonal do câncer foi o principal tema da pesquisa oncológica no último século. O modelo postula que qualquer célula tumoral tem igual probabilidade de adquirir alterações genéticas e/ou epigenéticas que confirmam vantagens de crescimento, autorenovação e geração de novos tumores. O modelo das células iniciadoras de tumor foi elaborado no mesmo período e postula que apenas uma subpopulação de células tumorais específicas apresentem capacidade de autorenovação, diferenciação multi-linhagem relacionada a divisão assimétrica e tumorigênese. As células progenitoras e diferenciadas, derivadas da população parental tronco, perderiam tais capacidades, sendo consideradas não tumorigênicas (O'CONNOR et al., 2014). No final, as neoplasias se enquadrariam em um modelo de evolução hierárquica do câncer. Entretanto, ambos os modelos, não são mutuamente exclusivos, podendo ocorrer em diferentes estágios da carcinogênese (VISVADER; LINDEMAN, 2008) de forma concomitante (Anexo B).

Neste ponto, torna-se necessária para o estudo, uma breve revisão da terminologia básica utilizada na biologia das células-tronco normais.

As células-tronco são células primitivas que apresentam potencial de diferenciação multilinhagem, determinado por programas genéticos e epigenéticos e autorenovação ilimitada. A autorenovação ocorre por divisão simétrica ou assimétrica (TANG, 2012). A principal característica, especialmente das células iniciadoras de tumor (TANG, 2012), é a propriedade de divisão assimétrica, responsável por expandir a população de células original e também originar células progenitoras com potencial limitado de diferenciação e autorenovação (NEMETH; KARPATI, 2014; TROSKO, 2009). Em contrapartida, a divisão simétrica origina duas células filhas com perfil fenotípico igual a célula-mãe. Os três tipos de divisão estão ilustrados no Anexo C.

A potencialidade das células-tronco é outro termo que merece destaque. As células totipotentes são aquelas presentes no embrião e capazes de originar todas as células de um organismo e tecidos extraembrionários; células pluripotentes estão presentes no embrioblasto e originam todos os tecidos do corpo; células multipotentes e unipotentes existem no embrião e no adulto. No adulto, as células multipotentes apresentam capacidade de diferenciação multilinhagem (por ex. células-tronco

multipotentes hematopoiéticas); por último, as células unipotentes diferenciam-se em apenas uma linhagem (por ex. células-tronco onipotentes das criptas intestinais) (NEMETH; KARPATI, 2014).

As células-tronco podem ainda ser classificadas quanto à distribuição e localização em células-tronco embrionárias, fetais, adultas, amnióticas, umbilicais, epidérmicas, neurais e tumorais (NEMETH; KARPATI, 2014).

Atualmente, a origem das células iniciadoras tumorais tem sido discutida (Anexo D e E). As células-tronco normais seriam as primeiras candidatas à transformação maligna, como pode ser observado em pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) e linfoblástica aguda (LLA). A LMC é caracterizada pela presença de translocações cromossômicas específicas, como por exemplo t(9:22) ou cromossomo Filadélfia, em suas células-tronco hematopoiéticas CD34⁺CD38⁻CD19⁻ (GUO et al., 2006).

Outro potencial alvo são as células progenitoras multipotentes. As translocações cromossômicas e expressão de genes aberrantes foram descritos em células CD34⁺CD38⁻CD19⁺ de pacientes com LLA (GUO et al., 2006). A progressão de pacientes com leucemia mielóide crônica para a fase de crise blástica envolve a ativação de programas de autorenovação em células progenitoras, demonstrando que diferentes fases e doenças apresentam também origens distintas em termos celulares (AILLES; WEISSMAN, 2007).

A rediferenciação ou desdiferenciação de células somáticas diferenciadas para estados mais primitivos com aquisição *de novo* de autorenovação, é outro modelo proposto para a origem das células-tronco tumorais (SOLTYYSOVA et al., 2005). A célula somática deve ser reprogramada para adquirir capacidade de proliferação ilimitada e capacidade de divisão assimétrica (TROSKO, 2009).

Os modelos acima descritos, podem ser categorizadas conforme Liu et al. (2012) (Anexo E), em Teoria do Bloqueio de Diferenciação e Teoria da Desdiferenciação, sendo complementadas por uma terceira, pouco estudada, denominada Teoria da Fusão.

Kreso e Dick (2014) distinguem as células iniciadoras tumorais e tronco neoplásicas com base, principalmente, na capacidade tumorigênica e isolamento prospectivo. Em suma, as CIT's não seriam passíveis de isolamento por representarem estágios iniciadores e não iniciadores transitórios de uma mesma célula, advindos de plasticidade celular reversível (TANG et al., 2012; GUPTA et

al.,2009). Finalmente, os autores reservam o termo para os casos em que marcadores de superfície ainda não foram mapeados e portanto, o isolamento prospectivo não é possível.

A Associação Americana para Pesquisa do Câncer (AACR), em 2006, estabeleceu que uma célula-tronco tumoral é aquela que apresenta autorenovação prolongada e capacidade de diferenciação multilinhagem (CLARKE et al., 2006).

O termo células iniciadoras tumorais, abrange as células-tronco tumorais propriamente ditas, ou seja, células com autorenovação ilimitada, e capazes de diferenciação, e as células progenitoras que são aquelas que perderam o potencial de autorenovação a longo prazo, porém ainda podem apresentar potencial tumorigênico (TANG et al., 2012). O Quadro 1 (Anexo F), resume as principais semelhanças entre as células iniciadoras tumorais e as células-tronco normais adultas.

A primeira evidência da existência das células iniciadoras tumorais foi descrita por Bonnet e Dick em 1997, que estudaram pacientes humanos com leucemia mielóide aguda (LMA). O isolamento de células CD34⁺/CD38⁻ desses pacientes e a xenotransplantação em camundongos *SCID/NOD* permitiu a reconstituição completa do espectro fenotípico da LMA. Os autores denominaram essa subpopulação tumorigênica de células iniciadoras leucêmicas que além das propriedades descritas, apresentavam alto potencial de autorenovação, proliferação e diferenciação, sendo passíveis inclusive de seleção prospectiva, independentemente do fenótipo do tumor principal (WANG et al., 2005). Estudos ainda demonstraram que a células iniciadoras leucêmicas pertenciam a subpopulações negativas para marcadores de linhagem (Lin⁻) (AILLES; WEISSMAN, 2007).

Posteriormente à descoberta das CIT's em malignidades hematopoiéticas, Al-Hajj et al. em 2003, relataram a existência de baixa quantidade de células CD44⁺CD24^{-/baixo} em tumores mamários humanos, capazes de iniciação tumoral, mimetização das características do tumor primário em camundongos *NOD/SCID*, formação de mamosferas e alta atividade de ALDH (HERMAN et al., 2010). Nos anos subsequentes, o trabalho de Al-Hajj foi reproduzido e descrito em tumores sólidos humanos, incluindo os pulmonares, ovarianos, cerebrais e melanomas (CHEN et al., 2013).

Células iniciadoras em tumores sólidos de cães e gatos

Na medicina veterinária, candidatas a células iniciadoras tumorais foram estudados em neoplasias sólidas de cães e gatos. O quadro 1 (Apêndice A), resume os principais marcadores de superfície e os trabalhos publicados.

Wilson et al. (2007), em estudo com linhagens celulares de osteossarcomas caninos e humanos submetidos ao modelo dos esferóides tumorais, demonstraram capacidade autoreplicativa constante e a longo prazo. Ainda, as células “enriquecidas” foram capazes de transitar entre a formação de esferóides e colônias aderentes de modo constante, com expressão dos genes *STAT3*, *NANOG* e *OCT4*.

Cocola et al. (2009), verificaram potencial de autorenovação e presença de células $CD44^+$ e $CD133^+$ em esferóides tumorais e mamóferas em oito amostras de neoplasias mamárias de cães. Ainda, utilizando camundongos *NOD/SCID*, relataram células com potencial tumorigênico oriundas dos esferóides tumorais.

Cogliati et al. (2010), demonstraram a presença de hepatócitos $CD44v5^+$ e $CD133^+$ em carcinomas hepatocelulares, sugerindo a participação de células progenitoras diferenciadas na carcinogênese. Raras células $CD44v5^+$ foram evidenciadas nos colangiocarcinomas.

Michishita et al. (2011), estudaram quatro linhagens celulares de adenocarcinomas mamários em cães e demonstraram subpopulações de células iniciadoras tumorais com fenótipos distintos. Os mesmos autores observaram células $CD44^+CD24^-$, $CD44^+CD24^+$ e $CD44^-CD24^-$ em diferentes proporções. Todas as linhagens foram capazes de originar esferóides tumorais “enriquecidos” com células $CD44^+CD24^-$ resistentes a doxorrubicina, com grande capacidade tumorigênica e superexpressão dos genes *OCT4*, *SOX2*, *BMI-1*, *STAT3*, *CD34*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *GLI-1*, *MDR* e *CD133*.

Ferletta et al. (2011), demonstraram perfil fenotípico $CD10^{\text{baixo}}/CD34^+/CD44^+/CD24^{\text{baixo}}$ em células obtidas de esferóides tumorais oriundas de linhagem celular estabelecida de um tumor mamário misto benigno atípico. Os percentuais de expressão citados corresponderam a 2-5% das células $CD34^+$, 80-95% $CD44^+$ e poucas $CD24^+$. Segundo os autores, o “enriquecimento” de células $CD133^+$ em modelos de esferóide tumoral também é possível.

Nemoto et al. (2011), demonstraram populações *side*, oriundas de linhagem

celular de adenocarcinoma pulmonar primário de cão, com potencial tumorigênico *in vivo*, dez vezes superior à população não *side*. As células não *SP* também apresentaram potencial tumorigênico, porém com inóculos celulares em concentrações superiores. Não houve a comparação do perfil imuno-histoquímico entre o tumor primário e xenográfico.

Blacking et al. (2011a), estudando linhagens celulares de melanoma, osteossarcoma, carcinoma mamário canino, humano e felino, gliomas, hemangiossarcoma e linfoma de células B observaram que a subpopulação de células CD44^{alta} apresentavam maior percentual de células em fase G2/M em relação as CD44^{baixa}, maior velocidade de proliferação em cultivo, habilidade superior para formação de colônia e esferoides tumorais. Os autores sugeriram que a proteína CD44 estaria associada ao fenótipo proliferativo, ao invés de iniciador tumoral.

Michishita et al. (2012), caracterizaram e demonstraram a presença de células-tronco tumorais em linhagens de carcinoma mamário de cadelas, usando ensaios enzimáticos (ALDH), imuno-histoquímicos (citoceratinas específicas, vimentina e p63), tumorigênicos (camundongos *NOD*), além de citometria de fluxo (CD44 e CD24) e qRT-PCR (gene *ALDH*).

Moulay et al. (2013), observaram marcação expressiva em células CD44⁺ na citometria de fluxo e abundante quantidade de mRNA por qRT-PCR em linhagens celulares de carcinomas e cistos prostáticos de cães, com diferenças significativas entre ambos os métodos de análise. Três linhagens de adenocarcinomas prostáticos, CT1258, CT1258-EGFP e CT1258-EGFPHMGA2, quando analisados por ambos os métodos supracitados, demonstraram resultados conflitantes em relação aos níveis de expressão de CD44 observados. Por exemplo, as duas primeiras linhagens demonstraram níveis similares de RNAm, porém diferentes intensidades de marcação na citometria. Ao contrário, o CD133 demonstrou variação significativa com diferenças seis vezes superiores entre as linhagens. Os níveis de RNAm do CD34 foram quase indetectáveis ou ausentes em todas as linhagens.

Magalhães et al. (2013), verificaram que há correlação significativa entre a expressão de CD44 e CD24 e os graus histológicos de malignidade em 130 tumores mamários.

Pang et al. (2014a), não encontraram diferenças significativas entre o grau de resistência aos efeitos citotóxicos dos inibidores COX-2 seletivo mavacoxib em células CD34⁺ e CD34⁻ de linhagens celulares de osteossarcomas caninos, concluindo que a

sensibilidade às drogas não é afetada pelo perfil fenotípico relacionado ao CD34.

Os estudos de Pang et al. (2014b), com linhagem celular de osteossarcoma canino, mostraram que aproximadamente 1% de células CD34⁺ foram capazes de formar esferoides com superexpressão dos genes *NANOG*, *OCT4*, *STAT3* e *ALDH3A1*, passíveis de expansão *in vitro* em condições não aderentes.

Guth et al. (2014) estudaram linhagens celulares de melanomas e osteosarcomas (OSA) e demonstraram maior percentual de células CD44⁺ em relação as amostras obtidas por biópsia ou citologia aspirativa. As amostras *ex vivo* demonstraram percentuais variados de células CD44⁺, comumente baixos; por outro lado, as linhagens apresentaram valores superiores a 95%. Ainda, o percentual de células CD133⁺ e CD34⁺ foi considerado muito baixo. Vale lembrar que as diferenças relatadas para os melanomas foram: CD44⁺ *ex vivo* (32%) < *in vitro* (próximo ao 100%); CD133⁺ *ex vivo* > *in vitro*; CD90⁺ e CD44⁺ *in vitro* > *ex vivo*. Por outro lado, os OSA, apresentaram os seguintes valores: CD133⁺ e CD34⁺ *ex vivo* > *in vitro*; CD44⁺ e CD90⁺ *in vitro* > *ex vivo*. Kim et al. (2013), também demonstraram diferentes percentuais de células *SP* em linhagens e amostras *ex vivo*.

Outro estudo de Michishita et al. (2014), com linhagens celulares de carcinomas hepatocelulares de cães, demonstraram subpopulações de células iniciadoras tumorais *in vitro* e *ex vivo*. Amostras de células *in vitro* com perfil iniciador tumoral CD44⁺ (98,33%), CD90⁺ (35,7%), CD133⁺ (5,63%), CD34⁺ (1,43%), CD44⁺CD90⁺ (18,01%), CD44⁺CD90⁻ (78,61%), CD44⁻CD90⁺ (0,45%), CD44⁻CD90⁻ (2,91%) foram quantificadas por *FACS*. Ao comparar subpopulações CD44⁺CD90⁻ e CD44⁺CD90⁺ houve maior atividade proliferativa, tumorigenicidade e capacidade de formação de esferóides nas células CD44⁺CD90⁺, o que segundo os autores, representaria duas populações distintas, quiescentes e ativadas, respectivamente. A análise em carcinomas hepatocelulares *ex vivo* demonstrou uma baixa quantidade de células CD44⁺CD90⁺ (0,2-2,1%).

Huang et al. (2015) estudaram o papel da COX-2 na iniciação dos tumores de mama em cães e relataram diferentes graus de imunexpressão da proteína CD44 em amostras histológicas de tumores malignos e correlação significativa com invasão linfática. Houve também diferença entre o percentual de células CD44⁺ nos esferoides de acordo com o grau de malignidade.

Vargas et al. (2015), estudaram mastocitomas em cães e não observaram diferenças significativas na imunexpressão de Oct4 entre os diferentes graus,

sugerindo não haver importância prognóstica.

Métodos de identificação, “enriquecimento” e principais marcadores de células iniciadoras tumorais

O “enriquecimento”, isolamento e/ou identificação de células iniciadoras tumorais não é simples. Atualmente, são utilizados diversos métodos no “enriquecimento” e identificação dessas populações, a saber: expressão de marcadores de superfície “específicos”, separação magnética ou por fluorescência (*MACS* e *FACS*), análise de células *SP*, mensuração da atividade enzimática da aldeído-desidrogenase (*ALDH*), imunocitoquímica, imuno-histoquímica, microfiltração, modelos de esferoides tumorais, ensaios clonogênicos, caracterização de quimio-resistência, tumorigenicidade em modelos animais e expressão de genes e fatores de transcrição por *RT-qPCR* (TIRINO et al., 2013; ISLAM et al., 2015). Apesar da multiplicidade de técnicas disponíveis, limitações intrínsecas e potenciais vieses, também são descritos (ISLAM et al., 2015). Ressalta-se ainda, que a comprovação do potencial iniciador tumoral deve atender aos critérios mínimos de autorenovação prolongada e capacidade de diferenciação (TANG et al., 2013).

A capacidade de autorenovação, avaliada por testes de xenotransplantação e/ou formação de esferoides não aderentes em cultivo celular, é considerada o padrão ouro na identificação de células iniciadoras tumorais (TANG et al., 2013; ISLAM et al., 2015).

A constatação do perfil iniciador, normalmente apresenta equívocos de interpretação em decorrência da generalização e extrapolação dos resultados. As células iniciadoras, apesar de unificadas por características intrínsecas, possuem também considerável variação fenotípica segundo seu nicho, o que confere certa heteroneidade (CLARKE et al., 2006; VISVADER; LINDEMAN, 2008).

Diversos antígenos de superfície foram identificados e são utilizados na identificação das CIT's por citometria de fluxo. Entretanto, a mera expressão de moléculas indicadoras não denota um fenótipo associado a células iniciadoras de tumor (CLARKE et al., 2006). A expressão das moléculas de superfície é influenciada por questões de natureza técnica, incluindo o uso de enzimas (por ex. colagenases,

hialuronidases) na preparação das suspensões e a perda da viabilidade celular (HILL, 2006). A quantidade de células iniciadoras pode ser sub ou superestimada, principalmente nos sistemas *in vitro* (VISVADER; LINDEMAN, 2008).

Outras limitações técnicas implicadas no uso exclusivo da citometria de fluxo na ausência de testes complementares também são descritas. A não exclusão de células tais como os leucócitos, fibroblastos, células necróticas e endoteliais da análise podem, em última instância, subestimar o potencial tumorigênico (SHACKLETON et al., 2009). Portanto, além da marcação de superfície é importante utilizar ensaios funcionais como a atividade da ALDH e células *SP* (TIRINO et al., 2013).

Dentre os marcadores utilizados na literatura podemos citar as proteínas CD44, CD34, CD90 (Thy-1), CD133 (prominina-1), ABCG5, CD24, EpCAM, CD105 (endogлина), CD117 (c-kit), ALDH, CD38, CD26, CD29, CD166, CD15, nestina, CD13, ABCG2, CD20, CD271, c-met, CXCR4/CD184, CD98, Trop-2, CK5, 063, BMI-1, OCT-4 e OCT3/4 (GREVE et al., 2012; ISLAM et al., 2015). Os quatro primeiros são comumente utilizados nos mais diversos estudos.

O antígeno CD44 é uma glicoproteína transmembrana de adesão, membro da família de proteínas de ligação a cartilagem, composta por sete domínios extracelulares, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. O tamanho dos domínios extracelulares varia de acordo com a inserção de produtos de quebra de éxons. A estrutura do polímero é responsável pela ligação ao colágeno, laminina, glicosaminoglicanos, fibronectina e ácido hialurônico e também a receptores celulares, incluindo a L-selectina e E-selectina (ZOLLER, 2015).

A proteína CD44 é dividida em isoformas padrão ou hematopoiética (CD44s) e variáveis (CD44v). As isoformas variáveis (v1 a v10, e combinações) são expressas em células hematopoiéticas e epiteliais durante a embriogênese, leucemias e carcinomas (WILLIAMS et al., 2013; ZOLLER, 2015). A isoforma variável CD44v6 foi comumente associada a tumores mamários e coloretais. Outras isoformas menos comuns também foram estudadas, incluindo a CD44E, expressa em células epiteliais, e as isoformas CD44R1 e R2, expressas em leucócitos mononucleares e granulócitos (BASAKRAN, 2015).

As isoformas variáveis apresentam uma série de funções, a saber: (1) organização das moléculas de ácido hialurônico sintetizadas (embora não existam evidências da produção de ácido hialurônico pelas células iniciadoras leucêmicas); (2)

concentração local de glicosaminoglicanos, metaloproteinases, citocinas e quimiocinas; (3) adesão das CIT's ao nicho de células-tronco; (4) migração endotelial; (5) quiescência mediada pela interação receptor-ligante; (6) resistência ao estresse gerado por baixa saturação de oxigênio; (7) regulação de genes de resistência às drogas; (8) potencial de invasão de células malignas; (9) ativação de vias de resistência a apoptose incluindo bloqueio da caspase-3 (WILLIAMS et al., 2013; ZOLLER, 2015).

A contribuição da proteína CD44 é em parte, traduzida por suas interações com o nicho extracelular (NEC). O nicho é definido como locais específicos compostos por células epiteliais, mesenquimais e moléculas da matriz extracelular, responsáveis pela regulação da adesão, retenção, nidação, mobilização, quiescência, ativação, diferenciação e divisão das células-tronco (ZOLLER, 2015). O ácido hialurônico é a principal molécula presente no nicho e o principal ligante da proteína CD44. Portanto, grande parte das funções do receptor estão ligadas às interações com seu ligante principal (WILLIAMS et al., 2013). A matriz extracelular do TVTC sofre alterações quantitativas e qualitativas durante as fases de progressão e regressão. Mukaratirwa et al. (2004), observaram aumento significativo no ácido hialurônico de membrana e citoplasma dos oncócitos durante a fase progressiva, sugerindo que a molécula participe no mascaramento dos antígenos e complexos de histocompatibilidade, além de exercer efeito protetor anti-apoptótico.

O CD44 foi descrito inicialmente nos tumores mamários e carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (TIRINO et al., 2013). Dada a sua consistente distribuição em outros tipos de câncer e as diferenças entre o potencial tumorigênico de células CD44⁺ e CD44⁻, a proteína foi considerada um marcador comum de CIT's (KEYSAR; JIMENO, 2010). Pesquisadores tem concentrado esforços na correlação entre as isoformas e tipos específicos de CIT's. Como exemplo, a isoforma CD44v6 foi associada a maior agressividade nos linfomas não Hodgkin humanos (BASAKRAN, 2015).

A fosfoglicoproteína transmembrana CD34 tem 115kDa de peso molecular e foi identificada em 1984 em células-tronco hematopoiéticas. A proteína apresenta um domínio extracelular glicosilado, uma hélice simples de membrana e uma extremidade citoplasmática. O ligante mais comumente descrito é a L-selectina (CD62L), presente na superfície dos linfócitos. A interação ligante-receptor induz a adesão endotelial e migração celular (SIDNEY et al., 2014). A proteína ainda participa ativamente no

aumento de proliferação e bloqueio de diferenciação celular, migração de células hematopoiéticas e morfogênese celular. É expressa quase que exclusivamente por células endoteliais e células-tronco hematopoiéticas. (NIELSEN et al., 2008).

A glicoproteína CD34 foi associada a identificação e “enriquecimento” de populações de células-tronco hematopoiéticas. Evidências recentes sugerem que células CD34⁺ detenham potencial de transdiferenciação; tais células seriam capazes de diferenciação em cardiomiócitos, epitélio respiratório e hepatócitos. As células progenitoras CD34⁺ foram identificadas na córnea, glândulas salivares, músculo estriado, intestinos e pele, locais nos quais recebem denominações específicas. As evidências apontam que a glicoproteína CD34 não deve ser considerada apenas um marcador de células hematopoiéticas progenitoras, mas um marcador de células potencialmente primitivas (SIDNEY et al., 2014). As células musculares satélites, ceratócitos corneais, fibrócitos e células estromais mesenquimais são consideradas células progenitoras tecido-específicas. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que, apesar de manter o estado funcional de célula progenitora, tais células subexpressaram a proteína CD34 ao comprometerem-se com estados de diferenciação mais avançados (SIDNEY et al., 2014).

A descoberta do antígeno CD34 como marcador de células iniciadoras tumorais, ocorreu durante experimentos com camundongos *SCID/SCID* e *NOD/SCID*, ainda na década de 90. A hipótese da existência de células iniciadoras nas leucemias levou em consideração as características fenotípicas e a organização hierárquica normal do sistema hematopoiético. De acordo com vários autores, as células primárias de pacientes portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) humana, transplantadas em camundongos foram capazes de iniciar e manter o crescimento do tumor. As células denominadas iniciadoras leucêmicas, com perfil CD34⁺CD38⁻, foram isoladas e purificadas de forma prospectiva, sendo capazes de iniciar leucemias em camundongos, independentemente da heterogeneidade celular do tumor primário (WANG; DICK; 2005). A utilização de outros marcadores em associação ao CD34 permitiu também a descoberta de populações fenotipicamente similares em tumores sólidos (JORDAN, 2004), como a fração de células-tronco hematopoiéticas CD34⁺ que apresentam coexpressão da proteína CD33⁺ com alto potencial de expansão *in vitro* e a habilidade de diferenciação em outros tipos celulares (CALLONI et al., 2013).

O Thy-1 ou CD90 é uma glicoproteína de membrana com peso molecular entre 25-37K descoberta há 40 anos, durante pesquisas com células leucêmicas de

camundongos. Inicialmente foi considerada um marcador de diferenciação predominantemente expresso nos timócitos e células cerebrais de camundongos (HAERYFAR; HOSKIN, 2004). Estudos recentes mostram que a proteína CD90 está distribuída na superfície de timócitos, linfócitos, fibroblastos, endotélio, células neuronais, células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, células foliculares ovarianas, e também no câncer (BARKER; HAGOOD, 2009). A proteína está inserida na membrana celular por moléculas de ancoragem de glicofosfatidilinositol (GPI), e não possui domínio transmembrana.

O 1º *Workshop* Internacional de Antígenos Leucocitários Caninos em 1994 determinou que o Thy-1 na espécie canina está expresso em todos os timócitos, linfócitos T nodais e periféricos, linfócitos B, monócitos, granulócitos, células neurais e renais e células-tronco mesenquimais (COBBOLD et al., 1994).

As funções da proteína Thy-1 podem ser divididas em imunológicas e não imunológicas. As funções imunológicas estão relacionadas principalmente a ativação de linfócitos T, interações com células apresentadoras de antígenos e maturação dos timócitos. A deficiência de Thy-1 induz defeitos na linhagem T, incluindo falhas na maturação e na resposta proliferativa. Dentre as funções não imunológicas, podemos citar a apoptose, adesão e migração celular, supressão tumoral, cicatrização, fibrose, proliferação e diferenciação neuronal (HAERYFAR; HOSKIN, 2004; REGE; HAGOOD, 2006).

O estímulo das células-tronco CD90⁺ por citocinas induz sua entrada no ciclo celular, enquanto que as CD90⁻, permanecem em estado de quiescência. Alguns estudos também sugerem que a expressão da proteína está associada à capacidade tumorigênica (REGE; HAGOOD, 2006; HONG et al., 2015). As células CD34⁺CD90⁺ oriundas da medula óssea, cordão umbilical e sangue periférico são capazes de gerar culturas de longo prazo e originar células diferenciadas provenientes de diversas linhagens. Também são capazes de gerar linhagens mieloeritroide e linfoides B com maior eficiência quando comparadas com células CD90⁻ (CALLONI et al., 2013). Além disso, alguns autores sugerem que somente células Thy-1⁺ entram nas fases S/G2/M mediante estimulação (CALLONI et al., 2013).

O CD133 ou prominina-1 (PROM-1 ou AC133) é um gene altamente conservado dentro do reino animal que codifica uma proteína de membrana composta por 865 aminoácidos, e que contém 5 domínios transmembrana e duas alças extracelulares glicosiladas na espécie humana. A prominina-1 está amplamente

distribuída, principalmente em células epiteliais adultas de tecidos glandulares. As células CD133⁺ são encontradas nos ductos biliares e pancreáticos, ductos e células secretoras salivares, glândulas lacrimais, sudoríparas, cervicais e endometriais uterinas, e também na base das fossetas e criptas gástricas, duodenais e colônicas. O CD133 é encontrado também em células epiteliais dos túbulos proximais e cápsula de Bowman (MIZRAK et al., 2008).

A descoberta do antígeno CD133 foi realizada durante a produção de anticorpo monoclonal específico para o epítipo AC133, presente em células-tronco hematopoiéticas CD34⁺ de medula óssea adulta e células hepáticas fetais. A coexpressão em células hematopoiéticas CD34⁺ permitiu que o antígeno CD133, fosse reconhecido como um marcador de células-tronco (MIZRAK et al., 2008).

Atualmente, a função da proteína CD133 não foi totalmente elucidada. Apesar de utilizada na identificação de células-tronco/progenitoras neurais, hepáticas, renais e prostáticas, a presença de subpopulações positivas nesses tecidos, não obrigatoriamente implica na presença de CIT's, pois a proteína também é expressa em células adultas diferenciadas (WU et al. 2009). É importante ressaltar que o epítipo dependente de glicosilação AC133 humano é parte do antígeno CD133 e não, sinônimo. A prominina-1 murina, reconhecida pelo anticorpo monoclonal 13A4 é considerada homóloga ao A133 humano (SHMELKOV et al., 2005). Ainda, a expressão do AC133 está restrita a células menos diferenciadas, acreditando-se inclusive, que a perda da proteína represente um estímulo para diferenciação (MIZRAK et al., 2008; BIDLINGMAIER et al., 2008).

No âmbito das células-tronco, células CD133⁺ normais são capazes de reconstituir tecidos diferenciados *in vivo* (p. ex. epitélio prostático) e regenerá-los (p. ex. na distrofia muscular do tipo Duchenne em murinos) (SHMELKOV et al., 2005).

A presença de prominina-1 tem sido associada à subpopulações de células iniciadoras tumorais em diversos tipos de câncer humanos, murinos e caninos, incluindo glioblastomas, meduloblastomas, tumores prostáticos, colônicos, ovarianos, laríngeos, pancreáticos, hepatocelulares, pulmonares e melanomas (MIZRAK et al., 2008; WU et al. 2009).

Dentre as características funcionais relacionadas à expressão de prominina-1 destacam-se o maior potencial tumorigênico *in vivo*, resistência a apoptose, capacidade de metástase, metabolismo celular, resistência à quimioterapia e radioterapia, expressão de genes e fatores associados a manutenção de um *status*

iniciador tumoral, formação de esferas tumorais, expressão de ALDH e capacidade de efluxo de corantes de DNA em ensaios de “side population”. A diferenciação multilinhagem, traduzida pela reconstituição de tumores heterogêneos pós-transplante, também é outra característica descrita (MIZRAK et al., 2008; BIDLINGMAIER et al., 2008; WU et al. 2009; ZHONG, 2013). A expressão ou supressão de prominina-1 é dependente de fatores extrínsecos e intrínsecos ao microambiente tecidual, incluindo condições de hipóxia, concentração de citocinas ($TGF-\beta$), perfil de microRNA e mecanismos de regulação epigênica (LI et al., 2013).

Mais recentemente, inúmeros estudos demonstraram a capacidade tumorigênica de células gliomatosas $CD133^-$, além de habilidade de reaquisição de fenótipo $CD133^+$ *in vivo* (CHEN et al. 2010). Em cães, resultados similares foram descritos em linhagens de melanoma $CD34^-$ (WILSON-ROBLES et al., 2013).

Tumor venéreo transmissível e células iniciadoras de tumor: indícios adicionais

Outros indícios não abordados por O’Neill, e referentes a perspectiva das CIT’s no tumor venéreo transmissível, merecem comentários.

A quimiorresistência é considerada característica intrínseca das CIT’s, traduzidas pela expressão de proteínas da família ABC dos transportadores ATP-dependentes. Os transportadores são classificados em sete subfamílias de A a G. O ABCB1, glicoproteína P ou MDR-1 (proteína de resistência múltipla às drogas 1) é comumente superexpresso em células-tronco tumorais, como evidenciado pela análise de populações *SP* de diversos tumores (GREVE et al., 2012). Gaspar (2005) demonstrou maior imunexpressão de glicoproteína P no subtipo plasmocitoide, nas metástases e nos grupos com resposta parcial a quimioterapia. Flórez (2014) demonstrou expressão gênica de MDR-1 variável em amostras de cultivo celular e *ex vivo* de TVTC. Ainda, Flórez (2014) destacou diferença significativa entre as células em cultivo tratadas e não tratadas com viscristina, sugerindo um efeito modulador da droga na expressão gênica.

A expressão global de genes e o estudo de vias de sinalização associados ao estado iniciador tumoral, comumente por técnicas de microarranjo gênico e qRT-PCR,

permitem a comparação entre o perfil molecular das células iniciadoras e não-iniciadoras tumorais. As vias atuam de diferentes formas tais como inibição da diferenciação e manutenção da capacidade de autorenovação. As vias Wnt/ β catenina/survivina, Sonic Hedgehog, BMI-1, TGF- β podem ser citadas como exemplos (AILLES; WEISSMAN, 2007).

Bassani-Silva (2008), estudando amostras *ex vivo* de TVTC, verificaram imunexpressão de survivina em >95% do oncócitos e baixos percentuais (0% a 6,5%) de células tumorais positivas para caspase 3 clivada. A survivina e a caspase 3 são proteínas que participam ativamente nos mecanismos antiapoptóticos da via Wnt/ β catenina estando superexpressas em células-tronco tumorais (ISLAM et al., 2015).

3. HIPÓTESES DO ESTUDO

O tumor venéreo transmissível canino apresenta sub-populações de células positivas para os marcadores CD44, CD133, CD90 e CD34.

Há diferenças significativas entre os grupos plasmocitoide e misto em relação ao imunofenótipo acima proposto.

Há diferenças significativas entre os grupos resistentes e não resistentes à quimioterapia.

4. OBJETIVOS

Traçar o perfil imunofenotípico, quantificando os níveis de expressão dos marcadores CD44, CD90, CD133 e CD34 por citometria de fluxo e imuno-histoquímica em amostras *ex vivo* do tumor venéreo transmissível de cães;

Verificar possíveis diferenças entre os grupos citológicos plasmocitóide e misto em relação ao imunofenótipo acima;

Verificar possíveis correlações entre o índice mitótico, escores imuno-histoquímicos (Ki-67, caspase-3 clivada, CD44 e CD34), e os níveis de expressão dos marcadores supra-citados;

Verificar possíveis diferenças entre tumores quimiorresistentes e não resistentes em relação aos marcadores supra-citados.

5. Periódico e artigo



Phenotypic profile of potential cancer stem cells in canine ex vivo transmissible venereal tumor

Journal:	<i>Veterinary Quarterly</i>
Manuscript ID:	TVEQ-2016-0020
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	28-Jan-2016
Complete List of Authors:	Grandi, Fabrizio; FMB UNESP Miot, Hélio; FMB, UNESP, Univ. Estadual Paulista Rocha, Rafael; Cancer Hospital, Massoco, Cristina; FMVZ, USP Hazarbassanov, Nicolle; FMVZ, USP Coqliati, Bruno; USP, Rocha, Noeme; Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Clínica Veterinária
Keywords:	canine, stem cells, TVT, flow cytometry, PCR, immunohistochemistry

SCHOLARONE™
Manuscripts

Fator de impacto, 2014: 0,719

Phenotypic profile of potential cancer stem cells in canine *ex vivo* transmissible
venereal tumor

Fabrizio Grandi¹, Hélio Amante Miot², Rafael Malagoli Rocha³, Cristina de Oliveira
Massoco Salles Gomes⁴, Nicolle Queiroz-Hazarbassanov⁴, Bruno Cogliati^{4*}, Noeme
Sousa Rocha^{1,5*}

¹Department of Pathology, Botucatu Medical School, Univ. Estadual Paulista,
UNESP, Botucatu, Brazil. fgrandivet@gmail.com

²Department of Dermatology and Radiotherapy, Botucatu Medical School, Univ.
Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Brazil. heliomiot@gmail.com

³Department of Investigative Pathology, AC Camargo Cancer Hospital, São Paulo,
Brazil. rafael.malagoli@gmail.com

⁴Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science,
University of Sao Paulo, SP, Brazil. bcogliati@usp.br; cmassoco@gmail.com;
nicolle.queiroz@gmail.com

⁵Laboratory of Investigative and Comparative Pathology, School of Veterinary
Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Brazil.
rochanoeme@fmvz.unesp.br

*These authors share equal seniorship.

Corresponding author: Fabrizio Grandi, Department of Pathology, Botucatu Medical
School, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil. ZIP Code:
18618-970. Telephone/fax: +55 14 3811 6293. e-mail: fgrandivet@gmail.com.

Abstract

Background: The canine venereal transmissible tumor (CTVT) is a widely distributed neoplasm in almost every continent. It is considered an transplantable allograft.

Several studies have been conducted to characterize its origin and biological behavior. However, no study have addressed a possible participation of cancer stem cells in CTVT.

Hypothesis/objectives: Describe the expression pattern of the cancer stem cell markers CD44, CD34, CD90 and CD133 on protein level in ex vivo samples of CTVT, and find their correlation with clinicopathological parameters.

Animals & Methods: Thirty-eight CTVT samples were selected by convenience. Inclusion criteria was a cytological diagnosis of CTVT, without previous chemotherapy until the last 6 months. The CSC marker expressions above cited were assessed in CTVT through flow cytometry and immunohistochemistry. Ki-67 index and apoptosis were also evaluated by HScore index and the sum of positive cells in five hotspot 400x fields, respectively. In addition, patients were divided in two groups, resistant and non-resistant to chemotherapy, and assessed for CD34, CD44, CD90 and CD133 markers.

Results: 38 tumors were classified as plasmacytoid subtype, and sixteen as mixed. Growth fractions had high values, whereas apoptosis displayed very low levels. Likewise, all tumors showed high levels of CD44, and very low levels of CD34. CD133 and CD90 expressions varied among tumors. No differences were found in cytological groups regarding the proportion of CSC markers. However, a marginal difference between resistant and non-resistant groups was detected by flow cytometry.

Conclusion: CD44, CD34, CD90 and CD133 expression levels in CTVT match those

from other type of canine tumors described in literature. Cytological subgrouping seems to have no differences regarding CSC subpopulations. Resistant and non-resistant tumors appear to have differences in terms of selected markers.

Keywords: dog, venereal transmissible tumor, stem cell, flow cytometry, immunohistochemistry, PCR, initiating.

1. Introduction

Canine transmissible venereal tumor (CTVT) is considered a transplantable tumor allograft. Continuous efforts have been made to determine origin, phenotype and factors associated with transmission and biological behavior (Murchinson et al. 2014).

It was proposed that CTVT might represent the cancer stem cell (CSC) process since possess long-term self-renewal capacity, potential for serial transplantation, expression of specific stem cell genes, and an undifferentiated phenotype which are all hallmarks of CSC (Clarke et al. 2006; O'Neill 2011; Liu et al. 2012).

The majority of these studies used *in vitro* systems to characterize and enrich for CSC subpopulations. However, such systems alter gene and protein expression, which can interfere with the interpretation of results concerning CSC proportions (Hill 2006). Therefore it may be preferable to study CSC subpopulations in fresh tumor biopsy samples (Guth et al. 2014).

Different methodologies have been used to identify CSC in human solid tumors (Tirino et al. 2013). The most common one is sorting cells by expression of surface markers CD44, CD133, CD90 and CD34 (Calloni et al. 2013). There are no

consensus regarding the best markers for CSC populations in dogs to date.

Moreover, there is no universal CSC marker, which requires the assembly of markers into panels (Greve et al. 2012).

The aims of the current study were to evaluate expression levels of CD44, CD133, CD34 and CD90 proteins in *ex vivo* canine TVT samples in order to search for initial evidences for CSC populations.

2. Materials and methods

2.1. Tissue samples

Thirty-eight CTVT convenience samples were prospectively selected from Anclivepa Veterinary Hospital, São Paulo, Brazil, between January 2014 and January 2015. Patients were chosen by the following criteria: cytological diagnosis of TVT regardless location, mass size, age, breed or sex, and no previous chemotherapy over the last 6 months. At least three tumor fragments measuring 1 x 1 x 1 cm each were obtained previously to chemotherapy (see below). Areas of ulceration, hemorrhage or inflammation were avoided.

Immediately after sample collection, doses of vincristine sulphate were weekly administered, in a proportion of 0.7mg/m² of body surface area (IV). Clinical remission was assessed by clinical and/or cytological evaluation, depending on the presence of a visible mass. Patients exhibiting a poor/no remission had a change in the chemotherapeutic protocol. Some patients underwent a surgical excision as adjuvant therapy.

In addition, patients were divided in two groups: resistant and non-resistant to chemotherapy. For all practical purposes, resistance was defined as at least one

change in the chemotherapeutic drug regardless treatment time, drug type or adjuvant surgery.

Data regarding treatment protocols and clinical follow-up were obtained from hospital electronic database.

2.2. Cytopathological analysis

Cytological samples for morphological assessment were acquired by the imprinting of biopsy cut surfaces onto histological slides. Air-dried smears were colored by the fast hematological staining kit (Laborclin®). Smears were scanned at 200X magnification in order to find the most representative fields. Samples were classified in plasmacytoid, lymphocytoid, or mixed types (Flórez et al. 2012). Cytological subtypes were classified according to the percentage of each cell type regarding total number of neoplastic cells. Plasmacytoid tumors had >59% plasmacytoid cells, lymphocytoid tumors >59% lymphocytoid cells, and mixed tumors <59% of each cell type. All photomicrographs were obtained with the software AxioVs40 version 4.8.2.0 in an Axio Lab. A1 microscope (Carl Zeiss®), and analyzed in a digital image-processing program Image J® (freeware).

2.3. Flow cytometry

The antibodies used are shown in Table 2.

Flow cytometry was carried out using cells harvested by scraping the surface of incisional biopsy samples with a surgical blade, and then transferring cells to microtubes containing 4% paraformaldehyde for 30 minutes, at 4 °C. After, samples were submitted to centrifugation at 1.200 RPM for 10 minutes, washed three times in phosphate buffer saline (PBS) solution, and stored in PBS, at 4° C, until analysis.

Specimens were adjusted to a density of 1×10^5 cells/mL, and incubated with Fc block (BD Bioscience, San Jose, California, USA) for 30 minutes, at 4° C. Then, samples were washed three times with PBS, and incubated for 30 minutes, at 4° C, with previously titrated primary antibodies and isotype-matched immunoglobulins as negative controls (Table 1). Next, samples were washed three times with PBS, and analyzed in a FACScalibur® flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, California, USA). At least 25.000 events were acquired for analysis. A pool of non-stained CTVT cells were used to normalize data. All experiments were conducted independently and in duplicate. Thus, data were represented as an average value of both experiments. All antibodies had cross reactivity with canine tissues as provided in specification sheet. Anti-CD45 antibody was added to remove contamination by differentiated hematopoietic cells and leukocytes. Post-acquisition analysis was performed using FlowJo® (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). CD45- cells were analyzed for CD44, CD133, CD90 and CD34 fluorescence. Values were displayed as a percentage of positive cells. Positive controls included normal canine hematopoietic cells.

2.4. Immunohistochemistry

The antibodies used are shown in Table 2.

Tumor fragments were placed into 10% formaldehyde for 24-48 hours prior to paraffin embedding. Four-micrometer-thick sections were cut from formalin-fixed paraffin-embedded samples and mounted on positively charged slides (Amitel®, São Paulo, SP, Brazil). The tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanol and water. Next, the sections were immersed in epitope retrieval solution (citrate buffer pH 6.0) for 30 seconds, at 125 °C, and then for 30 seconds, at

90 °C, in a pressure chamber (Pascal[®], Dako Cytomation, Denmark). After, they were cooled to room temperature for 20 minutes, and placed in a water bath for 5 minutes. Later, the sections were immersed in 10% peroxide hydrogen for 30 min in a dark chamber at room temperature in order to inhibit endogenous peroxidase activity. Next, slides were incubated with primary antibodies CD44, CD34, Ki-67 and cleaved caspase-3 (Table 2) overnight, at 4°C, in a humidified chamber. Signals were detected using a polymer link detection system Superpicture[®] (Life Technologies), accordingly to manufacturer's recommendations. CD34 labeling was spotted by incubating slides with polyclonal rabbit anti-goat biotinilated immunoglobulins (Dako[®]) in a 1:400 dilution for 30 min; after, slides were incubated with HRP/streptavidin complex (red vial, Novolink[®], Novacastra Laboratories, Newcastle, England). Immunohistochemical reactions were visualized by incubating the samples with 3,3' diaminobenzidine (DAB) chromogen for 3 minutes. All sections were counterstained with Harris hematoxylin for 2 minutes, placed in a water bath for 5 minutes, and mounted with permanent mounting media (Permount Fischer[®], Fisher Scientific, USA). Negative controls were performed by substituting the primary antibody with another diluent (Novacastra[®], Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). All immunohistochemistry procedures were performed manually.

2.4.1. Quantitative analysis of CD44, CD34, Ki-67 and cleaved-3 caspase

CD44 and CD34 scores were calculated multiplying the percentage of positive cells (score 0 to +4), and staining intensity in five hotspot 400x fields. Score of positive cells was assigned as 0 (no positive cells), 1+ (<10% positive cells), 2+ (10-50% positive cells), 3+ (51-80% positive cells) or 4+ (>80% positive cells). Membrane staining intensity was assigned as 1+ (mild), 2+ (moderate) or 3+ (marked). Based on

this, score was assigned between 0-12 (Huang et al. 2015). Epithelial cells from mucous membrane/epidermis or endothelial cells served as internal controls for CD44 and CD34, respectively.

Cleaved caspase-3 staining was identified through a granular and homogeneous cytoplasmic brown staining. Positive tumor cells were counted in five 400x hotspot fields. The results were expressed as the total number of cells.

H-Score index was used for Ki-67 quantification since majority of tumor cells displayed positive nuclei. The score was obtained by multiplying the total number of strongly positive nuclei by 3, moderately positive nuclei by 2, and weakly positive nuclei by 1. Final values resulted from dividing resulting figures by the total number of positive and negative stained nuclei in the field, and after, multiplied by 100. H-Score index ranged between 0-300 (Ishibashi et al. 2003).

2.6. Statistical analysis

All data were assessed for normality by Shapiro-Wilk test. All variables were expressed as median and interquartile range. Statistical differences between cytological groups were determined using Student's t-test or Mann-Whitney *U*-test. The correlations between variables were assessed by non-parametric Spearman's Rho (r_s) coefficient. *P* values ≤ 0.05 were considered significant. The statistical analysis was performed using SPSS 23 (IBM®, USA).

3. Results

3.1. Clinical outcome

Clinical data from 38 analyzed dogs as age, sex, breed, tumor location, clinical outcome and days to CCR are listed in Table 3. Age ranged between 1 to 12 years. Females (57.8%) and mixed breeds (n=76.3%) were predominant. Genital tumors appeared in 86.8 % (33/38) dogs. Only one case showed concomitant genital and extra-genital tumors.

Sixteen patients had a complete follow-up as described below. They were also split in resistant (n=3) and non-resistant (n=13) groups for comparison. The remaining twenty-two patients missed the checking-up process.

Twelve patients (12/16) were treated only with vincristine sulphate until CCR. The rest (4/16) undertook a change in the chemotherapy drug and/or surgical excision. Specimens 1, 15, and 17, experienced changes in the chemotherapeutic protocol.

Patients 1 and 17 underwent also surgical excision of tumor mass as an adjuvant treatment. Patient number 19 had a surgical excision of tumor mass only, without alteration in the chemotherapy drug.

There were no significant differences in survival time regarding expression of CD44, CD34, CD133 and CD90 on flow cytometry or immune-histochemistry (data not show).

3.2. Cytology

Cytological analysis of 38 CTVT showed 22 (57.9%) plasmacytoid, and 16 (42.1%) mixed types. In addition to tumor cells, a variable number of inflammatory cells comprising small lymphocytes, neutrophils and macrophages showed up. No eosinophils, mast cells and endothelial cells were observed.

3.3. Flow cytometry

Detected expression levels of the stem cell markers CD44, CD90, CD133 and CD34 are in Table 4. There were no significant differences between cytological groups and CSC markers. On the contrary, there were a statistical tendency for significant differences between tumors resistant and non-resistant to chemotherapy regarding the percentage of CD34+ ($p=0.069$) and CD133+ ($p=0.069$) cells in flow cytometry. There was a strong correlation between CD90 and CD133 ($Rho=0.72$, $p<0.001$). Representative cytograms are summarized in Figure 1, 2 and 3.

3.4. Immunohistochemical scores

The Ki-67 staining was ubiquitous among tumor cells, but staining intensity varies between nuclei. Thus, H-Score system served appropriately to represent these differences since almost all nuclei were positive for Ki67. The Ki-67 scores range from 79.35 to 239.45 (median 134.94; $Q1=95.84$; $Q3=182.12$). Caspase-3-cleaved counts oscillated from 1 to 14 (Median=6; $Q1=5$; $Q3=8$).

CD34 expression were negative in all neoplasms and stromal cells, except in endothelial cells which displayed a strong, diffuse and granular membranous reaction (Figure 4). CD44 staining displayed on tumor cell membrane of all samples with no cytoplasmatic or nuclear dyeing. The reaction was mainly confined to the peripheral cells of the tumor bulk. The more central tumor cells were always negative, or with very low levels of expression (Figure 5). Minimum and maximum CD44 scores were 1 and 12, respectively (median=3; $Q1=2$; $Q3=6$).

There were no correlations between Ki-67, cleaved-3 caspase and CSC markers expression in flow cytometry, RTq-PCR or immunohistochemistry.

4. Discussion

To date, cancer stem cells were described in canine mammary carcinomas (Cocola et al. 2011; Ferletta et al. 2011; Michishita et al. 2011; Pang et al. 2011; Michishita et al. 2012; Magalhães et al. 2013; Figueroa et al. 2015; Huang et al. 2015); prostate tumors (Moulay et al. 2013); lymphomas (Ito et al. 2011); liver carcinomas (Cogliati et al. 2010; Fujimoto et al. 2013; Michishita et al. 2014); osteosarcomas (Guth et al. 2014; Pang et al. 2014a; Pang et al. 2014b); melanomas (Wilson-Robles et al., 2013; Guth et al. 2014); hemangiosarcomas (Gorden et al. 2014); glioblastomas (Stoica et al. 2011), and leukemias (Blacking et al. 2011b).

This study can be considered the first to focus on CTVT regarding currently used CSC markers. For this, the expression of the commonly used CSC markers CD44, CD133, CD90 and CD34 was assessed for such neoplasm (Blacking et al. 2011b; Tirino et al. 2013). *Ex vivo* samples were the choice since dissociation of cancer cells from tumor bulk and exposure to an *in vitro* condition can modify gene and surface marker expression, influencing data comparisons and conclusions (Hill 2006). Indeed, different levels of CD44⁺, CD133⁺, CD90⁺ and CD34⁺ cells were identified in canine melanomas and osteosarcomas (OSA) cell lines and biopsy samples (Guth et al. 2014).

Expression levels of CD34, CD90 and CD44 in canine TVT in flow cytometry and immunohistochemistry were similar to other related studies of melanomas, osteosarcomas, acute lymphoblastic leukemia and B-cell lymphomas in canine (Ito et al. 2011; Blacking et al. 2011b; Guth et al. 2014).

CD34 has been classically used for identification and enrichment of hematopoietic stem cell. However, recent evidences suggest that this protein may be taken for a marker to undifferentiated cells, regardless its origin (Sidney et al. 2014).

In the present research, CD34 levels, both in flow cytometry and relative gene expression, were similar to those observed by other authors in several tumors (Blacking et al. 2011b; Ito et al. 2011; Guth et al. 2014).

A cancer stem cell phenotype is attributed to CD34⁺ mesenchymal stromal cells (MSC) present in tumors (Sidney et al. 2014). Although few efforts towards MSC identification and extracellular matrix characterization have been developed in canine TVT (Mukaratirwa et al. 2004), data regarding CD34 is currently inexistent. Neither tumor nor stromal cells displayed CD34 staining during the investigation. It could be linked to the presence of very low levels of CD34⁺ CSC in human and canine tumors, usually 0.1-1%, which might be beyond detection level by immunohistochemistry (Ailles & Weissman 2007; Blacking et al. 2011b; Ito et al. 2011; Guth et al. 2014). Taking all these assumptions in account, CD34 positivity may indicate a more undifferentiated phenotype for specific subpopulations or subgroups of canine TVT cells.

CD90 serves to enhance CSC populations in human liver, brain, breast and hematopoietic malignancies (Islam 2015). However, few studies referred to the potential role of CD90 as a CSC marker in canine tissues. Low percentages of CD90⁺ cells in canine melanomas, osteosarcomas and hepatocellular carcinomas were reported (Guth et al. 2014; Michishita et al. 2014). Similarly, very low expression levels of CD90 cells in the majority of canine TVT tested in this research.

CD44 plays a critical role in stemness regulation of CSC, self-renewal, adhesion and apoptosis resistance (Yan et al. 2015). Canine TVT's expressed high levels, commonly greater than 90% of positive cells. However, Guth et al. 2014 verified lower average scores in fresh melanoma and osteosarcoma samples, which can be attributed to tumor heterogeneity.

CD44 immunolabeled cells were observed in canine mammary (Magalhães et al. 2014; Figheroa et al. 2015) and hepatocellular carcinomas (Cogliati et al. 2010), which could imply their derivation from progenitor cells. Likewise, TVT positive cells were ubiquitously observed in all samples.

Other functions of CD44 are related to cell-cell and cell-matrix interactions through hyaluronan receptor (Chanmee et al. 2015; Zoller 2015). The immunoexpression of CD44 by the tumor bulk and immunoexpression of hyaluronan in canine TVT (Mukaratirwa et al. 2004) infers an additional role in adhesion between tumor cells, matrix and perhaps transplantation site.

CD44 expression is a cell cycle dependent associated with a high proliferative potential in canine tumors (Blacking et al. 2011a). Despite this assumption, no correlations could be made between percentage of CD44⁺ cells and H-Score (Ki-67) in canine TVT. These discrepancies might be related to the use of different methodologies in both studies.

Canine TVT cells appeared to have higher CD133 expression levels in flow cytometry than other reported tumors (Stoica et al. 2009; Cogliati et al. 2010; Blacking et al. 2011b; Cocola et al. 2011; Ferletta et al. 2011; Ito et al. 2011; Michishita et al. 2011; Fujimoto et al. 2013; Moulay et al. 2013; Gorden et al. 2014; Guth et al. 2014). Such discrepancies between primary culture, or cell lines, and fresh samples may occur due to both an in vitro selective pressure toward more adapted CSC subpopulations (Guth et al. 2014), or a tumor heterogeneity, as seen in human glioblastomas (Chen et al. 2010). Finally, cell glycosylation state can interfere with CD133 expression and detection by specific antibodies (Mizrak et al. 2008) which could contributed to results observed in flow cytometry.

CD133 and CD90 expression is restricted to a subset of CD34⁺ cells which have a high differentiation potential or can be found among specific hematopoietic stem cell subsets (Mizrak et al. 2008; Calloni et al. 2013). In our study, there was a strong correlations between CD133 and CD90, possibly reflecting their intrinsic relationship reported by others. Additional studies including co-expression analysis of these specific subpopulations might shed light on this issue.

Drug resistance to current cancer therapies is related to CD133 and CD34 overexpression by CSC (Han L et al. 2013). For this research, although a significant difference between CSC marker and resistance status was unproven, the achieved statistical tendency is noteworthy. Using a small sample size of resistant tumors (n=3) might lead us to a type II error. Nevertheless, larger studies are needed to confirm this hypothesis.

Cytological subgrouping looks to be irrelevant to detect different expression levels among samples, despite the common association of plasmacytoid with the worse prognosis (Flórez et al. 2012). Nonetheless, this investigation disregarded lymphocytoid subtype. Being the earliest stage of tumor development, it could eventually reveal substantial differences (personal observation).

Additional studies regarding side population analysis and ALDH activity should be employed toward characterization of a potential CSC phenotype in CTVT. Furthermore, tumor sphere formation, clonogenic assays, *in vivo* tumorigenicity, multipotency evaluation, and stemness gene expression would help to delineate a hierarchic tumor model for canine TVT. Finally, comparison between fresh samples and cell lines from the same tumor may be rewarding.

Conclusions

Canine transmissible tumors demonstrates high levels of CD44 and very low levels of CD34 at protein and mRNA expression levels. Expression of CD133 and CD90 varied among tumors. Resistant and non-resistant tumors appears to have different proportions of CD133⁺ and CD34⁺ cells. Cytological subgrouping appears to have no importance to detect different proportions of CSC subpopulations.

Acknowledgments

The authors would like to thanks to Prof. Dr. José Fernando Ibanez (Department of Veterinary Medicine, Federal University of Parana, UFPR, Curitiba, Brazil) and the *Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais de São Paulo*, SP, Brazil (ANCLIVEPA-SP) for providing access to patients, samples and data for study.

Source of funding

This article is self-funding.

Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

References

1. Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. 2007. *Curr Opin Biotechnol.* 18(5):460–6.
2. Blacking TM, Waterfall M, Argyle DJ. 2011a CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 141 (1-2):46–57.
3. Blacking TM, Waterfall M, Samuel K, Argyle DJ. 2011b. Flow cytometric techniques for detection of candidate cancer stem cell subpopulations in canine tumour models. *Vet Comp Oncol.* 10(4):252–73.
4. Calloni R, Cordero EAA, Henriques JAP, Bonatto D. 2013. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem Cells Dev.* 22(9):1455–76.
5. Chanmee T, Ontong P, Kimata K, Itano N. 2015. Key roles of hyaluron and its cd44 receptor in the stemness and survival of cancer stem cells. *Front Oncol.* 5:180.
6. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS et al. 2010. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell;* 17 (4): 362-75.
7. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. 2006. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 66(19): 9339–44.
8. Cobbold S, Metcalfe S. 1994. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens.* 43(3):137-54.

9. Cocola C, Anastasi P, Astigiano S, Piscitelli E, Pelucchi P, Vilaro L, Bertoli G, Beccaglia M, Veronesi MC, Sanzone S, Barbieri O, Reinbold RA, Luvoni GC, Zucchi I. 2009. Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential. *Reprod Domest Anim.* 44 Suppl 2:214–7.
10. Cogliati B, Aloia TP a, Bosch R V., Alves V a F, Hernandez-Blazquez FJ, Dagli MLZ. 2010. Identification of hepatic stem/progenitor cells in canine hepatocellular and cholangiocellular carcinoma. *Vet Comp Oncol.* 8 (2):112–21.
11. Ferletta M, Grawe J, Hellmen E. 2011. Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature. *Int J Dev Biol.* 55 (7-9): 791–9.
12. Figueroa FC, Zanetti JS, Ribeiro-Silva A, Fonseca-Alves CE, Rocha NS. 2015. Association of CD44+/CD24- cells to more aggressive molecular phenotypes in canine mammary carcinomas. *Int J of Cancer Res.* 11 (3): 119-127.
13. Flórez LMM, Pedraza F, Grandi F, Rocha NS. 2012. Cytological subtypes of canine venereal transmissible tumor. *Vet Clin Pathol.* 41 (1):3-5.
14. Fujimoto A, Neo S, Ishizuka C, Kato T, Segawa K, Kawarai S, Ohihara K, Hisasue M, Tsuchiya R. 2013. Identification of cell surface antigen expression in canine hepatocellular carcinoma cell lines. *J Vet Med Sci.* 75(6): 831-35.
15. Gorden BH, Kim JH, Sarver AL, Frantz AM, Breen M, Lindblad-Toh K, O'Brien TD, Sharkey LC, Modiano JF, Dickerson EB. 2014. Identification of three molecular and functional subtypes in canine hemangiosarcoma through gene expression profiling and progenitor cell characterization. *Am J Pathol.* 184(4):985–95.

16. Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Götte M. 2012. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytom Part A*. 81 A (4):284–93.
17. Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Götte M. 2012. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytom Part A*. 81 A (4):284–93.
18. Guth AM, Deogracias M, Dow SW. 2014. Comparison of cancer stem cell antigen expression by tumor cell lines and by tumor biopsies from dogs with melanoma and osteosarcoma. *Vet Immunol Immunopathol*. 161 (3-4): 132–40.
19. Guth AM, Deogracias M, Dow SW. 2014. Comparison of cancer stem cell antigen expression by tumor cell lines and by tumor biopsies from dogs with melanoma and osteosarcoma. *Vet Immunol Immunopathol*. 161 (3-4): 132–40.
20. Han L, Shi S, Gong T, Zhang Z, Sun X. 2013. Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 3 (2):65–75.
21. Hill RP. 2006. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res*. 66 (4): 1891–5.
22. Huang J, Zhang D, Xie F, Lin D. 2015. The potential role of cox-2 in cancer stem cell-mediated canine mammary tumor initiation: an immunohistochemical study. *J Vet Sci*. 16(2): 225-31.
23. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H. 2003. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(5):2309–17.
24. Islam F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK-Y. 2015. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in Cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res*. 335 (1):135–47.

25. Ito D, Endicott MM, Jubala CM, Helm KM, Burnett RC, Husbands BD, Borgatti A, Henson MS, Bruggess KE, Bell JS et al. 2011. A tumor-related lymphoid progenitor populations supports hierarchical tumor organization in canine B-cell lymphoma. *J Vet Intern Med.* 2011; 25:890-96
26. Jordan CT. 2004. Cancer stem cell biology: From leukemia to solid tumors. *Curr Opin Cell Biol.* 16 (6): 708–12.
27. Liu W-H, You N, Zhang N, Yan H-T, Wang T, Huang Z, Liu HB, Tang LJ. 2012. Interpretation of interlocking key issues of cancer stem cells in malignant solid tumors. *Cell Oncol.* 35 (6): 397–409.
28. Magalhães GM, Terra EM, Vasconcelos RO, Bandarra MB, Moreira PRR, Rosolem MC, Alessi AC. 2013. Immundetection of cells with a CD44+/CD24- phenotype in canine mammary neoplasms. *BMC Vet Res.* 9: 205.
29. Michishita M, Akiyoshi R, Suemizu H, Nakagawa T, Sasaki N, Takemitsu H, Arai T, Takahashi K. 2012. Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines. *Vet J.* 193 (2): 508–13.
30. Michishita M, Akiyoshi R, Yoshimura H, Katsumoto T, Ichikawa H, Ohkusu-Tsukada K, Nakagawa T, Sasaki N, Takahashi K. 2011. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res Vet Sci.* 91 (2): 254–60.
31. Michishita M, Ezaki S, Ogihara K, Naya Y, Azakami D, Nakagawa T, Sasaki N, Arai T, Shida T, Takahashi K. 2014. Identification of tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line. *Res Vet Sci.* 96 (2): 315–22.
32. Mizrak D, Brittan M, Alison M. 2008. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 214 :3–9.

33. Moulay M, Liu WEN, Willenbrock S, Sterenczak KA, Carlson R, Ngezahayo A, Murua Escobar H, Nolte I. 2013. Evaluation of Stem Cell Marker Gene Expression in Canine Prostate Carcinoma- and Prostate Cyst-derived Cell Lines. *Anticancer Res.* 33 (12): 5421–31.
34. Mukaratirwa S, Chimonyo M, Obwolo M, Gruys E, Nederbragt H. 2004. Stromal cells and extracellular matrix components in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Histol Histopathol.* 19 (4): 1117–23.
35. Murchison EP, Wedge DC, Alexandrov LB, Fu B, Martincorena I, Ning Z, Tubio JM, Werner EI, Allen J, De Nardi AB, Donelan EM, Marino G, Fassati A, Campbell PJ, Yang F, Burt A, Weiss RA, Stratton MR. 2014. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Science.* 343 (6169): 437–40.
36. O'Neill ID. 2011. Concise review: transmissible animal tumors as models of the cancer stem-cell process. *Stem Cells.* 29 (12): 1909–14.
37. Pang LY, Argyle SA, Kamida A, Morrison KO, Argyle DJ. 2014a. The long-acting COX-2 inhibitor mavacoxib (Trocoxil™) has anti-proliferative and pro-apoptotic effects on canine cancer cell lines and cancer stem cells in vitro. *BMC Vet Res.* 10 (1): 184.
38. Pang LY, Cervantes-Arias A, Else RW, Argyle DJ. 2011. Canine Mammary Cancer Stem Cells are Radio- and Chemo- Resistant and Exhibit an Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype. *Cancers.* 3 (2): 1744–62.
39. Pang LY, Gatenby EL, Kamida A, Whitelaw B a., Hupp TR, Argyle DJ. 2014b. Global gene expression analysis of canine osteosarcoma stem cells reveals a novel role for COX-2 in tumour initiation. *PLoS One.* 9 (1): 1–13.

40. Sidney LE LE, Branch MJM, Dunphy SSE, Dua HS, Hopkinson A. 2014 Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 32: 1380–9.
41. Stoica G, Lungu G, Martini-Stoica H, Waghela S, Levine J, Smith R. 2009. Identification of cancer stem cells in dog glioblastoma. *Vet Pathol*. 46(3):391–406.
42. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, Laino L, De Francesco F, Papaccio G. 2013. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 27 (1): 13–24.
43. Williams K, Motiani K, Giridhar PV, Kasper S. 2013. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp Biol Med*. 238: 324–38.
44. Wilson-Robles HM, Daly M, Pfent C, Sheppard S. 2015. Identification and evaluation of putative tumour-initiating cells in canine malignant melanoma cell lines. *Vet Comp Oncol*. 60–9.
45. Wu Y, Wu PY. 2009. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev*. 18 (8): 1127–34.
46. Yan Y, Zuo X, Wei D. 2015. Emerging role of CD44 in cancer stem cells: a promising biomarker and therapeutic targeting. *Stem Cells Transl Med*. 4 (9):1033-43.
47. Zoller M. 2015. CD44, Hyaluronan, the Hematopoietic Stem Cell, and Leukemia-Initiating Cells. *Front Immunol*. 6: 235.

Figure legends

Fig. 1. Representative cytograms. A) Representative image of TVT tumor cells gating in the forward and side scatter cytogram; B) Gating of CD45⁻ cells in the respective fluorescence channel histogram; C) Gating of all CD44⁺ cells in the respective fluorescence channel histogram.

Fig. 2. Representative cytograms. A) Representative image of TVT tumor cells gating in the forward and side scatter cytogram; B) Gating of CD45⁻ cells in the respective fluorescence channel histogram; C) blue line – PE isotype control; red line – APC isotype control.

Fig. 3. Representative cytograms. A) Representative image of TVT tumor cells gating in the forward and side scatter cytogram; B) Gating of CD45⁻ cells in the respective fluorescence channel histogram; C) red line – unstained control.

Fig. 4. Canine venereal transmissible tumor. Neoplastic cells displayed no CD34 staining. DAB chromogen, Harris hematoxylin counterstain, 400X.

Fig. 5. Canine venereal transmissible tumor. Neoplastic cells displayed CD44 membranous staining. Only the outermost layer was labeled. DAB chromogen, Harris hematoxylin counterstain, 200X.

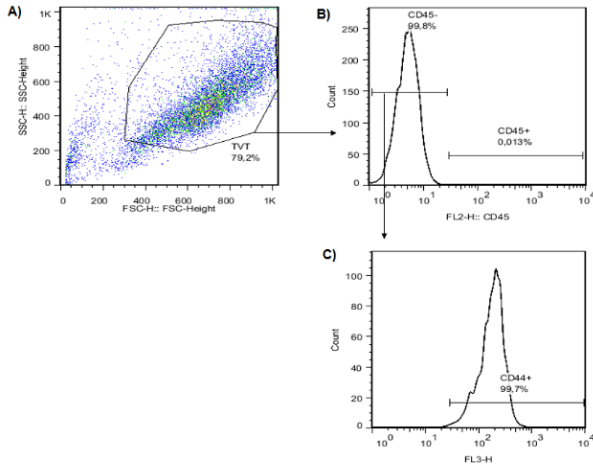


Figure 1.

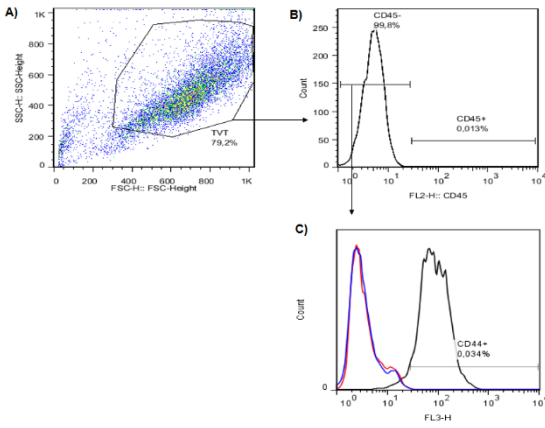


Figure 2.

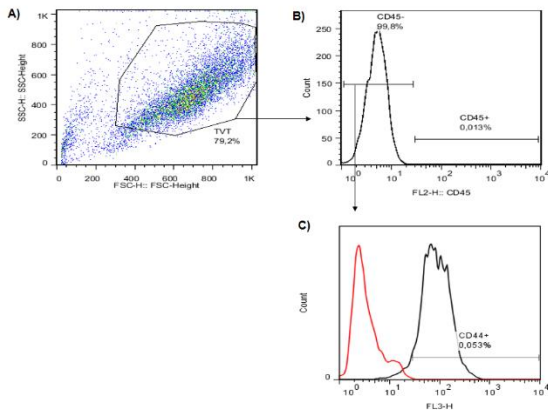


Figure 3.

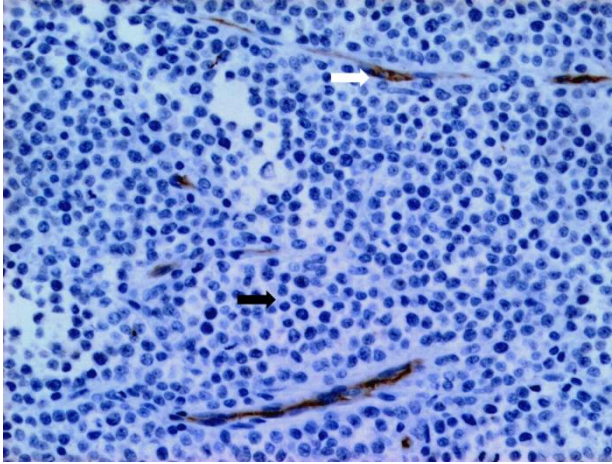


Figure 4.

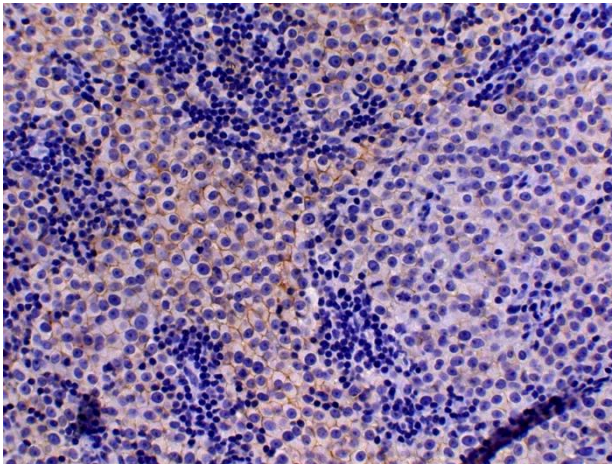


Figure 5.

Table 1. Antibodies, sources, and antigen specificities used for flow cytometry.

Antibody	Clone	Source and isotype	Antigen Specificity	Manufacturer	Fluorochrome
CD44	IM7	Rat IgG _{2b, k}	Canine CD44	BD Biosciences	PerCP-Cy5.5
CD133	13A4	Rat IgG _{1k}	Canine CD133	eBioscience	PerCP-eFluor 710
CD45	YKIX716.13	Rat IgG _{2b}	Canine CD45	Serotec	PE
CD90	YKIX337.217	Rat IgG _{2bk}	Canine CD90	eBioscience	APC
CD34	1H6	Mouse IgG ₁	Canine CD34	Santa Cruz	FITC

FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; APC, allophycocyanin; PerCP-CY5.5, Peridinin chlorophyll.

Table 2. Antibodies, sources, and antigen specificities used for immunohistochemistry.

Antibody	Clone	Source and isotype	Antigen Specificity	Manufacturer	Dilution
CD44	IM7	Rat IgG _{2b, k}	Canine CD44	BD Biosciences	1:50
CD34	C18	Goat IgG	Canine CD34	Santa Cruz	1:2000
Cleaved caspase-3	Asp175	Rabbit IgG	Canine	Cell Signaling	1:100
Ki-67	MIB-1	Mouse IgG _{1k}	Canine	Dako	1:100

Table 3. Clinical and follow-up information of 38 dogs with venereal transmissible tumor.

Case number	Sex	Age (in years)	Breed	Location	Outcome (in days)	Resistant
1	F	3	Mixed	Skin	CR (345)*	Yes
2	M	3	Mixed	Genital	L/F	No
3	F	8	Weimaraner	Genital	L/F	No
4	F	8	Mixed	Genital	L/F	No
5	M	4	Mixed	Genital	L/F	No
6	M	7	Mixed	Genital	L/F	No
7	F	3	Mixed	Genital	CR (49)	No
8	F	8	Mixed	Genital	CR (35)	No
9	F	10	Pitbull	Genital	L/F	No
10	M	9	Mixed	Genital	L/F	No
11	M	3	Mixed	Skin	L/F	No
12	M	5	Mixed	Genital	L/F	No

13	F	7	Mixed	Genital	L/F	No
14	M	4	Mixed	Genital	CR (69)	No
15	F	4	Pitbull	Genital	CR (116)	Yes
16	F	6	Mixed	Genital	CR-(34)	No
17	F	1	Mixed	Genital	CR (247)	Yes
18	M	4	Mixed	Genital	L/F	No
19	M	8	Mixed	Genital and skin*	CR (63)	No
20	F	8	Mixed	Eyelid conjunctiva	L/F	No
21	M	6	Mixed	Genital	L/F	No
22	F	4	Mixed	Genital	L/F	No
23	M	3	Mixed	Genital	L/F	No
24	F	2	Mixed	Genital	CR (35)	No
25	F	2	Mixed	Genital	CR (39)	No
26	F	12	Mixed	Genital	CR (79)	No
27	M	8	Pincher	Oral and nasal	CR (37)	No
28	M	10	Pastor Belga	Genital	L/F	No
29	F	5	Pitbull	Genital	CR (99)	No
30	F	7	Daschund	Genital	CR (80)	No
31	F	3	Mixed	Genital	L/F	No
32	F	6	Mixed	Genital	L/F	No
33	M	8	Mixed	Genital	CR (36)	No
34	F	4	Mixed	Genital	CR (49)	No
35	F	2	Mixed	Genital	L/F	No
36	M	6	Poodle Stardand	Genital	L/F	No
37	F	8	Pitbull	Genital	L/F	No
38	M	2	Mixed	Genital	L/F	No

CR, clinical remission; L/F, lost to follow up.

* only skin samples were collected.

Table 4. Expression levels of CD44, CD90, CD133 and CD34 on flow cytometry and RTq-PCR of 38 canine venereal transmissible tumors. The values were represented as median and interquartile range (Q1-Q3). Flow cytometry results were expressed as percentage of positive cells; RTq-PCR as expressed as relative mRNA expression.

Marker	Flow cytometry	RTq-PCR
CD44	98.95 (91.92-99.65)	216.35 (140.1-396.37)
CD34	0,026 (0.0006-0.077)	0.31 (0.20-0.66)
CD133	30.15 (11-61,17)	0.41 (0.15-1.23)
CD90	1.78 (0.17-4.25)	21.49 (16.28-26.78)

REFERÊNCIAS

1. Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol.* 2007; 18(5):460–6.
2. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene.* 2004; 23 (43):7274–82.
3. Amaral AS, Bassani-Silva S, Ferreira I, Fonseca LS, Andrade FHE, Gaspar LFJ et al. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. *Rev Port Cienc Vet.* 2007; 103 (563-564):253-60.
4. Amaral AS, Ferreira I, Colodel MM, Salvadore DMF, Rocha NS. DNA damage in canine transmissible venereal tumor cells. *RLCMVZ.* 2011; 4: 1-5.
5. Amaral AS, Gaspar LFJ, Silva SB, Rocha NS. Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu, region, Brazil (descriptive study: 1994-2003). *Rev Port Cienc Vet.* 2004; 99 (551)161-71.
6. Amaral AS. Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA [tese]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.
7. Barker TH, Hagood JS. Getting a grip on Thy-1 signaling. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet].* 2009; 1793(5):921–3.
8. Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J.* 2015; 36(3):273-9.
9. Bassani-Silva S, Sforcin JM, Amaral AS, Gaspar LFJ, Rocha NS. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cell. *Rev Port Cienc Vet.* 2007; 102 (563-564): 261-265.

10. Bassani-Silva S. Imunoexpressão e citogenética do tumor venéreo transmissível natural no cão [tese]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
11. Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med*. 2008; 86(9):1025–32.
12. Blacking TM, Waterfall M, Argyle DJ. CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011a; 141 (1-2):46–57.
13. Blacking TM, Waterfall M, Samuel K, Argyle DJ. Flow cytometric techniques for detection of candidate cancer stem cell subpopulations in canine tumour models. *Vet Comp Oncol*. 2011b; 10(4):252–73.
14. Bustin S, Benes V, Garson J. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55(4):611–22.
15. Calloni R, Cordero EAA, Henriques JAP, Bonatto D. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013; 22(9):1455–76.
16. Chanmee T, Ontong P, Kimata K, Itano N. Key roles of hyaluron and its cd44 receptor in the stemness and survival of cancer stem cells. *Front Oncol*. 2015; 5:180.
17. Chappell J, Dalton S. Altered cell cycle regulation helps stem-like carcinoma cells resist apoptosis. *BMC Biol* [Internet]. 2010; 8:63.
18. Chen K, Huang Y, Chen J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34(6): 732–40.

19. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2010; 17 (4): 362-75.
20. Chuang TF, Lee SC, Liao KW, Hsiao YW, Lo CH, Chiang BL, et al. Electroporation-mediated IL-12 gene therapy in a transplantable canine cancer model. *Int J Cancer*. 2009; 125: 698–707.
21. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006; 66(19):9339–44.
22. Cobbold S, Metcalfe S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens*. 1994; Mar; 43(3):137-54.
23. Cocola C, Anastasi P, Astigiano S, Piscitelli E, Pelucchi P, Vilaro L, et al. Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential. *Reprod Domest Anim*. 2009; 44 Suppl 2:214–7.
24. Cogliati B, Aloia TP a, Bosch R V., Alves V a F, Hernandez-Blazquez FJ, Dagli MLZ. Identification of hepatic stem/progenitor cells in canine hepatocellular and cholangiocellular carcinoma. *Vet Comp Oncol*. 2010; 8 (2):112–21.
25. Dingli D, Nowak MA. Cancer biology: infectious tumour cells. *Nature*. 2006; 443 (7107): 35–6.
26. Duncan JR, Prasse KW. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. *Vet Pathol*. 1979; 16: 673-679.
27. Ferletta M, Grawe J, Hellmen E. Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature. *Int J Dev Biol*. 2011; 55 (7-9): 791–9.

28. Figueroa FC, Zanetti JS, Ribeiro-Silva A, Fonseca-Alves CE, Rocha NS. Association of CD44+/CD24- cells to more aggressive molecular phenotypes in canine mammary carcinomas. *Int J of Cancer Res.* 2015; 11 (3): 119-127.
29. Flórez LMM, Pedraza F, Grandi F, Rocha NS. Cytological subtypes of canine venereal transmissible tumor. *Vet Clin Pathol.* 2012; 41 (1):3-5.
30. Flórez LMM. Expressão dos genes MDR-1, TP53, BCL-2, e BAX em tumor venéreo transmissível canino e sua relação com a agressividade e resposta a quimioterapia [tese]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
31. Fujimoto A, Neo S, Ishizuka C, Kato T, Segawa K, Kawarai S et al. Identification of cell surface antigen expression in canine hepatocellular carcinoma cell lines. *J Vet Med Sci.* 2013; 75(6): 831-35.
32. Ganguly B, Das U, Das a. K. Canine transmissible venereal tumour: A review. *Vet Comp Oncol.* 2013; 1–12.
33. Gaspar LFG, Ferreira I, Colodel MM, Brandão CL, Rocha NS. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. *Turk J Vet Anim Sci.* 2010; 34(5):447-54.
34. Gaspar LFJ. Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica a quimioterapia [tese]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.
35. Gonzalez CM, Griffey SM, Naydan DK, Flores E, Cepeda R, Cattaneo G, et al. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. *J Comp Pathol.* 2000; 122 (4): 241–8.

36. Gorden BH, Kim JH, Sarver AL, Frantz AM, Breen M, Lindblad-Toh K, et al. Identification of three molecular and functional subtypes in canine hemangiosarcoma through gene expression profiling and progenitor cell characterization. *Am J Pathol.* 2014; 184(4):985–95.
37. Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Götte M. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytom Part A.* 2012;81 A (4):284–93.
38. Grosse-Gehling P, Fargeas CA, Dittfeld C, Garbe Y, Alison MR, Corbeil D, et al. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol.* 2013; 229 (3): 355–78.
39. Guo W, Lasky JL, Wu H. Cancer stem cells. *Pediatr Res.* 2006; 59 (4 Pt 2): 59R – 64R.
40. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA .Cancer stem cell: mirage or reality. 2009; *Nature Med.* 15 (9): 1010-12.
41. Guth AM, Deogracias M, Dow SW. Comparison of cancer stem cell antigen expression by tumor cell lines and by tumor biopsies from dogs with melanoma and osteosarcoma. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014; 161 (3-4): 132–40.
42. Haeryfar SMM, Hoskin DW. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol.* 2004; 173:3581–8.
43. Han L, Shi S, Gong T, Zhang Z, Sun X. Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2013; 3 (2):65–75.
44. Harmelin a., Pinthus JH, Katzir N, Kapon a., Volcani Y, Amariglio EN, et al. Use of a murine xenograft model for canine transmissible venereal tumor. *Am J Vet Res.* 2001; 62 (6):907–11.

45. Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2010; 20 (2):77–84.
46. Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res*. 2006; 66 (4): 1891–5.
47. Holmes JM. Measurement of the rate of death of canine transmissible venereal tumour cells transplanted into dogs and nude mice. *Res Vet Sci*. 1981; 30: 248–50.
48. Hong I-S, Jang G-B, Lee H-Y, Nam J-S. Targeting cancer stem cells by using the nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2015; 10(Spec. Issue):251-260.
49. Hsiao Y-W, Liao K-W, Hung S-W, Chu R-M. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002; 87:19–27.
50. Huang J, Zhang D, Xie F, Lin D. The potential role of cox-2 in cancer stem cell-mediated canine mammary tumor initiation: an immunohistochemical study. *J Vet Sci*. 2015; 16(2): 225-31.
51. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(5):2309–17.
52. Islam F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK-Y. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in Cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res*. 2015;335 (1):135–47.
53. Ito D, Endicott MM, Jubala CM, Helm KM, Burnett RC, Husbands BD et al. A tumor-related lymphoid progenitor populations supports hierarchical tumor organization in canine B-cell lymphoma. *J Vet Intern Med*. 2011; 25:890-96.

54. Jordan CT. Cancer stem cell biology: From leukemia to solid tumors. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16 (6): 708–12.
55. Karlson AG, Mann FC. The transmissible venereal tumors of dogs: observations on forty generations of experimental transfer. *Ann N Y Acad Sci.* 1952; 54(6):1197-213.
56. Keysar SB, Jimeno A. More than Markers: Biological Significance of Cancer Stem Cell-Defining Molecules. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9 (9):2450–7.
57. Kim MC, D’Costa S, Suter S, Kim Y. Evaluation of a side population of canine lymphoma cells using Hoechst 33342 dye. *J Vet Sci.* 2013; 14: 481–6.
58. Koike T, Kudo T, Otomo K, Sakai T. Successively transplanted canine transmissible sarcoma. *Gann.* 1979; 70 (1): 115–8.
59. Kreiss a, Tovar C, Obendorf DL, Dun K, Woods GM. A murine xenograft model for a transmissible cancer in Tasmanian devils. *Vet Pathol.* 2011; 48 (2): 475–81.
60. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2014; 14 (3): 275–91.
61. Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol.* 2013; 2 (1): 17.
62. Liu C-C, Wang Y-S, Lin C-Y, Chuang T-F, Liao K-W, Chi K-H, et al. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57 (4):479–91.

63. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*. 2006; 5 (1):67.
64. Liu W-H, You N, Zhang N, Yan H-T, Wang T, Huang Z, et al. Interpretation of interlocking key issues of cancer stem cells in malignant solid tumors. *Cell Oncol*. 2012;35 (6):397–409.
65. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402–8.
66. Magalhães GM, Terra EM, Vasconcelos RO, Bandarra MB, Moreira PRR, Rosolem MC, et al. Immunodetection of cells with a CD44+/CD24- phenotype in canine mammary neoplasms. *BMC Vet Res*. 2013; 9: 205.
67. Marchal T, Chabanne L, Kaplanski C, Rigal D, Magnol JP. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Vet Immunol Immunopathol*. 1997; 57 (1-2):1–11.
68. Michishita M, Akiyoshi R, Suemizu H, Nakagawa T, Sasaki N, Takemitsu H, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines. *Vet J*. 2012; 193 (2): 508–13.
69. Michishita M, Akiyoshi R, Yoshimura H, Katsumoto T, Ichikawa H, Ohkusu-Tsukada K, et al. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res Vet Sci*. 2011; 91 (2): 254–60.
70. Michishita M, Ezaki S, Ogihara K, Naya Y, Azakami D, Nakagawa T, et al. Identification of tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line. *Res Vet Sci*. 2014; 96 (2): 315–22.
71. Mizrak D, M B, MR A. CD133: molecule of the moment. *J Pathol*. 2008; 214 :3–9.

72. Mizuno S, Fujinaga T, Kurosawa T. Changes in lymphokine-activated killer activity in peripheral blood lymphocytes from canine transmissible venereal sarcoma models. *Exp Anim*. 1996; 45 (3): 289–92.
73. Mizuno S, Fujinaga T, Tajima M, Otomo K, Koike T. Role of lymphocytes in dogs experimentally re-challenged with canine transmissible sarcoma. *Nihon Juigaku Zasshi [Internet]*. 1989; 51 (1): 86–95.
74. Moore N, Lyle S. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. *J Oncol [Internet]*. 2011; 2011: 1–11.
75. Moulay M, Liu WEN, Willenbrock S, Sterenczak KA, Carlson R, Ngezahayo A, et al. Evaluation of Stem Cell Marker Gene Expression in Canine Prostate Carcinoma- and Prostate Cyst-derived Cell Lines. *Anticancer Res*. 2013; 33 (12): 5421–31.
76. Mozos E, Méndez A, Gómez-Villamandos JC, Martín De Las Mulas J, Pérez J. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. *Vet Pathol*. 1996; 33:257–63.
77. Mukaratirwa S, Chimonyo M, Obwolo M, Gruys E, Nederbragt H. Stromal cells and extracellular matrix components in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Histol Histopathol*. 2004; 19 (4): 1117–23.
78. Mukaratirwa S, Chiwome T, Chitanga S, Bhebhe E. Canine transmissible venereal tumour: assessment of mast cell numbers as indicators of the growth phase. *Vet Res Commun*. 2006; 30 (6): 613–21.
79. Mukaratirwa S, Gruys E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet Q*. 2003; 25 (3): 101–11.

80. Murchison EP, Tovar C, Hsu A, Bender HS, Kheradpour P, Rebbeck CA, et al. The Tasmanian devil transcriptome reveals Schwann cell origins of a clonally transmissible cancer. *Science*. 2010; 327 (5961): 84–7.
81. Murchison EP, Wedge DC, Alexandrov LB, Fu B, Martincorena I, Ning Z, et al. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Science*. 2014; 343 (6169): 437–40.
82. Murchison EP. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. *Oncogene*. 2008; 27 Suppl 2(S2):S19–30.
83. Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss R a. Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer. *Cell*. 2006; 126 (3): 477–87.
84. Nemeth K, Karpati S. Identifying the Stem Cell. *J Inv Derm*. 2014; 134:1-5.
85. Nemoto Y, Maruo T, Sato T, Deguchi T, Ito T, Sugiyama H, et al. Identification of cancer stem cells derived from a canine lung adenocarcinoma cell line. *Vet Pathol*. 2011; 48 (5): 1029–34.
86. Neuzil J, Stantic M, Zobalova R, Chladova J, Wang X, Prochazka L, et al. Tumour-initiating cells vs. cancer “stem” cells and CD133: what’s in the name? *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 355 (4): 855–9.
87. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci*. 2008; 121: 3683–92.
88. O’Connor ML, Xiang D, Shigdar S, Macdonald J, Li Y, Wang T, et al. Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Lett*. 2014; 344 (2):180–7.
89. O’Neill ID. Concise review: transmissible animal tumors as models of the cancer stem-cell process. *Stem Cells*. 2011; 29 (12): 1909–14.

90. Ostrander EA, Davis BW, Ostrander GK. Transmissible tumors: breaking the cancer paradigm. *Trends in Genetics*. 2016; 32 (1): 1-15.
91. Özalp G, Zik B, Bastan a, Peker S, Özdemir-Salcı E, Bastan I, et al. Vincristine modulates the expression of Ki67 and apoptosis in naturally occurring canine transmissible venereal tumor (TVT). *Biotech Histochem*. 2012;87(5):325–30.
92. Pai CC, Kuo TF, Mao SJT, Chuang TF, Lin CS, Chu RM. Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011; 139 (2-4): 187–99.
93. Pang LY, Argyle D. Cancer stem cells and telomerase as potential biomarkers in veterinary oncology. *Vet J*. 2010; 185 (1): 15–22.
94. Pang LY, Argyle SA, Kamida A, Morrison KO, Argyle DJ. The long-acting COX-2 inhibitor mavacoxib (Trocoxil™) has anti-proliferative and pro-apoptotic effects on canine cancer cell lines and cancer stem cells in vitro. *BMC Vet Res*. 2014a; 10 (1): 184.
95. Pang LY, Cervantes-Arias A, Else RW, Argyle DJ. Canine Mammary Cancer Stem Cells are Radio- and Chemo- Resistant and Exhibit an Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype. *Cancers*. 2011; 3 (2): 1744–62.
96. Pang LY, Gatenby EL, Kamida A, Whitelaw B a., Hupp TR, Argyle DJ. Global gene expression analysis of canine osteosarcoma stem cells reveals a novel role for COX-2 in tumour initiation. *PLoS One*. 2014b; 9 (1): 1–13.
97. Rauner G, Barash I. Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. *PLoS One*. 2012; 7 (1): e30113.

98. Rege TA, Hagood JS. Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2006 ;1763 (10):991–9.
99. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414 (6859): 105–11.
100. Santos FGA, Vasconcelos AC, Nunes JES, Cassali GD, Paixão TA, Martins AS et al. Apoptosis in the transplanted canine transmissible venereal tumor during growth and regression phases. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2008; 60(3): 607-12.
101. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182 (August 1999):311–22.
102. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell*. 2009; 138(5):822–9.
103. Shmelkov S V, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37 (4): 715–9.
104. Siddle H, Kaufman J. Immunology of naturally transmissible tumors. *Immunology*. 2014; 144:11-20.
105. Sidney LE LE, Branch MJM, Dunphy SSE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014; 32: 1380–9.
106. Soltysova A, Altanerova V, Altaner C. Cancer stem cells. *Neoplasma*. 2005; 52(6): 435-40.
107. Stettner N, Brenner O, Eilam R, Harmelin A. Pegylated liposomal doxorubicin as a chemotherapeutic agent for treatment of canine transmissible venereal tumor in murine models. *J Vet Med Sci*. 2005; 67 (11): 1133–9.

108. Stoica G, Lungu G, Martini-Stoica H, Waghela S, Levine J, Smith R. Identification of cancer stem cells in dog glioblastoma. *Vet Pathol.* 2009; 46(3):391–406.
109. Strakova A, Muchirson EP. The cancer which survived: insights from the genome of an 11.000 year-old cancer. *Curr Op in Gen and Dev.* 2015; 30:49-55.
110. Strakova A, Murchison EP. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. *BMC Vet Res [Internet].* 2014;10(1):168.
111. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res.* 2012; 22 (3): 457–72.
112. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J.* 2013; 27 (1): 13–24.
113. Trosko JE. Review paper: cancer stem cells and cancer nonstem cells: from adult stem cells or from reprogramming of differentiated somatic cells. *Vet Pathol.* 2009; 46:176–93.
114. Vargas THM, Pulz LH, Barra CN, Kleeb SR, Xavier JG, Catão-Dias JL et al. Immunohistochemical expression of the pluripotency factor OCT4 in canine mast cell tumors. *J Comp Path.* 2015; in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.08.010>.
115. Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP. Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ.* 2008; 15(6): 947–58.

116. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(10):755–68.
117. Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*. 2005; 15 (9): 494–501.
118. Wellman ML. The cytologic diagnosis of neoplasia. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract*. 1990; 20 (4):919-38.
119. Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun Signal [Internet]*. 2010; 8(1):6.
120. Williams K, Motiani K, Giridhar PV, Kasper S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013; 238: 324–38.
121. Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, Argyle DJ. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet J*. 2008; 175 (1): 69–75.
122. Wilson-Robles HM, Daly M, Pfent C, Sheppard S. Identification and evaluation of putative tumour-initiating cells in canine malignant melanoma cell lines. *Vet Comp Oncol*. 2015; 60–9.
123. Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev*. 2009; 18 (8): 1127–34.
124. Yan Y, Zuo X, Wei D. Emerging role of CD44 in cancer stem cells: a promising biomarker and therapeutic targeting. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4 (9):1033-43.
125. Zoller M. CD44, Hyaluronan, the Hematopoietic Stem Cell, and Leukemia-Initiating Cells. *Front Immunol*. 2015; 6: 235.

Apêndice A

Artigos relacionados às células iniciadoras tumorais em cães e gatos

Quadro 1 – Principais marcadores de superfície utilizados na identificação de células iniciadoras tumorais em neoplasias de cães e gatos.

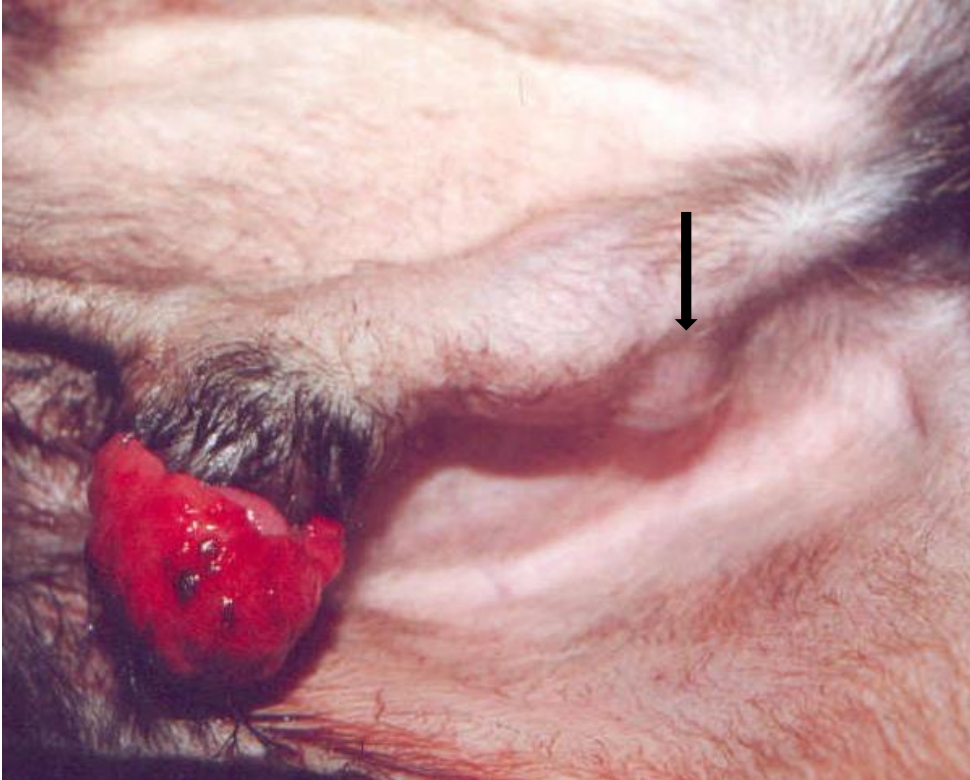
Neoplasia	Marcadores	Citação
Mamária	CD44, CD24	Michishita et al. (2012)
	CD44	Pang et al. (2011)
	CD44, CD24	Magalhães et al. (2013)
	CD44, CD24, CD133	Michishita et al. (2011)
	CD133, CD44	Cocola et al. (2009)
	CD44	Huang et al. (2015)
	CD44, CD133, CD34	Ferletta et al. (2011)
Próstata	CD44, CD24	Figueroa et al. (2015)
	CD44, CD34, CD133	Moulay et al. (2013)
Linfoma	CD133, CD34	Ito et al (2011)
Hepática	CD133, CD44	Cogliati et al. (2010)
	CD90, CD44, CD34, CD133	Michishita et al. (2014)
	CD44, CD90, CD133, CD34, CD29	Fujimoto et al. (2013)
Osteossarcoma	CD34, CD34	Pang et al. (2014a, b)
Melanoma	CD34, CD34	Wilson-Robles et al. (2013)
Hemangiossarcoma	CD133, CD34, CD90, CD117	Gorden et al. (2014)
Neural	CD133, CD34	Stoica et al. (2009)
Diversos tumores	CD44 ^{alta/baixa}	Blacking et al. (2011a)
Osa, LLA	CD34, CD44, CD117, CD133	Blacking et al. (2011b)
Osa, melanoma	CD44, CD34, CD133, CD90	Guth et al. (2014)

Osa, osteossarcoma; LLA, Leucemia linfoblástica aguda.

Apêndice B

Apresentação clínica

Fotografia 1 - Tumor venéreo transmissível em cão, sexo masculino. Vista ventro-lateral do prepúcio, mucosa prepucial evertida. Tumoração vegetante, multi-lobulada, necro-hemorrágica e róseo-avermelhada em transição muco-cutânea. Linfonodo inguinal superficial direito indicado pela seta (linfadenomegalia moderada).



Fonte: material elaborado pelo autor.

Apêndice C

Apresentação clínica

Fotografia 2. Tumor venéreo transmissível em cão, sexo feminino. Vista ventral da vestibulo vulvar. Tumoração vegetante, multi-lobulada, róseo-esbranquiçada em mucosa.

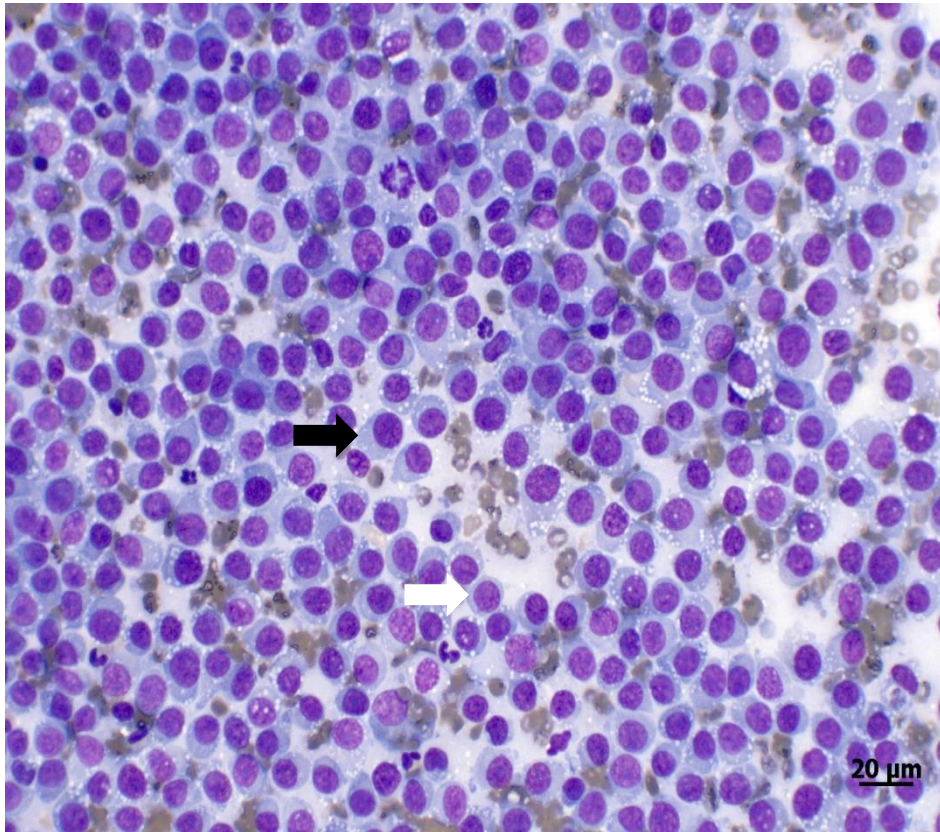


Fonte: material elaborado pelo autor.

Apêndice D

Apresentação cito-morfológica

Fotomicrografia 1 - Punção aspirativa por agulha fina (PAAF), tumor venéreo transmissível canino. Predomínio de oncócitos redondos individualizadas. O citoplasma é basofílico homogêneo com micro-vacúolos. Os núcleos são centrais ou excêntricos, com heterocromatina rendilhada e nucléolos distintos. Oncócito plasmocitóide (seta negra) e oncócito linfocitóide (seta branca). Coloração pelo Panótico, 400x.

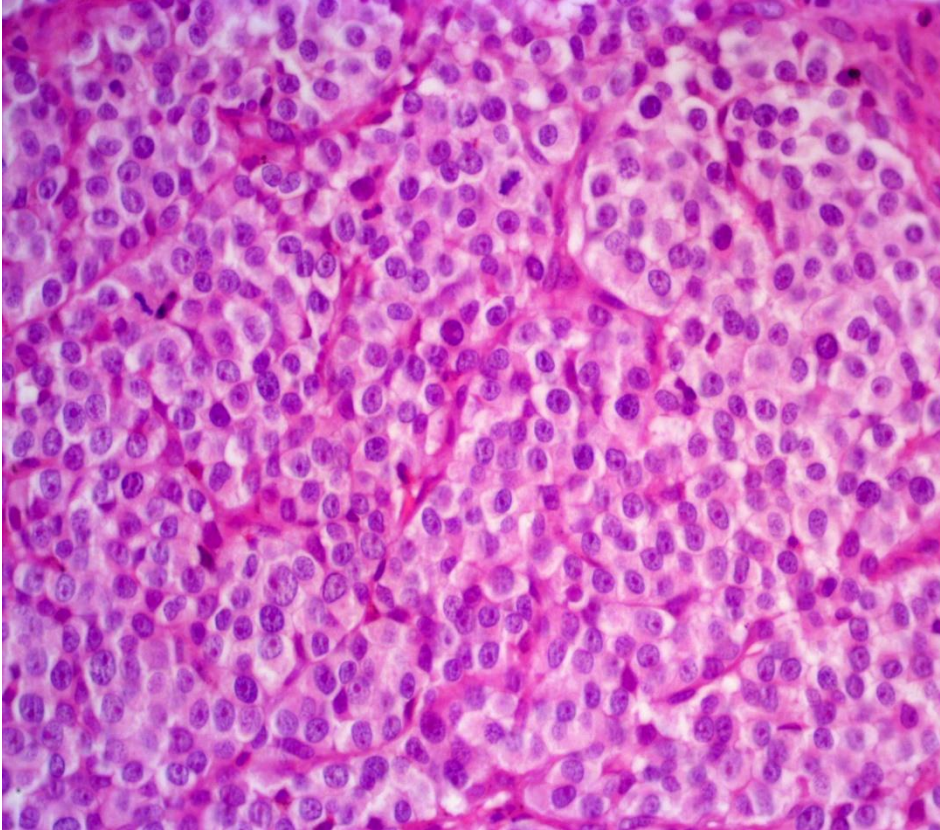


Fonte: material elaborado pelo autor.

Apêndice E

Apresentação histo-morfológica

Fotomicrografia 2 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Predomínio de oncócitos redondos dispostos em pacotes separados por estroma fibro-vascular. O citoplasma é acidofílico ou claro. Os núcleos são centrais ou excêntricos, com heterocromatina rendilhada e nucléolos distintos. Hematoxilina & Eosina, 400x.

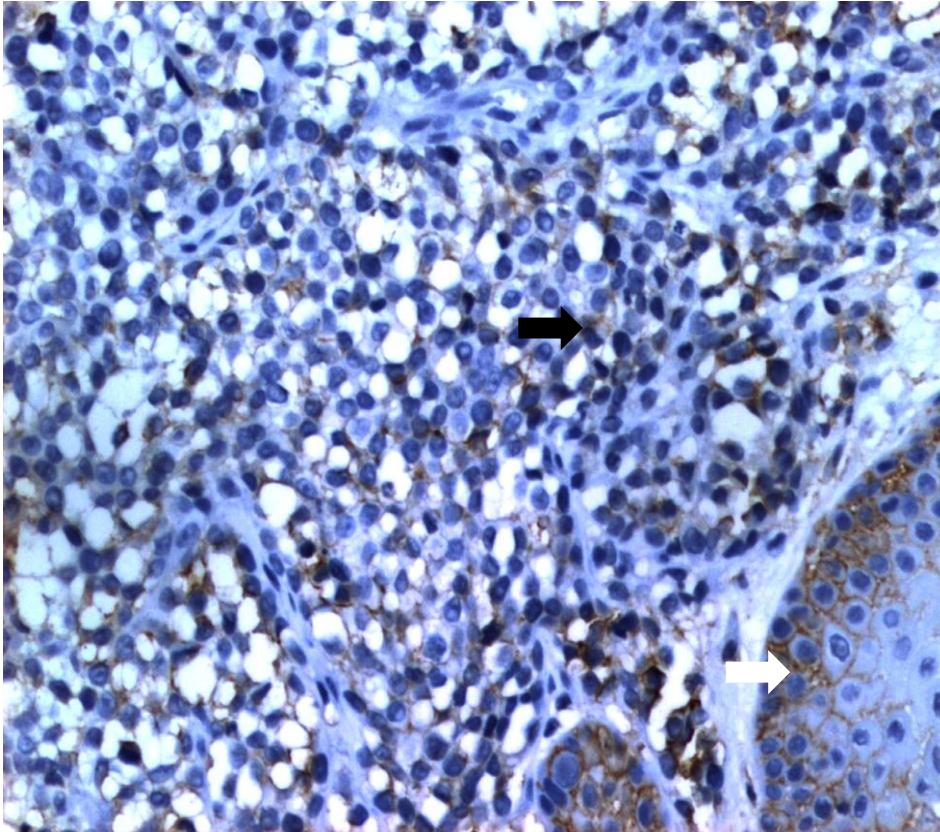


Fonte: material elaborado pelo autor.

Apêndice F

Imuno-histoquímica

Fotomicrografia 3 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imunomarcagem de membrana para a proteína CD44 nos oncócitos (seta negra) e células epiteliais da mucosa vaginal (seta branca). Cromógeno DAB, contra-coloração com hematoxilina de Harris, 400x.

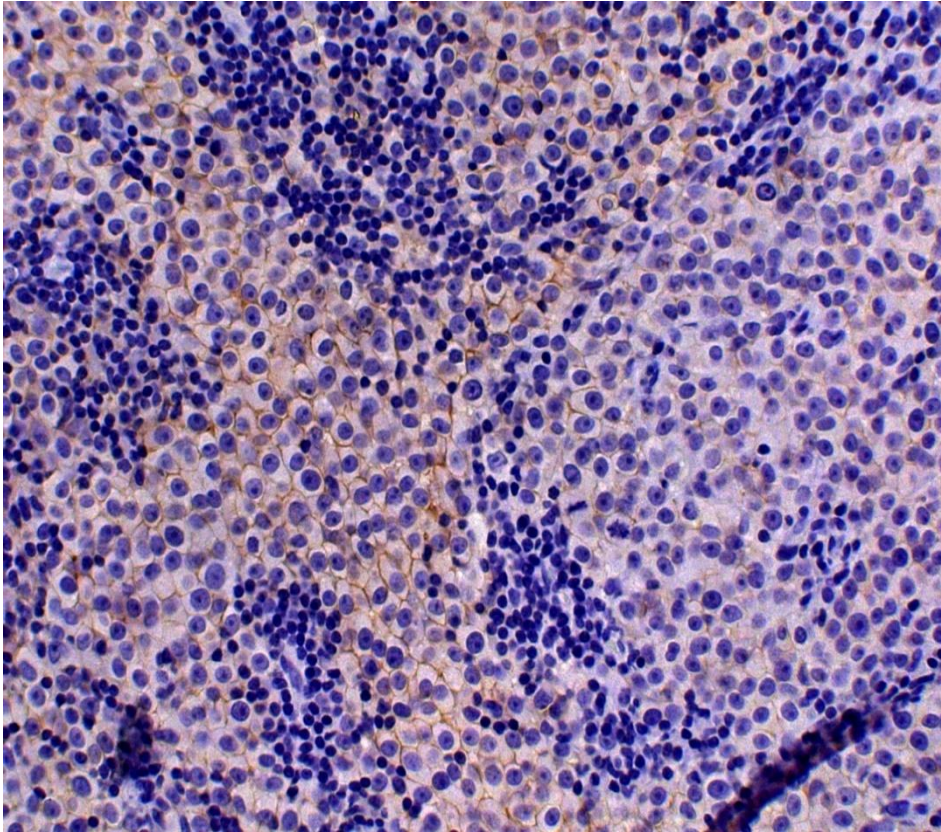


Fonte: material elaborado pelo autor.

Apêndice G

Imuno-histoquímica

Fotomicrografia 4 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imunomarcção de membrana para a proteína CD44 nos oncócitos. Na periferia, a intensidade e o percentual de células positiva é maior. Cromógeno DAB, contra-coloração com hematoxilina de Harris, 200x.

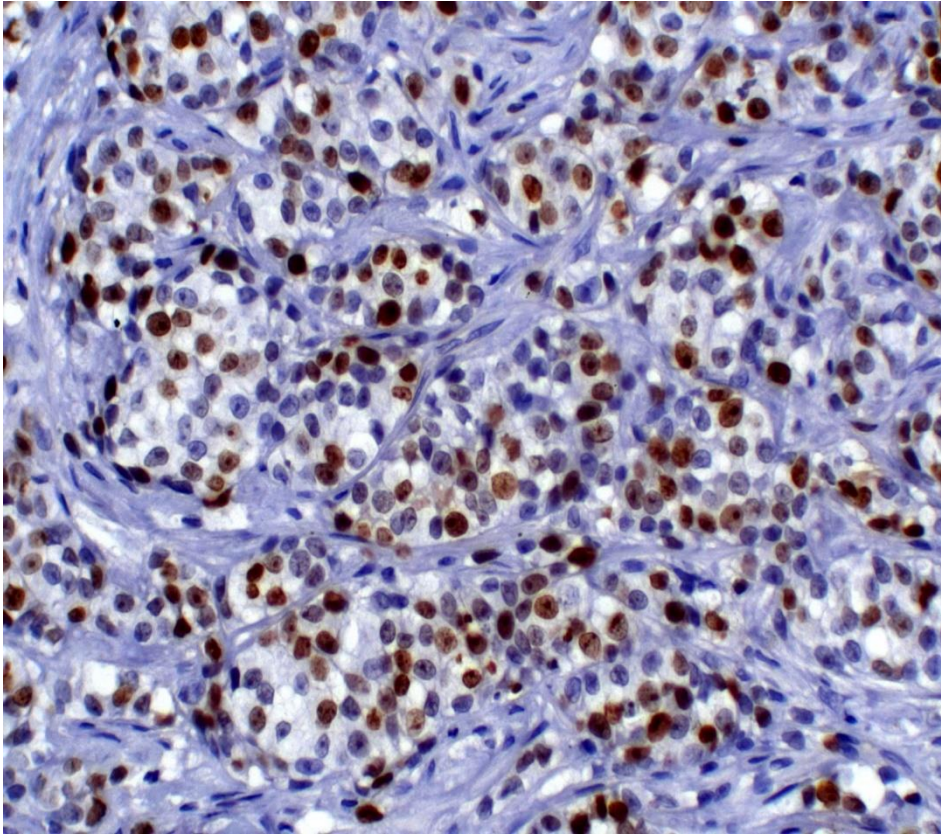


Fonte: material elaborado pelo autor.

Apêndice H

Imuno-histoquímica

Fotomicrografia 5 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imunomarcção nuclear. Ki-67 (clone MIB-1). Cromógeno DAB, contra-coloração com hematoxilina de Harris, 400x.

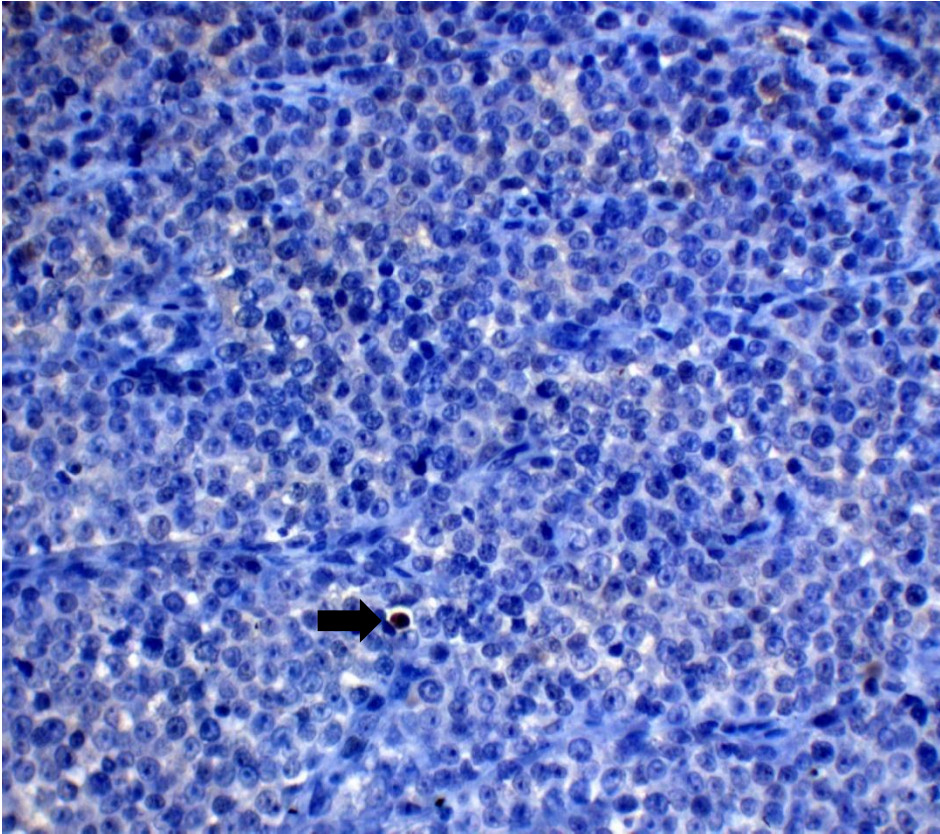


Fonte: material elaborado pelo autor.

Apêndice I

Imuno-histoquímica

Fotomicrografia 6 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imunomarcação, caspase-3 clivada. Célula apoptótica com halo claro periférico (seta negra). Cromógeno DAB, contra-coloração com hematoxilina de Harris, 400x.

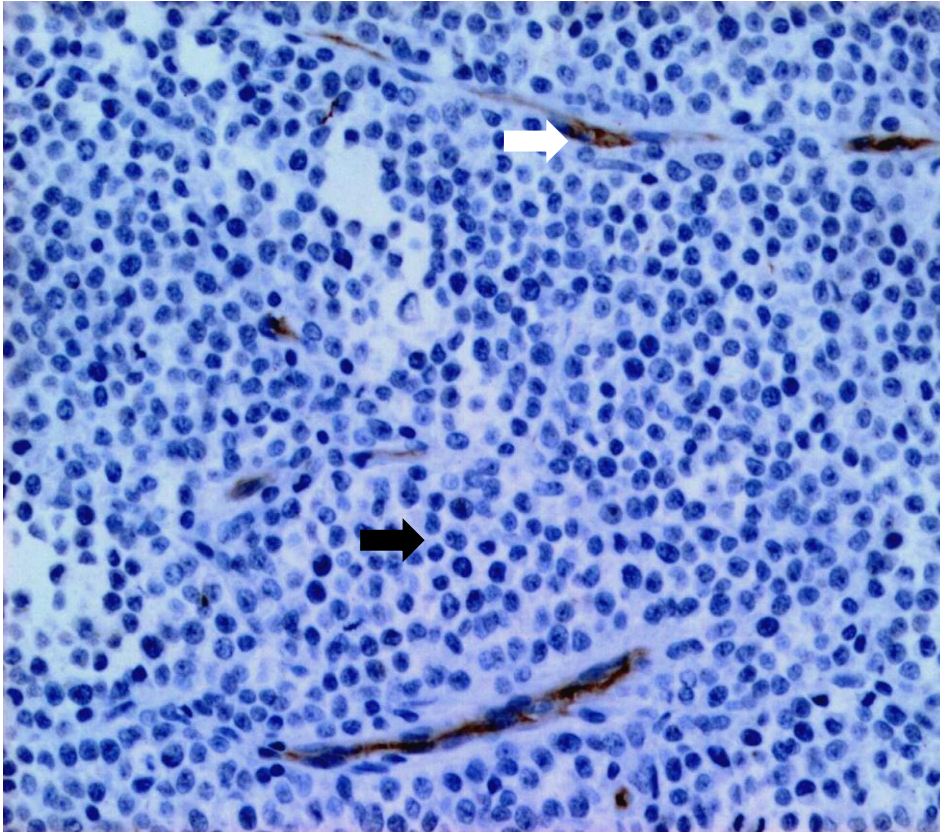


Fonte. Material elaborado pelo autor.

Apêndice J

Imuno-histoquímica

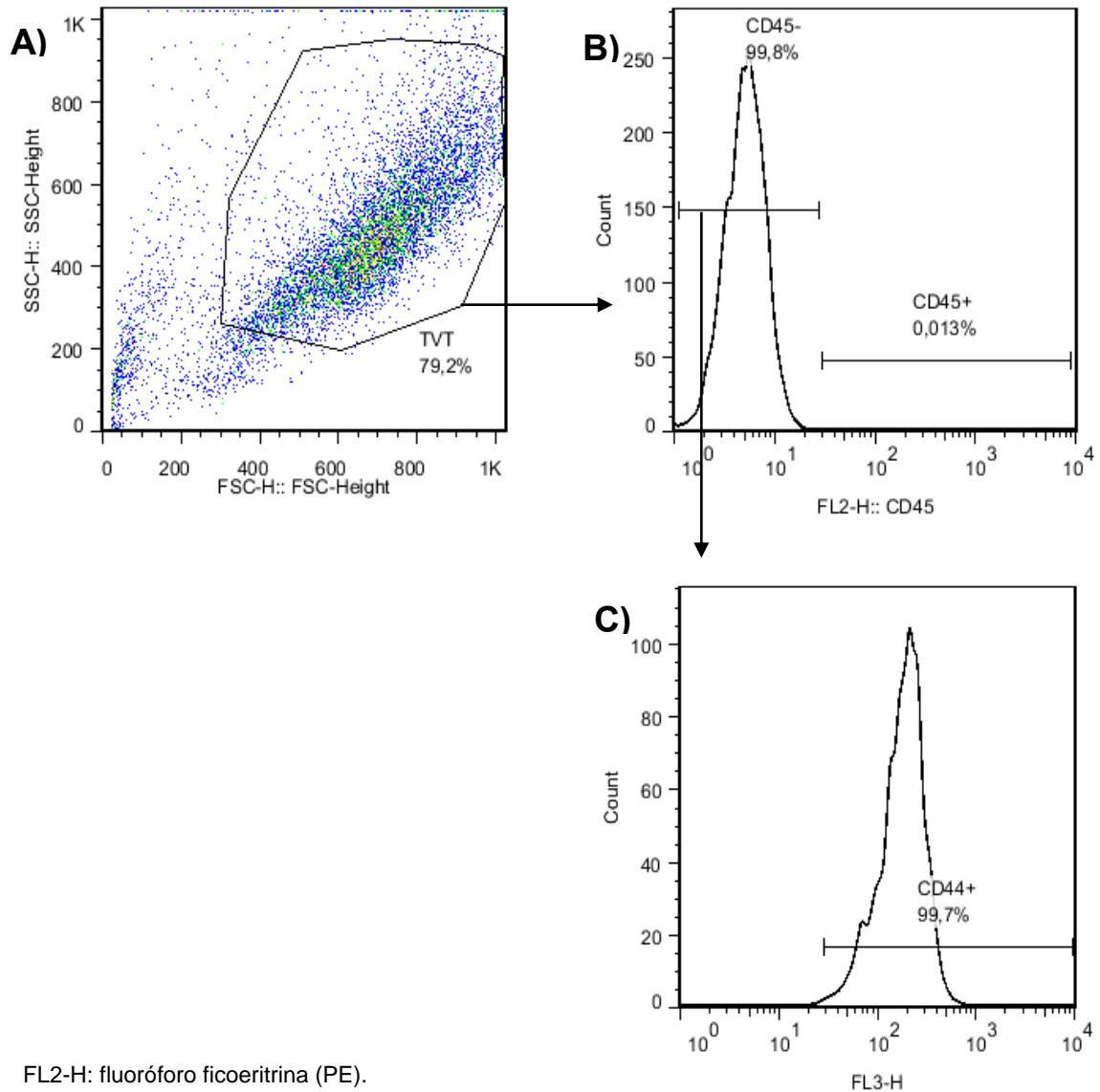
Fotomicrografia 7 - Fragmento de biópsia, tumor venéreo transmissível canino. Imunomarcagem de membrana para a proteína CD34 nas células endoteliais (seta branca). Os oncócitos são negativos (setas negras). Cromógeno DAB, contra-coloração com hematoxilina de Harris, 400x.



Fonte. Material elaborado pelo autor.

Apêndice K Citometria de fluxo

Fluxograma de análise 1 - A) Imagem representativa da distribuição das células segundo tamanho e complexidade. Seleção de 79,2% das células. B) Seleção da população CD45⁻. C) Análise da população de células CD44⁺. Fluxogramas similares foram utilizados nas demais avaliações.



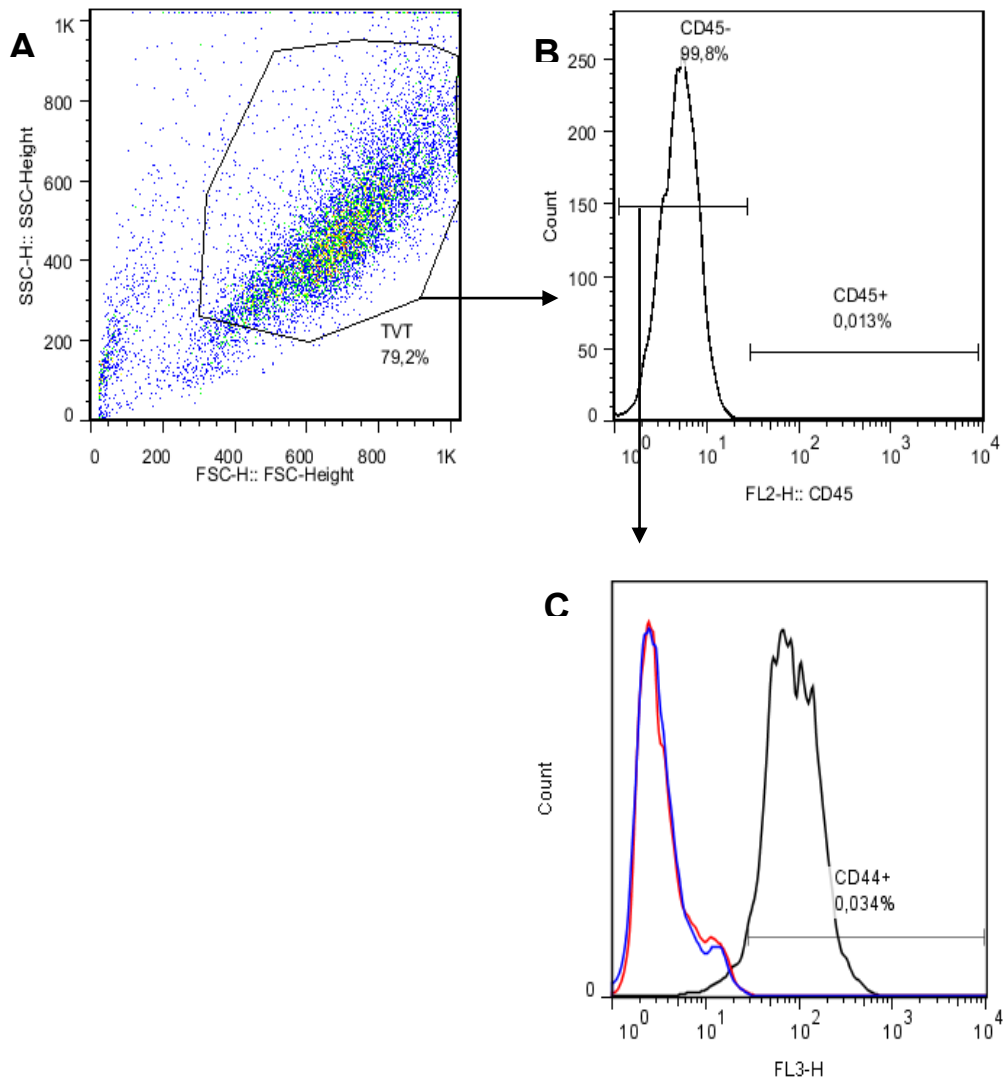
FL2-H: fluoróforo ficoeritrina (PE).

FL3-H: fluoróforo PerCP.

Fonte. Material elaborado pelo autor.

Apêndice L Citometria de fluxo

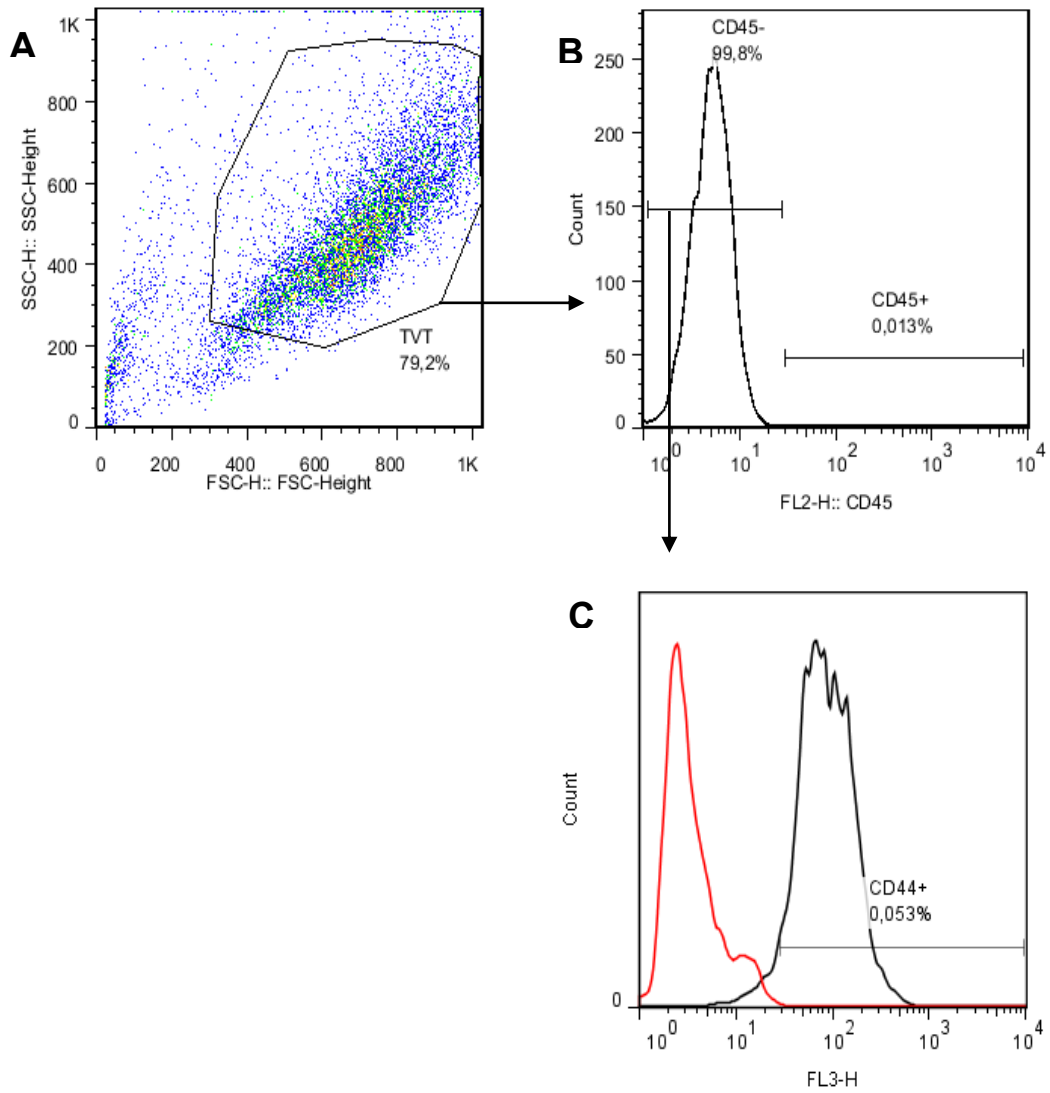
Fluxograma de análise 2 - A) Imagem representativa da distribuição das células segundo tamanho e complexidade. Seleção de 79,2% das células. B) Seleção da população CD45⁻. C) Controle isotípico PE (linha azul); controle isotípico APC (linha vermelha).



Fonte. Material elaborado pelo autor.

Apêndice M Citometria de fluxo

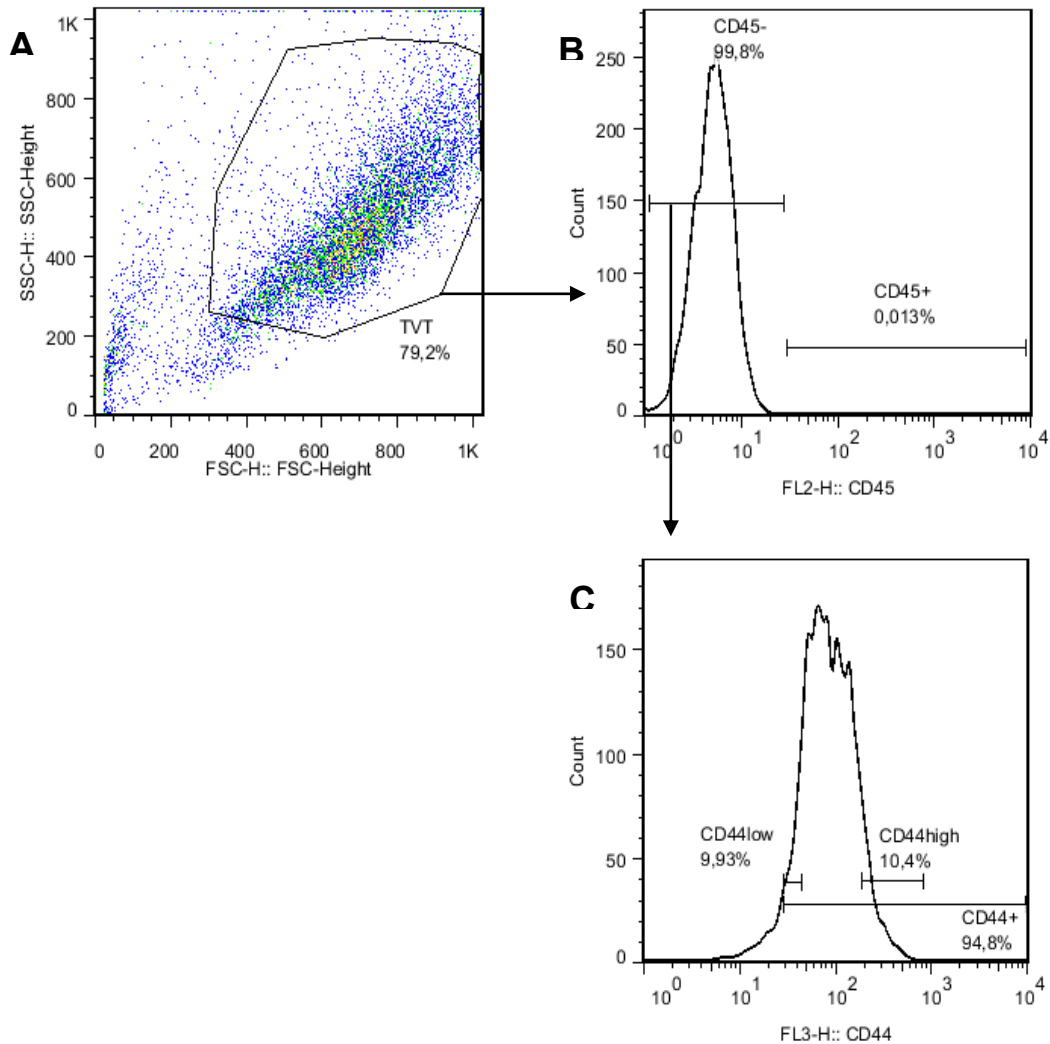
Fluxograma de análise 3 - A) Imagem representativa da distribuição das células segundo tamanho e complexidade. Seleção de 79,2% das células. B) Seleção da população CD45⁻. C) Controle branco (linha vermelha).



Fonte. Material elaborado pelo autor.

Apêndice N Citometria de fluxo

Fluxograma de análise 4 - A) Imagem representativa da distribuição das células segundo tamanho e complexidade. Seleção de 79,2% das células. B) Seleção da população CD45⁻. C) Seleção da população CD44⁺ e discriminação de 10% das sub-populações com maior e menor sinal através da mensuração da intensidade média de fluorescência.



FL3-H: fluofóro PerCP.

Fonte. Material elaborado pelo autor.

Apêndice O

Dados descritivos

Quadro 2 – Número do caso, sexo, idade (em anos), raça, tempo para remissão tumoral completa (RTC, em dias) de 38 pacientes. Pacientes perdidos no seguimento clínico (P).

Caso	Sexo	Idade	Raça	RTC	Localização
1	F	3	S.R.D.	345	Pele
2	M	3	S.R.D.	P	Genital
3	F	8	Weimaraner	P	Genital
4	F	8	S.R.D.	P	Genital
5	M	4	S.R.D.	P	Genital
6	M	7	S.R.D.	P	Genital
7	F	3	S.R.D.	49	Genital
8	F	8	S.R.D.	35	Genital
9	F	10	Pitbull	P	Genital
10	M	9	S.R.D.	P	Genital
11	M	3	S.R.D.	P	Pele
12	M	5	S.R.D.	P	Genital
13	F	7	S.R.D.	P	Genital
14	M	4	S.R.D.	69	Genital
15	F	4	Pitbull	116	Genital
16	F	6	S.R.D.	34	Genital
17	F	1	S.R.D.	247	Genital
18	M	4	S.R.D.	P	Genital
19	M	8	S.R.D.	63	Genital e pele
20	F	8	S.R.D.	P	Conjuntiva palpebral
21	M	6	S.R.D.	P	Genital
22	F	4	S.R.D.	P	Genital
23	M	3	S.R.D.	P	Genital
24	F	2	S.R.D.	35	Genital
25	F	2	S.R.D.	39	Genital
26	F	12	S.R.D.	79	Genital
27	M	8	Pincher	37	Oral e nasal
28	M	10	Pastor Belga	P	Genital
29	F	5	Pitbull	99	Genital
30	F	7	Daschund	80	Genital
31	F	3	S.R.D.	P	Genital
32	F	6	S.R.D.	P	Genital
33	M	8	S.R.D.	36	Genital
34	F	4	S.R.D.	49	Genital
35	F	2	S.R.D.	P	Genital
36	M	6	Poodle Stardand	P	Genital
37	F	8	Pitbull	P	Genital
38	M	2	S.R.D.	P	Genital

Apêndice P

Dados descritivos

Quadro 3 – Número do caso, tipo citológico, percentual de células CD90+, CD44+, CD133+ e CD34+ na citometria de fluxo de 38 pacientes.

Caso	Tipo citológico	CD90+	CD133+	CD44+	CD34+
1	Plasmocitoide	4,26	37,84	91,2	0,08
2	Plasmocitoide	6,685	84,7	99,1	0,588
3	Misto	5,1	37,6	92,2	0,06
4	Plasmocitoide	22,95	67,4	99,8	0,0115
5	Misto	4,3	35,21	90,7	0,08
6	Misto	0,178	4,47	93,7	0
7	Plasmocitoide	13,6	18,7	92	0
8	Plasmocitoide	0,7275	5,72	91,9	0,09025
9	Misto	2,75	73,8	99,9	0,014
10	Plasmocitoide	1,2115	3,85	99,4	0
11	Misto	0,0925	0,998	99,5	0,0975
12	Misto	23,62	64,5	99,8	0,158
13	Plasmocitoide	4,25	34,98	91,6	0,068
14	Plasmocitoide	1,745	26,1	70,5	1,0765
15	Plasmocitoide	0,8175	50	99,5	0,138
16	Misto	1,97	73,4	99,7	0,034
17	Plasmocitoide	41,41	97,5	74,5	0,0405
18	Misto	1,96	98,8	71,3	0,054
19	Misto	1,8165	97,6	29,7	0,049
20	Plasmocitoide	2,595	51,2	83,6	0,4835
21	Plasmocitoide	4,19	98,4	95,6	0,154
22	Misto	7,79	97,2	99,1	0
23	Misto	1,317	14,4	99,2	0
24	Misto	0,101	34,5	99,7	0,0125
25	Misto	1,895	19,7	99,8	0,0615
26	Misto	2,03	49,6	99,1	0,0285
27	Plasmocitoide	14,93	34,2	99,7	0,023
28	Misto	0,2875	12,8	98,6	0,0305
29	Misto	1,003	16,2	98,8	0
30	Plasmocitoide	0,1065	24,9	94,8	0
31	Plasmocitoide	0,25	15,4	95	0
32	Plasmocitoide	0,181	10,4	99,7	0
33	Plasmocitoide	0,063	0,973	99,8	0,0235
34	Misto	0	0,696	99,9	0,007
35	Plasmocitoide	0,161	8,52	99,5	0,009
36	Plasmocitoide	0,027	2,95	99,5	0,009
37	Plasmocitoide	0,0145	5,96	97	0,0025
38	Plasmocitoide	0,082	25,6	87	0

Apêndice Q

Dados descritivos

Quadro 4 – Número do caso e expressões relativas dos genes CD90, CD44, CD133 e CD34 por RT-PCR em 28 pacientes.

Caso	CD90⁺	CD133⁺	CD44⁺	CD34⁺
1	NE	NE	NE	NE
2	NE	NE	NE	NE
3	NE	NE	NE	NE
4	96,89	2,64	878,10	4,04
5	NE	NE	NE	NE
6	12,07	0,72	225,70	0,44
7	24,86	7,29	203,10	1,34
8	47,70	0,39	86,57	0,99
9	2,64	0,07	43,51	0,03
10	14,30	0,59	243,60	0,22
11	19,57	0,25	103,70	0,21
12	21,23	1,17	377,00	0,20
13	36,91	1,91	704,70	0,50
14	25,83	0,23	10,78	1,39
15	NE	NE	NE	NE
16	23,00	0,05	146,90	0,76
17	29,56	0,71	292,20	0,56
18	16,95	0,21	610,30	0,11
19	21,42	0,16	178,00	0,20
20	NE	NE	NE	NE
21	NE	NE	NE	NE
22	23,48	0,57	591,50	0,20
23	79,80	2,03	651,80	0,63
24	NE	NE	NE	NE
25	34,08	2,1	707,1	0,98
26	17,79	1,23	454,50	0,75
27	NE	NE	NE	NE
28	28,16	1,25	366,00	0,25
29	17,61	0,28	73,18	0,31
30	4,39	0,15	119,70	0,17
31	9,60	0,06	193,10	0,18
32	8,70	0,05	55,75	0,32
33	NE	NE	NE	NE
34	26,32	0,36	235,30	0,33
35	21,42	0,43	315,30	0,25
36	6,38	0,12	207,00	0,26
37	22,56	0,14	166,70	0,27
38	21,57	1,52	203,10	0,54

NE, não existente.

Apêndice R Dados descritivos

Quadro 5 – Número do caso, escores imuno-histoquímicos CD44 e CD34, Ki-67 (H-Score), caspase-3 clivada e índice mitótico em 38 pacientes.

Caso	CD44	CD34	H-Score (Ki-67)	Caspase-3 clivada	Índice mitótico
1	4	0	99,46524	5	2
2	3	0	141,0256	7	18
3	1	0	101,7937	8	7
4	2	0	189,5317	6	13
5	2	0	119	5	9
6	2	0	182,125	6	3
7	2	0	83,1578	11	9
8	4	0	95,84569	4	9
9	3	0	167,5277	13	14
10	3	0	123,7726	7	11
11	1	0	83,56	8	9
12	1	0	125,365	8	5
13	8	0	198,3333	5	17
14	1	0	143,9286	10	6
15	8	0	176,94235	5	9
16	3	0	125,17	9	6
17	3	0	78,77358	7	9
18	8	0	79,356	14	14
19	6	0	93,061	7	13
20	2	0	135,514	4	12
21	8	0	239,4578	1	4
22	1	0	93,27146	3	9
23	3	0	215,6658	5	2
24	3	0	84,67742	8	15
25	2	0	203,7901	5	14
26	6	0	220,743	4	1
27	4	0	201,365	5	11
28	2	0	138,0829	6	12
29	8	0	212,4542	6	10
30	6	0	131,0458	7	11
31	12	0	155,687	6	18
32	2	0	89,564	4	8
33	8	0	134,369	7	30
34	2	0	165,99	6	21
35	1	0	157,369	14	8
36	1	0	186,366	5	5
37	4	0	96,335	6	10
38	4	0	94,3658	7	22

Apêndice S

Análise estatística. Citometria de fluxo.

Tabela 1 - Testes de normalidade de Shapiro-Wilk em 38 amostras de tumor venéreo transmissível submetidas a análise por citometria de fluxo.

Variável	p -valor	Distribuição
CD44	3,07E-9	Não-normal
CD133	0,06E-2	Não-normal
CD90	3,22E-9	Não-normal
CD34	1,60E-10	Não-normal

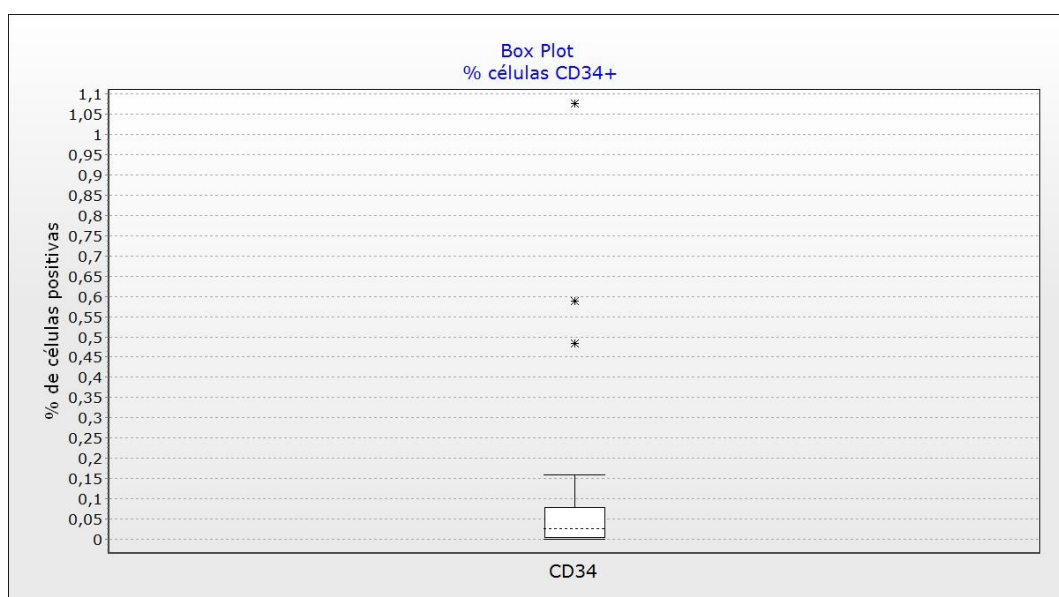
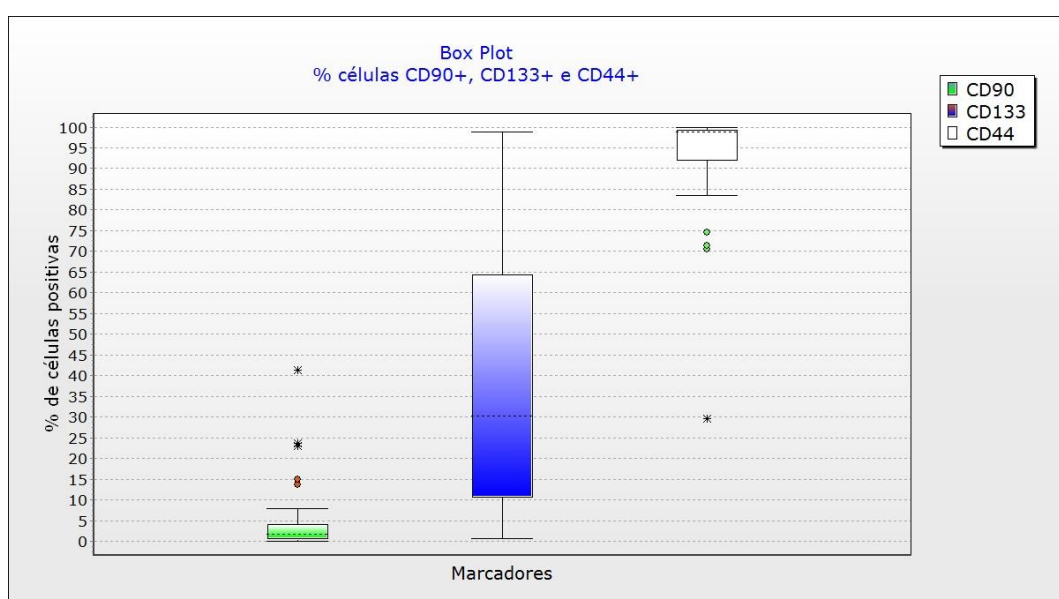
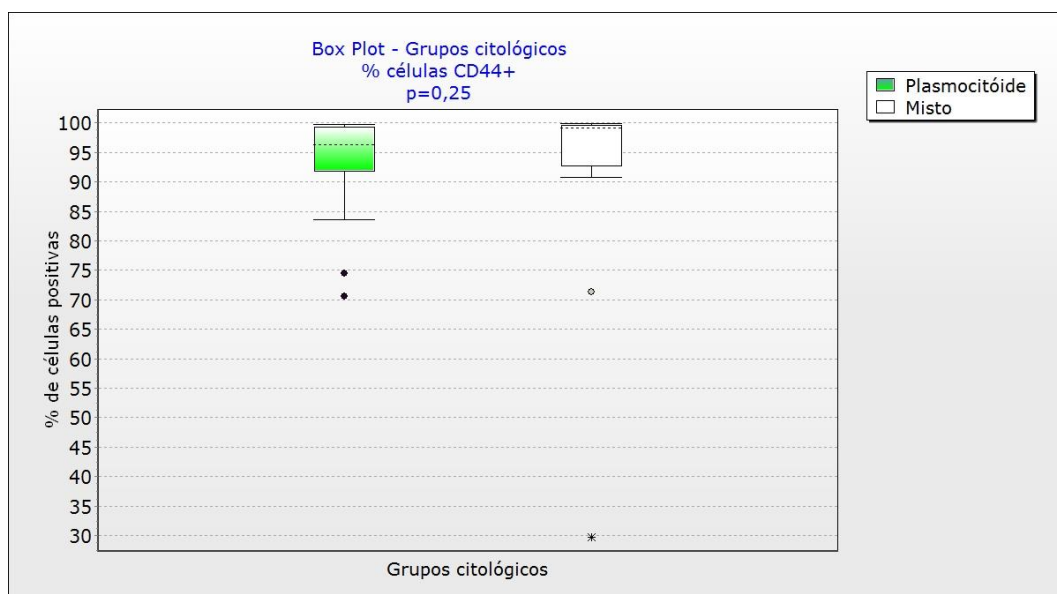
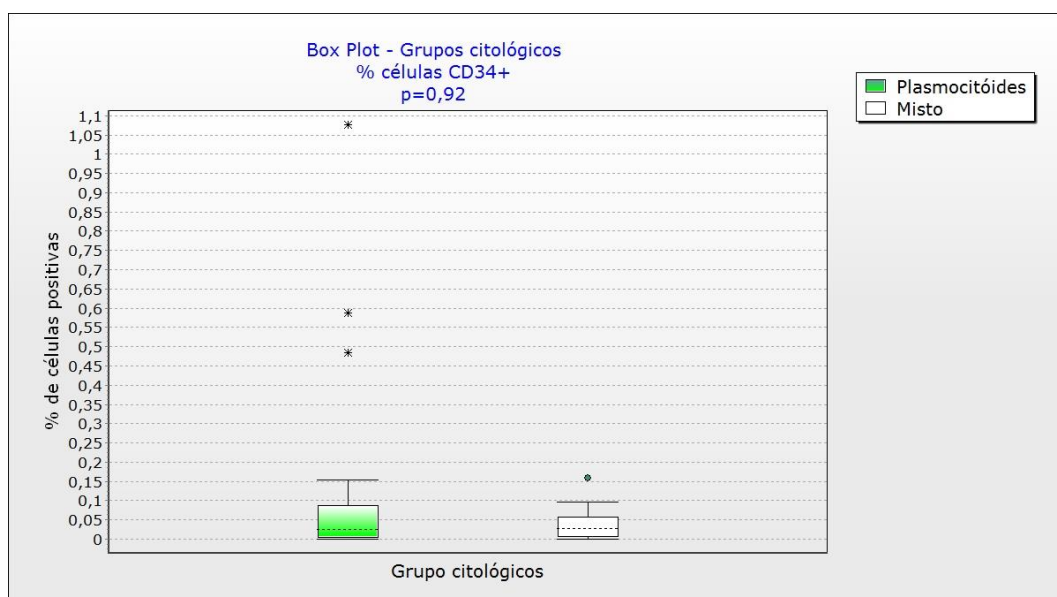


Tabela 2 - Padrão de distribuição dos dados e diferenças no percentual de células positivas entre os grupos citológicos de 38 amostras de tumor venéreo transmissível canino submetidos a análise por citometria de fluxo.

Marcador	Grupo	Distribuição	p-valor ¹
CD44	Plasmocitóide	Não-normal	0,25
	Misto	Não-normal	
CD133	Plasmocitóide	Não-normal	0,19
	Misto	Não-normal	
CD90	Plasmocitóide	Não-normal	0,47
	Misto	Não-normal	
CD34	Plasmocitóide	Não-normal	0,92
	Misto	Não-normal	

¹Teste U de Mann-Whitney



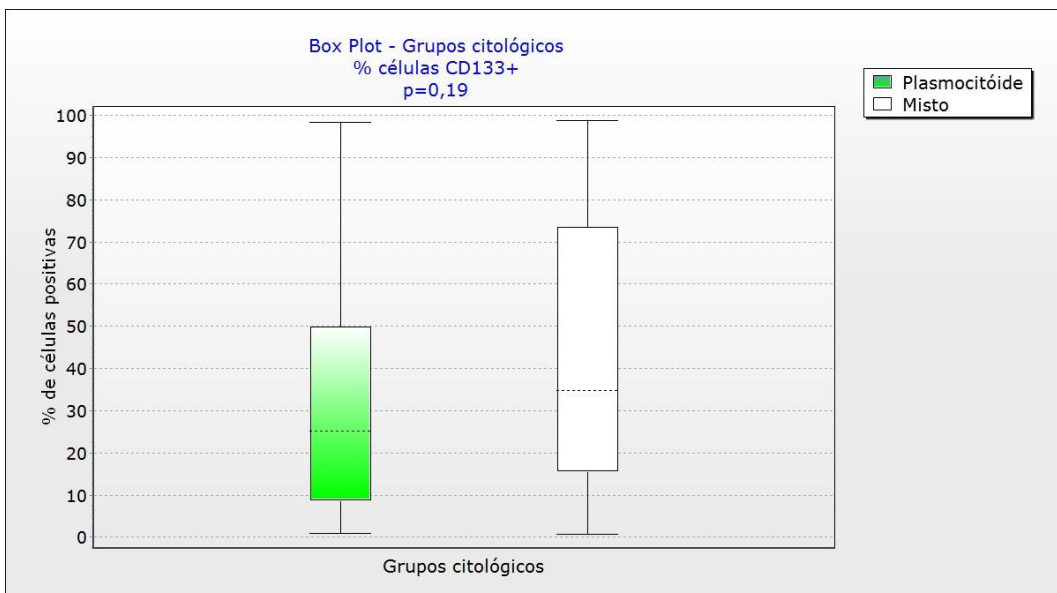
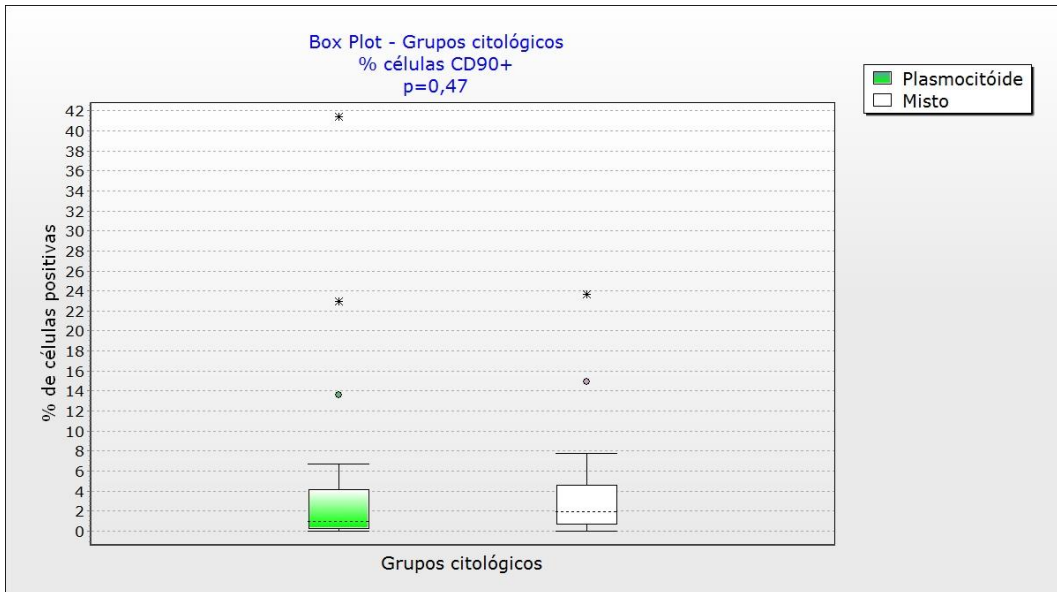


Tabela 3 - Padrão de distribuição dos dados das populações CD44^{alta} e CD44^{baixa} de 38 amostras de tumor venéreo transmissível canino submetidas a análise por citometria de fluxo.

Variável	p-valor	Distribuição
CD44 ^{alta}	0,97	Normal
CD44 ^{baixa}	0,02E-2	Não-normal

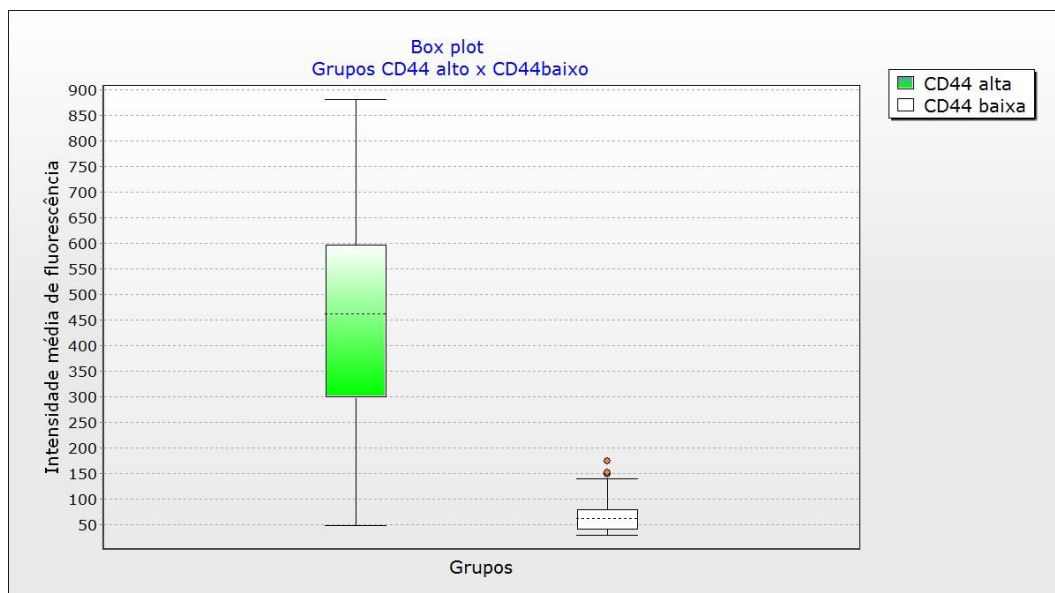
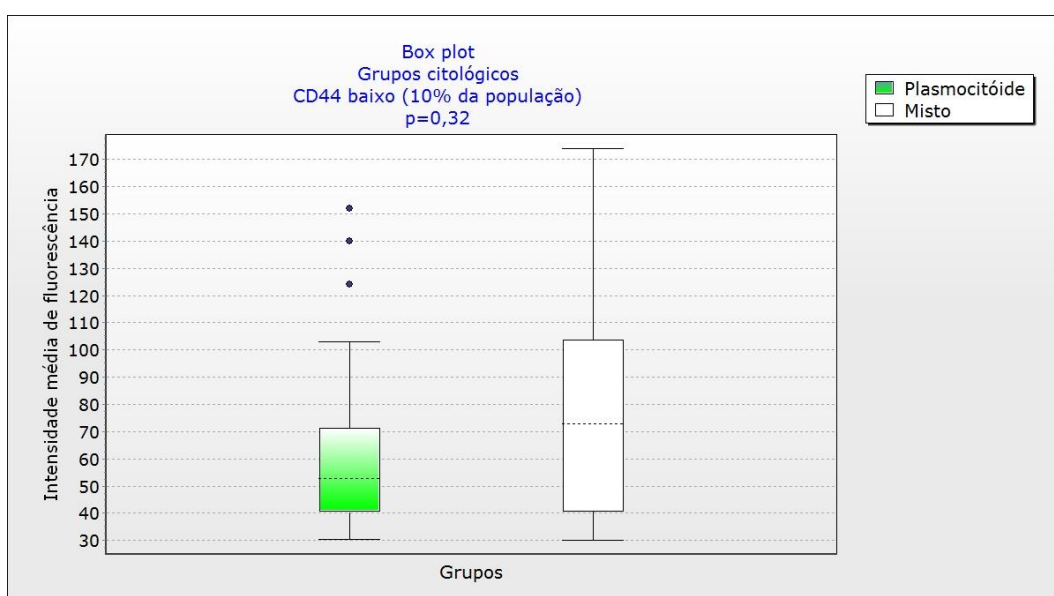
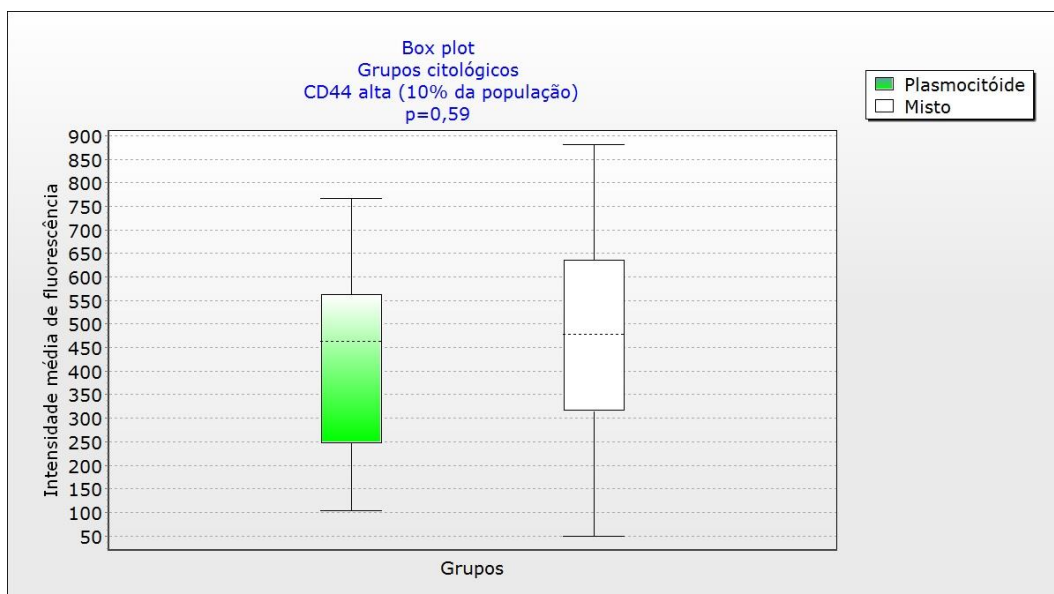


Tabela 4 - Padrão de distribuição dos dados e diferenças entre os grupos citológicos em relação aos 10% da população com maior e menor intensidade média de fluorescência de 38 amostras de tumor venéreo transmissível canino submetidos a análise por citometria de fluxo.

Marcador	Grupo	Distribuição	p-valor
CD44 ^{alta}	Plasmocitóide	Normal	0,59 ¹
	Misto	Normal	
CD44 ^{baixa}	Plasmocitóide	Não-normal	0,32
	Misto	Normal	

¹Teste t de Student

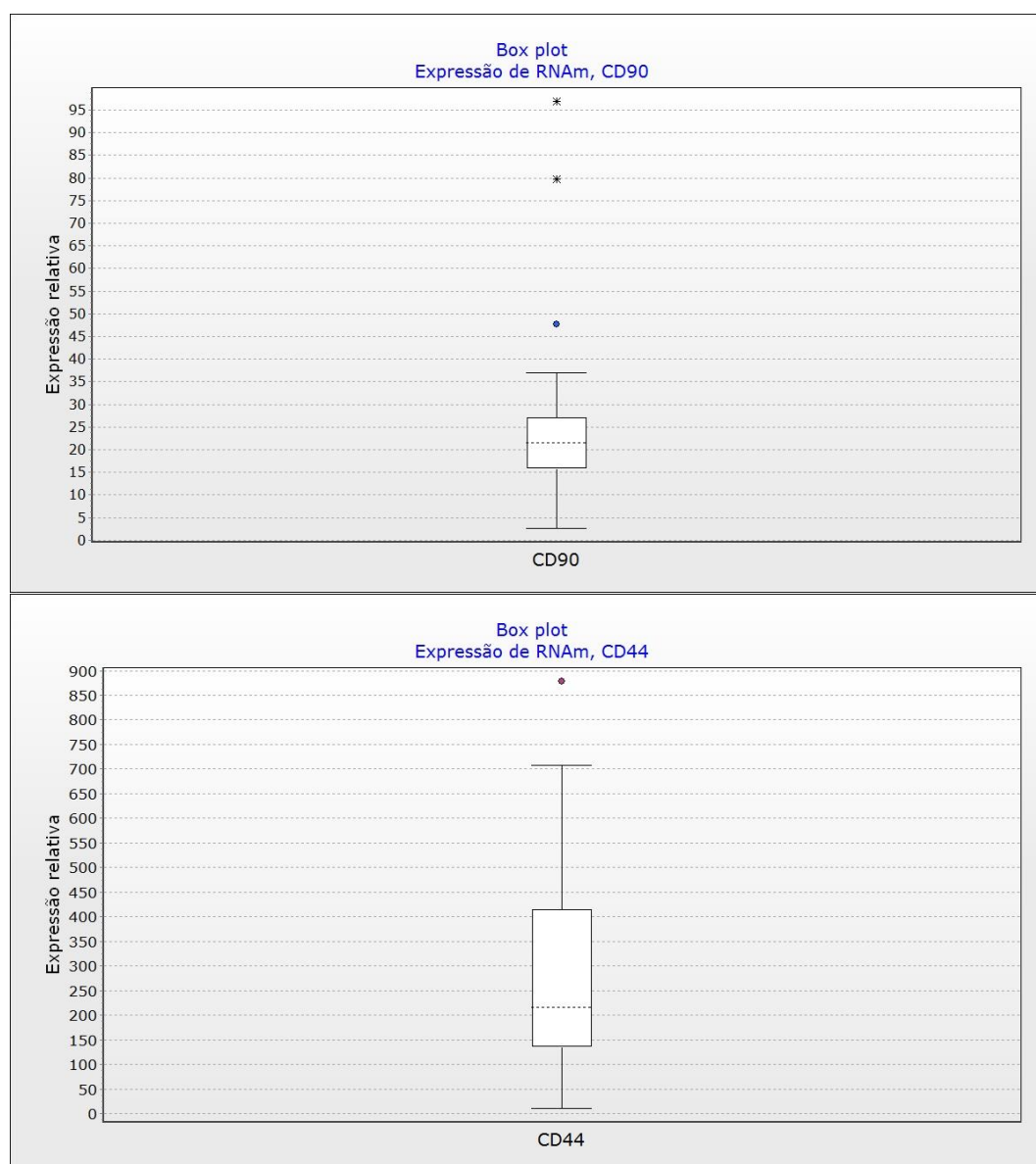


Apêndice T

Análise estatística. RTq-PCR.

Tabela 5 - Testes de normalidade de Shapiro-Wilk em 28 amostras de tumor venéreo transmissível submetidos a análise por qRT-PCR.

Variável	p -valor	Distribuição
CD44	0,005	Não-normal
CD133	1,63E-7	Não-normal
CD90	1,4E-5	Não-normal
CD34	7,14E-8	Não-normal



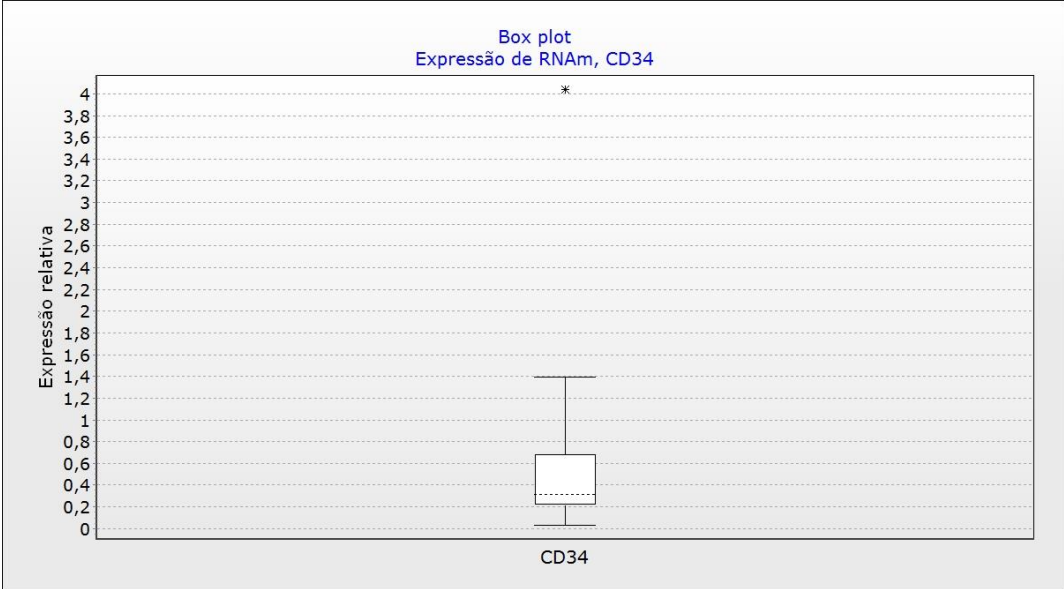
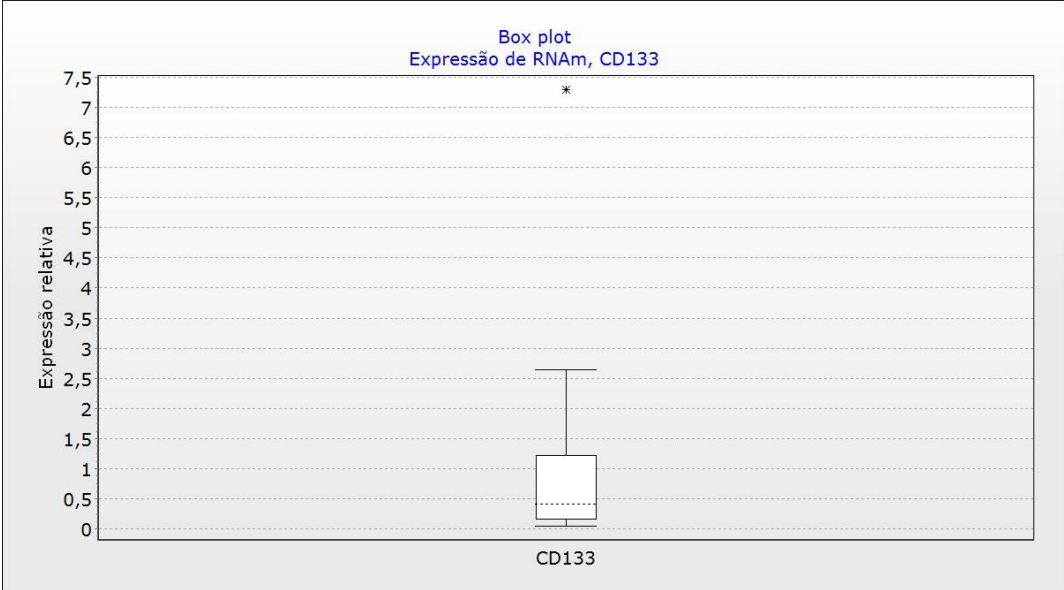
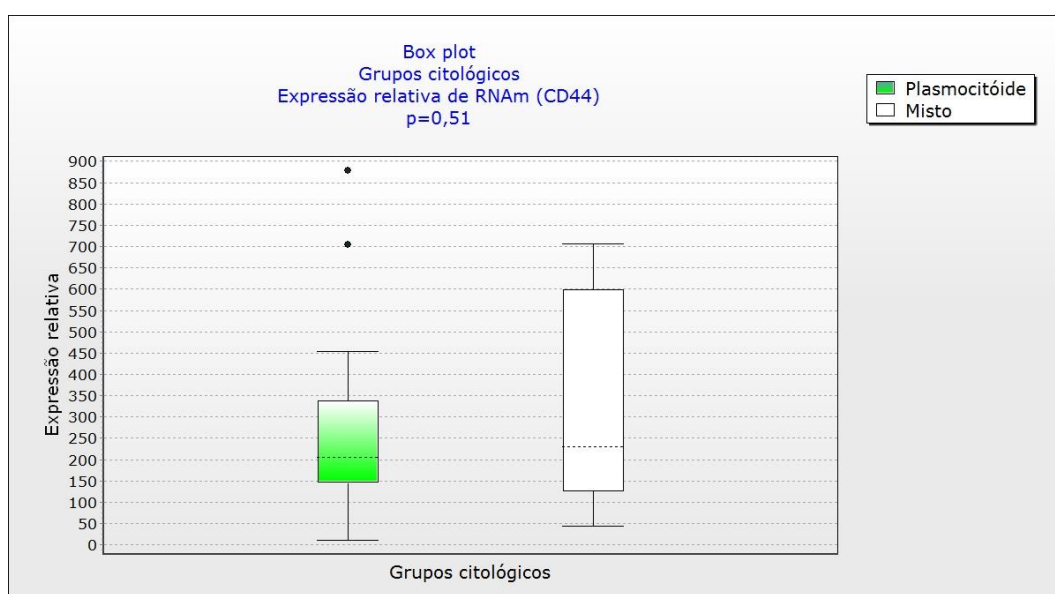
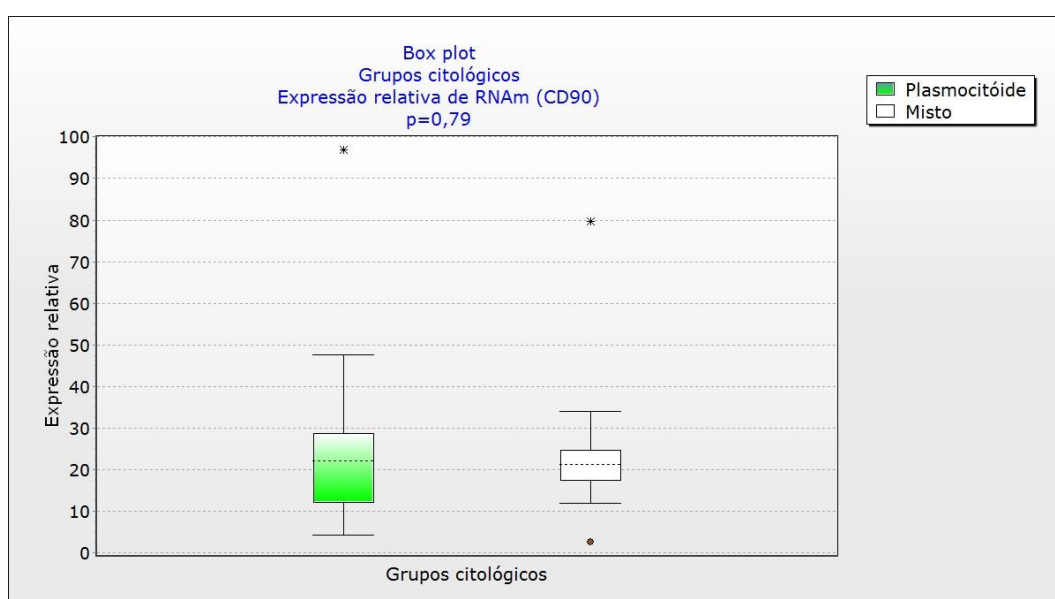
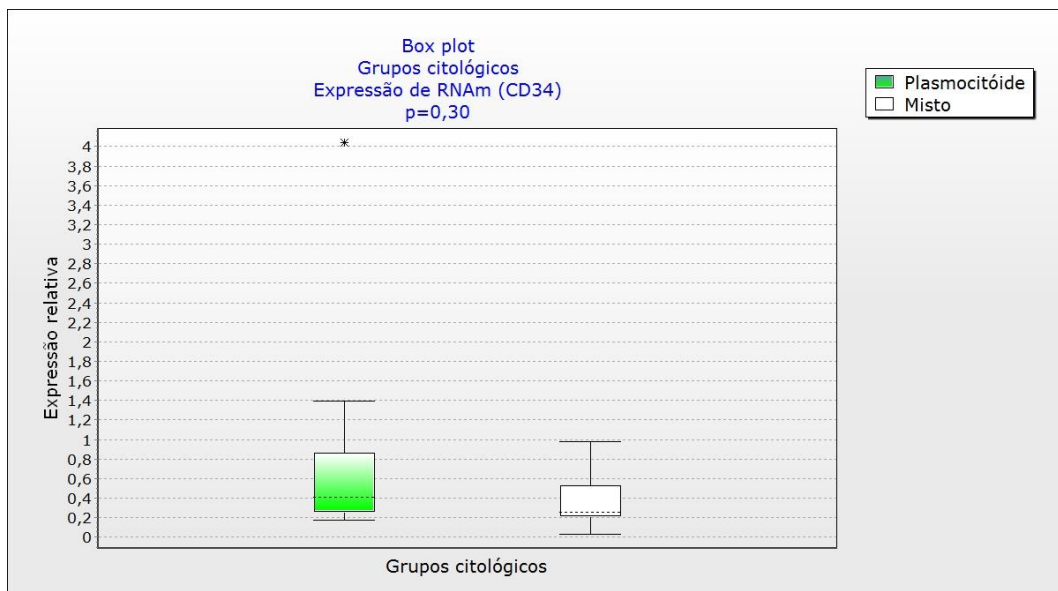
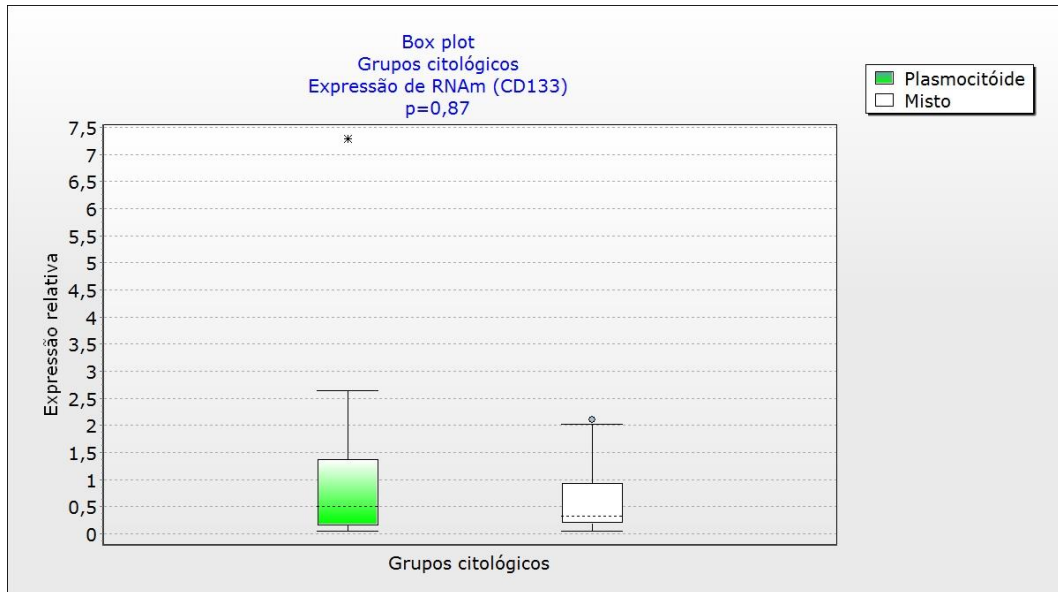


Tabela 6 - Padrão de distribuição dos dados e diferenças na expressão de RNAm nos grupos plasmocitóide e misto em 28 amostras de tumor venéreo transmissível canino submetidos a análise por qRT-PCR.

Marcador	Grupo	Distribuição	p -valor ¹
CD44	Plasmocitóide	Não-normal	0,51
	Misto	Não-normal	
CD133	Plasmocitóide	Não-normal	0,87
	Misto	Não-normal	
CD90	Plasmocitóide	Não-normal	0,79
	Misto	Não-normal	
CD34	Plasmocitóide	Não-normal	0,30
	Misto	Não-normal	

¹Teste U de Mann-Whitney





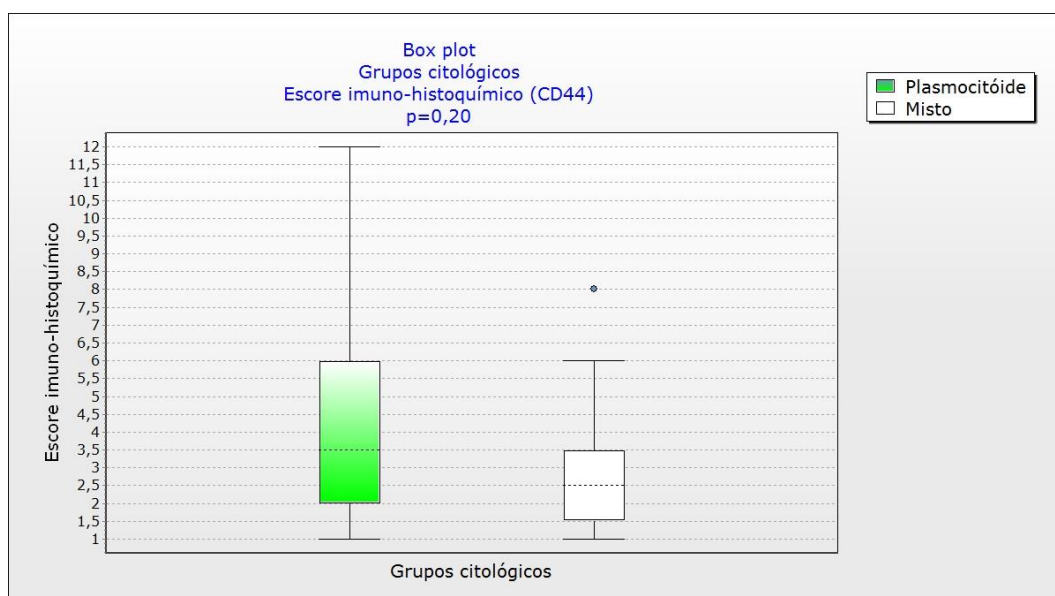
Apêndice U

Análise estatística. Escore imuno-histoquímico.

Tabela 7 - Diferença no escore imuno-histoquímico entre os grupos plasmocitóide e misto em 28 amostras de tumor venéreo transmissível submetidos a análise imuno-histoquímica.

Marcador	Grupo	Distribuição	p -valor ¹
CD44	Plasmocitóide	Não-normal	0,20
	Misto	Não-normal	

¹Teste U de Mann-Whitney



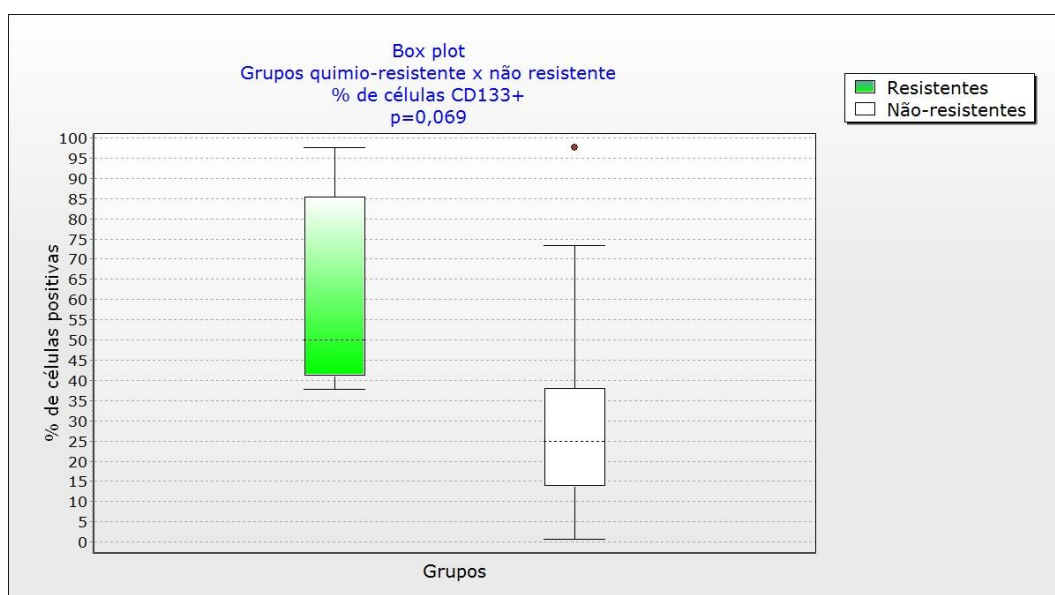
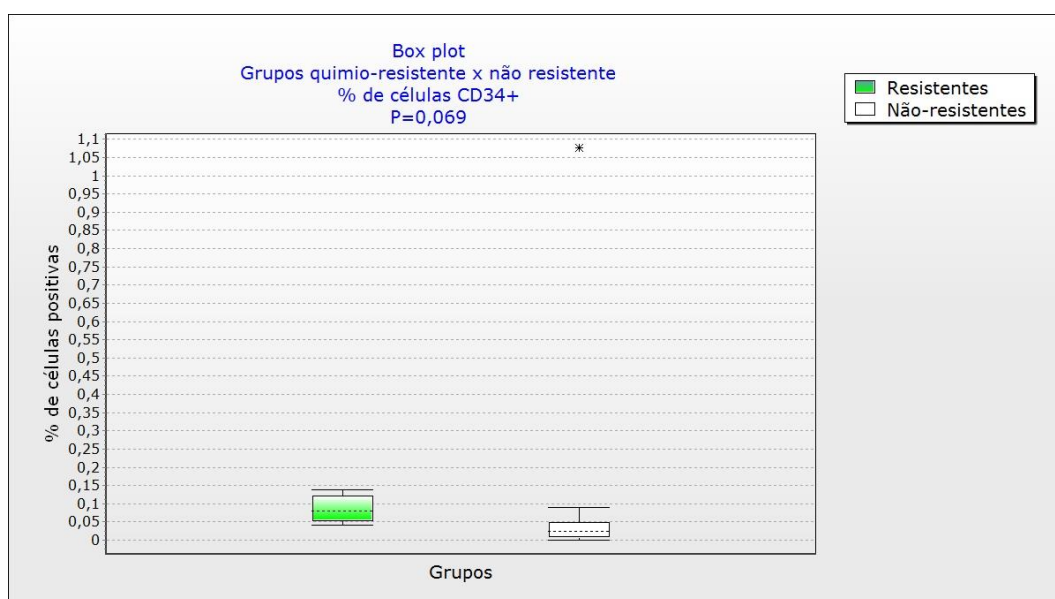
Apêndice V

Análise estatística. Grupos resistente x não resistente

Tabela 8 - Diferença entre os grupos quimio-resistente e não resistente em 16 pacientes com seguimento clínico completo no quesito expressão de CD133 e CD34 por citometria de fluxo.

Marcador	Grupo	Distribuição	p-valor ¹
CD34	Resistente	Não-normal	0,069
	Não-resistente	Não-normal	
CD133	Resistente	Não-normal	0,069
	Não-resistente	Não-normal	

¹Teste U de Mann-Whitney



Apêndice X

Análise estatística. Correlações.

Tabela 9 - Graus de correlação entre os marcadores em 38 pacientes com tumor venéreo transmissível submetidos a análise por citometria de fluxo.

Marcador	Rô	Grau de correlação	<i>p</i> -valor ¹
CD133 x CD90	0,72	Forte	<0,01
CD133 x CD34	0,42	Moderada	0,008

¹Coefficiente de correlação Rô de Spearman

Tabela 10 - Grau de correlação entre os marcadores em 28 pacientes com tumor venéreo transmissível submetidos a análise por RT-PCR.

Marcador	Rô	Grau de correlação	<i>p</i> -valor ¹
CD133 x CD90	0,62	Forte	<0,01

¹Coefficiente de correlação Rô de Spearman

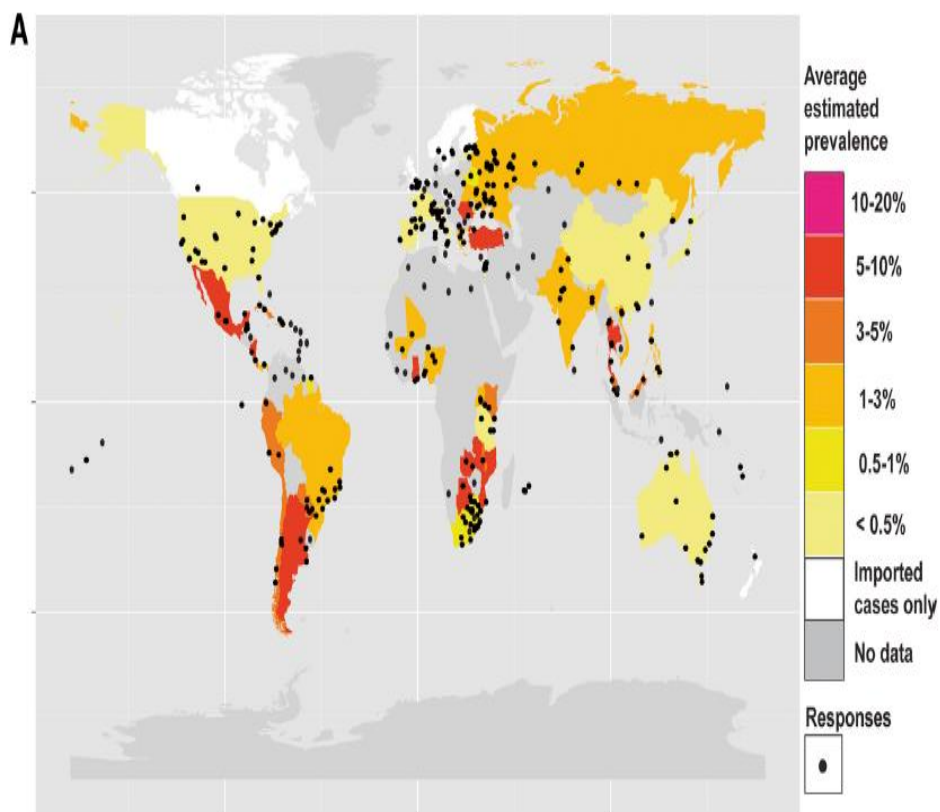
Tabela 11 - Grau de correlação entre a RT-PCR e a citometria de fluxo em 28 pacientes com tumor venéreo transmissível..

Marcador	Rô	Grau de correlação	<i>p</i> -valor ¹
CD133	0,52	Moderado	0,03
CD90	0,61	Forte	0,01
CD34	0,5	Moderado	0,04

¹Coefficiente de correlação Rô de Spearman

Anexo A

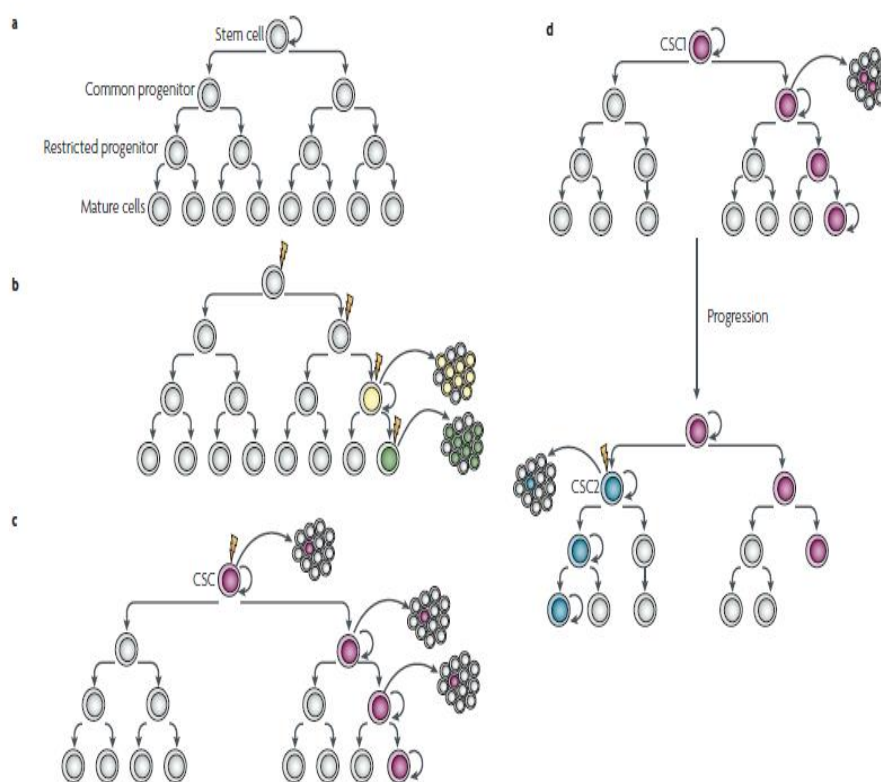
Desenho 1 – Distribuição mundial do TVT. A cor utilizada em cada país representa a média das estimativas das prevalências obtidas no país. A localização de cada resposta é indicada pelo ponto negro. Em cinza: países com menos de 3 respostas (censurados do estudo).



Fonte: Strakova A, Murchison EP. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. BMC Vet Res [Internet]. 2014;10(1):168.

Anexo B

Desenho 2 – Modelos de heterogeneidade e propagação tumoral



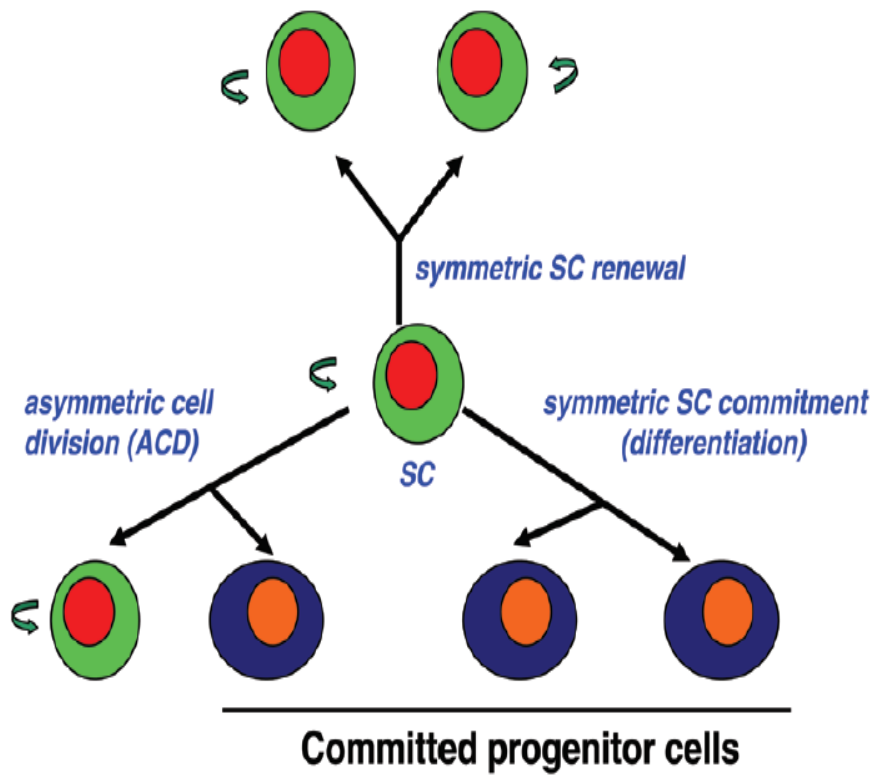
Fonte:Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(10):755–68.

- Hierarquia celular normal. As células tronco (no ápice) originam as células progenitoras com potencial mais restrito, e subsequentemente as células maduras componentes de tecidos específicos.
- Modelo de evolução clonal do câncer. Todas as células indiferenciadas apresentam capacidade tumorigênica similar.
- Modelo das células tronco tumorais. Apenas as células tronco tumorais são tumorigênicas com base nas propriedades de auto-renovação e alto potencial proliferativo.
- Ambos modelos podem representar o processo de tumorigênese. No início, o crescimento tumoral é determinado por uma população específica de células tronco tumorais (CSC1). A progressão tumoral permite o surgimento, mediante evolução clonal, de uma segunda população (CSC2) com propriedades similares, resultante da aquisição de mutações adicionais ou modificação epigenética. A população CSC2, mais agressiva, torna-se dominante e governa a tumorigênese.

Stem cell, célula-tronco; common progenitor, progenitor comum; restricted progenitor, progenitor restrito; mature cells, células maduras; CSC1, célula tronco-tumoral 1; CSC2, célula tronco-tumoral 2; CSC, célula-tronco tumoral; progression, progressão.

Anexo C

Desenho 3 – Padrões de divisão das células-tronco.

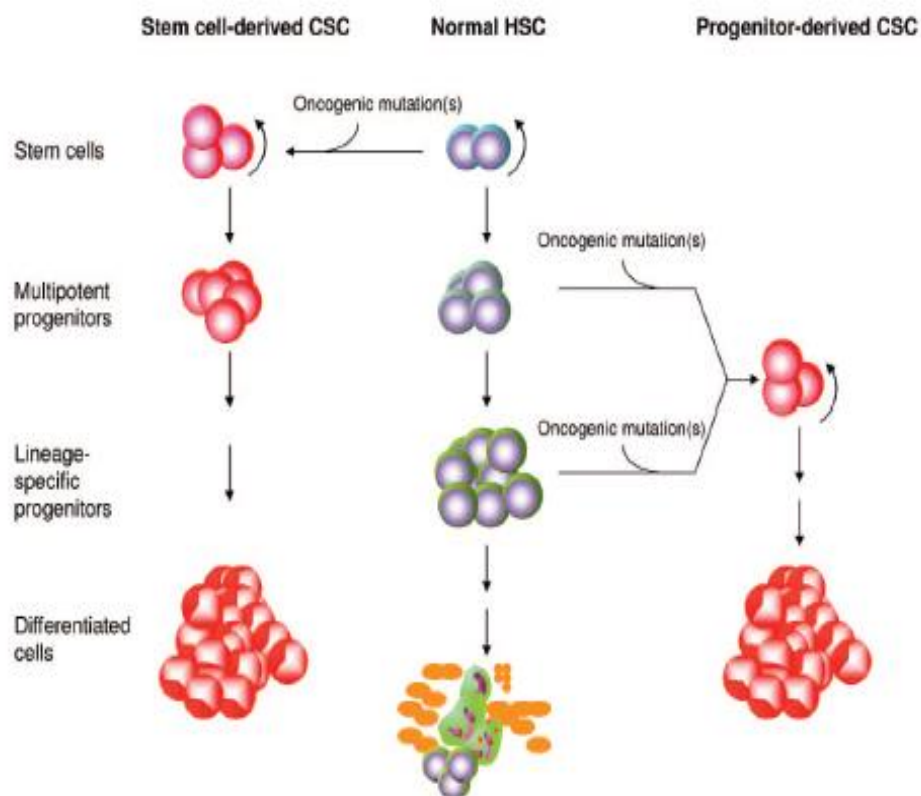


Fonte: Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. Cell Res. 2012; 22 (3): 457–72

SC, célula-tronco; Symmetric SC renewal. Renovação simétrica das células-tronco; asymmetric cell division (ACD), divisão celular assimétrica (DCA); symmetric SC commitment (differentiation), comprometimento simétrico das células-tronco (diferenciação); committed progenitor cells, células progenitoras comprometidas.

Anexo D

Desenho 4 – Origem das células tronco-tumorais e pontos de mutação oncogênica

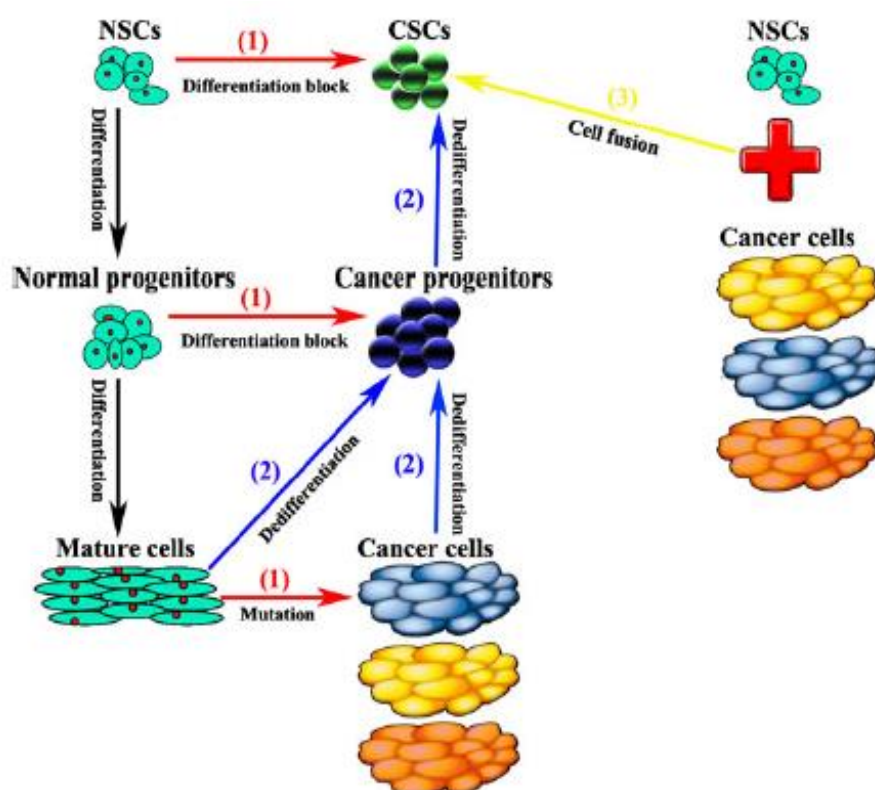


Fonte: Guo W, Lasky JL, Wu H. Cancer stem cells. *Pediatr Res.* 2006; 59 (4 Pt 2): 59R – 64R.

Stem cell-derived CSC, células-tronco tumorais derivadas de células-tronco; normal HSC, células-tronco hematopoiéticas normais; progenitor-derived CSC, célula-tronco tumorais derivada de célula progenitora; stem cells, células-tronco; oncogenic mutation(s), mutação oncogênica; multipotent progenitors, progenitores multipotentes; lineage-specific progenitors, progenitores linhagem-específicos; differentiated cells, células diferenciadas.

Anexo E

Desenho 5 – Teoria de origem das células iniciadoras tumorais



Fonte: Liu W-H, You N, Zhang N, Yan H-T, Wang T, Huang Z, et al. Interpretation of interlocking key issues of cancer stem cells in malignant solid tumors. *Cell Oncol (Dordr)*. 2012;35 (6):397–409.

NSC, células-tronco normais; normal progenitors, progenitores normais; mature cells, células maduras; differentiation, diferenciação; CSC, célula-tronco tumoral; cancer progenitors, progenitores do câncer; cancer cells, células do câncer; dedifferentiation, des-diferenciação; cell fusion, fusão celular; differentiation block, bloqueio da diferenciação; mutation, mutação;

Anexo F

Quadro 6 - Comparações entre as características das células tronco adultas normais (CTA) e iniciadoras tumorais (CIT).

Características	CTA	CTT
Replicação	Potencial extenso	Potencial extensor
Diferenciação	Todas linhagens tecido específico	Todas linhagens do tumor original
Atividade metabólica	Baixa	Desconhecida
Vias de sinalização	Hedghog, Wnt, Notch, BMP	Regulação aberrante de Hedgehog, Wnt, Notch, BMP e outras
Regulação do ciclo celular	Ciclagem baixa, estritamente regulada	Ciclagem potencialmente baixa, desconhecida
Localização	Compartimentos específicos	Desconhecido
Adesão	Adesão forte	Desconhecido
Migração	Baixa ou ausente	Características epiteliais-mesenquimais

Fonte: Moore N, Lyle S. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. J Oncol [Internet]. 2011; 2011: 1–11.