

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

**“Evaluación del efecto del Stem Cell Factor en el potencial
metastásico de células de cáncer de próstata”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

ALEJANDRO JIMÉNEZ SÁNCHEZ

TUTORA

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

MÉXICO, D.F.

MARZO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE	Página
Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
Abreviaturas	6
Resumen	9
1.- Introducción	10
1.1.-Cáncer	10
1.2.- Metástasis	12
1.3.- Cáncer de Próstata	16
1.4.- Stem Cell Factor	29
1.5.- c-Kit	32
1.6.- Stem Cell Factor y c-Kit en el Cáncer	41
1.7.- Stem Cell Factor y c-Kit en el Cáncer de Próstata	44
2.- Hipótesis	52
3.- Objetivos	52
3.1.- Objetivo General	52
3.2.- Objetivos Particulares	52
4.- Material y Métodos	53
4.1.- Cultivos celulares	53
4.2.- Análisis de la expresión de c-Kit por RT-PCR	53
4.3.- Análisis de la expresión de c-Kit por Western blot	54
4.4.- Análisis de la expresión de c-Kit por citometría de flujo	54
4.5.- Ensayos de proliferación <i>in vitro</i>	55
4.6.- Análisis por citometría de flujo de células estimuladas con SCF	55
4.7.- Ensayos de migración <i>in vitro</i>	55
4.8.- Ensayos de supervivencia <i>in vitro</i>	56
4.9.- Ensayos de crecimiento independiente de anclaje	56

4.10.- Análisis estadístico	57
5.- Resultados	58
5.1.- Expresión de c-Kit en células de cáncer de próstata	58
5.2.- Efecto del SCF sobre la proliferación de células de cáncer de próstata	59
5.3.- Efecto del SCF sobre la migración de células de cáncer de próstata	63
5.4.- Efecto del SCF sobre la muerte por falta de nutrientes en células de cáncer de próstata	66
5.5.- Efecto del SCF sobre el crecimiento independiente de anclaje de células de cáncer de próstata	67
6.- Discusión	71
7.- Conclusiones	84
8.- Perspectivas	84
9.- Referencias	85

Índice de Figuras

Figura	Título	Página
1	Pasos del proceso de metástasis	13
2	Principales causas de muerte en E.U.A. desde 1900 hasta el 2010	14
3	Esquema de la próstata y su ubicación	17
4	Esquema de la próstata dividida en zonas	18
5	Esquema de la próstata y de los estadios de desarrollo del cáncer de próstata	22
6	Esquema de la médula ósea	27
7	Esquema del proceso metastásico en la médula ósea	28
8	Representación esquemática del “splicing” alternativo del ARNm y el procesamiento del SCF	30
9	Modelo del homodímero de SCF	32
10	Representación de la correspondencia entre los exones del ARNm de c-Kit y su contraparte en la estructura proteica de c-Kit	33
11	Representación esquemática de los dominios estructurales de c-Kit	35
12	Representación esquemática del mecanismo de activación de c-Kit inducido por la unión con el SCF	37
13	Esquema de la estructura molecular de c-Kit en su forma inactiva y activa unida al SCF	38
14	Esquema de las vías de señalización activadas por la dimerización de c-Kit inducida por el SCF	40
15	Esquema del efecto de la abundancia y distribución de c-Kit en la superficie celular	44
16	Modelo de los tipos celulares que conforman y mantienen el parénquima de la próstata	45
17	Representación de los dominios estructurales de c-Kit y tr-Kit	48
18	Análisis de la expresión de c-Kit en células de cáncer de próstata	58
19	Análisis de la expresión de c-Kit en la membrana citoplasmática de células de cáncer de próstata	59
20	Efecto del SCF sobre la proliferación de células de cáncer de próstata	60

21	Cinética de crecimiento de células de cáncer de próstata estimuladas con SCF	61
22	Efecto del SCF sobre la expresión de c-Kit en células de cáncer de próstata	62
23	Efecto del SCF sobre la migración de células de cáncer de próstata evaluado por colorimetría	64
24	Efecto del SCF sobre la migración de células de cáncer de próstata evaluado por microscopía de fluorescencia	65
25	Efecto del SCF sobre la muerte inducida por falta de nutrientes en células de cáncer de próstata	67
26	Efecto del SCF sobre el crecimiento independiente de anclaje de células de cáncer de próstata	68
27	Análisis de la expresión de c-Kit en células de cáncer de próstata con capacidad de crecer de manera independiente al anclaje	70

Índice de Tablas

Tabla	Título	Página
1	Principales causas de muerte en el mundo en el año 2004	11
2	Predisposición de cada tejido a desarrollar cáncer de próstata según la zona prostática	19
3	Patrones Gleason evaluados en el cáncer de próstata	20
4	Frecuencias de expresión del SCF y c-Kit en tejido epitelial prostático analizado por inmunohistoquímica	50

Abreviaturas

ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
Akt	El nombre Akt no es abreviatura y no hace referencia a la función de la proteína
ANOVA	Analysis of variance
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Bad	Bcl-2-associated death promoter
ATP	Adenosin trifosfato
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Blk	B lymphoid tyrosine kinase
Btk	Bruton's tyrosine kinase
CBL	Casitas B-lineage lymphoma
CD44	Cluster of differentiation 44
c-Kit	Receptor del SCF
COOH-terminal	Carboxilo terminal
CRKL	CT10 regulator of kinase – like
CT10	Chicken tumour virus no. 10
CTH	Célula troncal hematopoyética
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases
Fgr	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
Foxo	Forkhead box
Fyn	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
GAB2	GRB2-associated-binding protein 2

GDP	Guanosine diphosphate
GIST	Gastrointestinal stromal tumor
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosine triphosphate
Hck	Hemopoietic cell kinase
HPB	Hiperplasia prostática benigna
I	Inserto de cinasas
Ig	Inmunoglobulina
JAK	Janus kinase
K1	Subdominio de cinasas 1
K2	Subdominio de cinasas 2
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
Lyn	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK kinases
MAPKKK	MAPKK kinases
mTor	Mammalian target of rapamycin
Nanog	No es una abreviación, es un nombre propio
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OB	Osteoblasto
Oct3/4	Octamer-binding transcription factor
P	Fosfato
p38	p38 MAP kinase
PET	Polyethylene terephthalate
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLC γ	Phospholipase C γ
PSA	Prostate-specific antigen
RAF	Rapidly accelerated fibroblastoma

RAS	Rat sarcoma
RTK	Receptor tyrosine kinase
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCF	Stem Cell Factor
SCID	Severe combined immunodeficiency
SCFm	Stem Cell Factor membranal
SDF-1	Stromal cell derived factor 1
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SH2	Src homology 2
SHC	SH2-domain-containing transforming protein C
SHIP	SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase
SHP	SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase
SOS	Son of sevenless homologue
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TEC	Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma
TM	Dominio transmembranal
TNF	Tumour necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
tr-Kit	Versión trunca de c-Kit
Tyr	Tirosina
VIH/SIDA	Virus de inmunodeficiencia humana / Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Yes	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1

Resumen

El cáncer de próstata es el tipo tumoral más común en hombres a nivel mundial. Cuando el tumor prostático alcanza el grado de metástasis, el 90% de las veces se desarrolla en la médula ósea. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de los mecanismos involucrados en el establecimiento y crecimiento de células tumorales en la médula ósea.

Dentro del grupo de moléculas presentes en el microambiente de la médula ósea se encuentra el Stem Cell Factor (SCF). El SCF es expresado constitutivamente por las células del estroma medular y también se encuentra en el torrente sanguíneo. Además, se sabe que el SCF promueve la proliferación, protección contra la apoptosis y migración de células en la médula ósea del adulto mediante la activación de su receptor llamado c-Kit. Por otra parte, la expresión de c-Kit ha sido observada en células de distintos tipos tumorales, en las que se ha demostrado que el SCF promueve su proliferación, sobrevivencia, migración y clonogenicidad. Adicionalmente, en la actualidad existen fármacos que inhiben la activación de c-Kit siendo un blanco terapéutico en algunos tipos tumorales. No obstante, la presencia de c-Kit y la implicación de su activación mediante SCF en el cáncer de próstata son aún controversiales.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del SCF en el potencial metastásico de las células de cáncer de próstata mediante aproximaciones *in vitro*. Para hacer esta evaluación, usamos como modelo dos líneas celulares humanas de cáncer de próstata, una metástasis en cerebro (DU145) y la otra metástasis en médula ósea (PC3). Inicialmente analizamos la expresión de c-Kit por RT-PCR y por Western Blot. Como resultado observamos bandas correspondientes al tamaño esperado tanto para el transcrito como para la proteína en DU145 y PC3. Adicionalmente, determinamos por citometría de flujo que la proporción de células que expresa c-Kit es del 3.68% en DU145 y 0.88% en PC3.

Posteriormente, evaluamos el efecto de diferentes concentraciones de SCF sobre la proliferación, migración, sobrevivencia y crecimiento independiente de anclaje de células DU145 y PC3. Observamos que ambas líneas celulares presentaron un aumento significativo de su proliferación al ser estimuladas con SCF. Respecto a la migración no se detectó quimiotaxis hacia el SCF en ninguna de las líneas celulares. Los ensayos de sobrevivencia mostraron que el SCF protege de la muerte por falta de nutrientes a células DU145. Además se detectó que el SCF incrementa la capacidad de células PC3 de crecer de manera independiente al anclaje. Finalmente se observó por microscopía de fluorescencia que la mayoría de las células DU145 y PC3 que crecieron de manera independiente al anclaje expresan c-Kit.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que el SCF podría ser un agente potenciador de la metástasis de cáncer de próstata y que la expresión de c-Kit en estas células, podría ser un elemento importante para su desarrollo metastásico tanto en la médula ósea como en otros tejidos.

1.- Introducción

1.1.- Cáncer

Organismo multicelular, es un concepto que hace referencia a organismos constituidos de varias células procedentes de un pariente genético común (Maharbiz 2012). Estas células operan como un ecosistema o una sociedad en el organismo, donde grupos de células realizan funciones especializadas vinculadas por intrincados sistemas de comunicación. En consecuencia, podemos decir que las partículas elementales de los organismos multicelulares, son las células que los constituyen. A diferencia de organismos unicelulares, los cuales compiten para sobrevivir, las células de un organismo multicelular están comprometidas a colaborar. Este compromiso está codificado en la información genética, la cual se encuentra en cada una de las células. Sin embargo, la información genética únicamente es capaz de regir el comportamiento de la célula que la contiene, más no de dirigir la organización celular que converge en la formación y sostén del organismo multicelular (Alberts 2008). Por lo tanto, esta organización es resultado de la comunicación intercelular, la cual funciona como una red compleja de interacciones de corto y largo alcance, que resulta en el nacimiento de un sistema emergente al cual llamamos, organismo multicelular.

La dinámica existente entre los procesos intracelulares regidos por el código genético y los regulados por la red de comunicación intercelular, conlleva a la ejecución o interrupción de procesos celulares tales como – arresto, crecimiento, división, migración, diferenciación, apoptosis, entre otros – según la necesidad y conveniencia del organismo multicelular. Dicho lo anterior, alteraciones en la información genética de células que constituyen este sistema pueden provocar un fenotipo patológico en las mismas. Cuando estas alteraciones genéticas le confieren alguna ventaja adaptativa que le permita crecer, dividirse y evadir la apoptosis de forma descontrolada, esta célula puede heredar su condición a su progenie e iniciar una neoplasia. Si lo anterior ocurre repetidamente en la progenie celular, mutaciones adicionales y la competencia patológica por sobrevivir sostendrán la base sobre la cual la selección natural operará eliminando o agudizando las alteraciones adquiridas, generándose de esta manera un proceso de micro-evolución. En efecto, las células producto del proceso micro-evolutivo que tienen un crecimiento exacerbado y logran dispersarse en el organismo, amenazando la propia vida del organismo multicelular, son el inicio de lo que conocemos como cáncer (Alberts 2008).

Como cualquier otro organismo multicelular, el ser humano puede ser afectado por el cáncer. De hecho, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y la primera causa de muerte en los países desarrollados (Tabla 1) (American Cancer Society 2011). Además se estima que para el 2030, las cifras de nuevos casos de cáncer así como de muertes relacionadas al cáncer se incrementarán a más del doble de las cifras actuales, según los datos más recientes publicados por la Organización Mundial de la Salud (Mathers 2006). Por su parte, en México la principal causa de muerte se debe a las neoplasias (Organización Panamericana de la Salud 2007).

Principales Causas de Muerte a Nivel Mundial en el año 2004									
Causa	Nivel Mundial			Países en Desarrollo			Países Desarrollados		
	Posición	Muertes	%	Posición	Muertes	%	Posición	Muertes	%
Enfermedades del corazón	1	8,923,000	15.1	1	7,342,000	14.5	2	1,563,000	19.3
Neoplasias malignas	2	7,424,000	12.6	2	5,255,000	10.4	1	2,154,000	26.6
Enfermedades cerebrovasculares	3	5,712,000	9.7	3	4,949,000	9.8	3	757,000	9.4
Infecciones respiratorias	4	4,177,000	7.1	4	3,910,000	7.7	4	305,000	3.8
Afecciones perinatales*	5	3,180,000	5.4	5	3,141,000	6.2		35,000	0.4
EPOC**	6	3,025,000	5.1	6	2,737,000	5.4	5	285,000	3.5
Enfermedades diarreicas	7	2,163,000	3.7	7	2,148,000	4.2		14,000	0.2
VIH/SIDA	8	2,040,000	3.5	8	2,018,000	4.0		20,000	0.2
Tuberculosis	9	1,464,000	2.5	9	1,448,000	2.9		15,000	0.2
Accidentes de tráfico	10	1,275,000	2.2	10	1,158,000	2.3		114,000	1.4
Diabetes mellitus	11	1,141,000	1.9		914,000	1.8	7	221,000	2.7
Malaria	12	889,000	1.5		888,000	1.8		≤500	≤0.1
Suicidio	13	844,000	1.4		707,000	1.4	9	118,000	1.5
Cirrosis hepática	14	772,000	1.3		655,000	1.3	10	116,000	1.4
Nefritis y nefrosis	15	739,000	1.3		611,000	1.2	8	126,000	1.6
Todas las causas		58,772,000	100		50,582,000	100		8,095,000	100

Tabla 1 | Principales causas de muerte en el mundo en el año 2004. En la tabla se observa que el cáncer fue la segunda causa de muerte más común a nivel mundial en el año 2004, no obstante en los países desarrollados fue la primera causa de muerte en ese mismo año. *Incluye "causas originadas en el periodo perinatal" definido en la Clasificación Internacional de Enfermedades, principalmente bajo peso al nacer, nacimiento prematuro, asfisia al nacer y trauma de nacimiento. No incluye todas las causas de muerte en periodo perinatal. **Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. **Fuente:** Organización Mundial de la Salud, La carga mundial de morbilidad: actualización de 2004. (Tabla modificada de American Cancer Society 2011).

La alta prevalencia e incidencia de cáncer en el humano es consecuencia de que cualquier célula de nuestro cuerpo puede sufrir alteraciones que la hagan proclive a iniciar un cáncer. Sin embargo, en los humanos, por lo general, el desarrollo de un cáncer es lento y paulatino por lo que está directamente relacionado con la edad (Muir 1987). Se ha definido que una célula cancerosa debe tener dos propiedades heredables: (1) reproducción descontrolada, así como (2) capacidad de invadir y colonizar tejidos distintos al de origen (Hanahan 2011). En efecto, la capacidad invasiva es una característica esencial de las células cancerosas, pues es lo que les permite separarse del tejido de origen y entrar en otros tejidos. Cuando estas células ingresan al torrente sanguíneo o a los vasos linfáticos y forman tumores secundarios en otros órganos, se dice que el cáncer ha alcanzado el grado de metástasis (Alberts 2008).

1.2.- Metástasis

La metástasis es considerada la culminación de la progresión neoplásica (Eccles 2007). Además, es uno de los aspectos menos entendidos del cáncer, así como la etapa más difícil de tratar. De hecho, a pesar de las mejoras significativas en el diagnóstico, técnicas de cirugía, cuidado general del paciente y de las terapias tanto locales como sistémicas, el 90% de las muertes asociadas a cáncer se deben a la metástasis (Coghlin 2010; Fidler 2003). Por tal motivo, ha surgido la necesidad de desarrollar terapias orientadas principalmente al tratamiento de la metástasis.

Para ello, se ha conceptualizado a la invasión y metástasis como una secuencia de pasos discretos (Fidler 2003; Talmadge 2010). Esta concepción contempla una sucesión de modificaciones en la biología de las células, iniciando con la capacidad de invadir localmente otros tejidos, luego la intravasación de las células cancerosas en los vasos sanguíneos y/o linfáticos, el tránsito de las células cancerosas a través de los sistemas linfático y/o sanguíneo, seguido del escape de las células cancerosas del lumen de estos vasos hacia tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis) y finalmente la “colonización”, es decir, el crecimiento de lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos (Figura 1) (Hanahan 2011). Interesantemente, estudios en animales muestran que comúnmente menos de una célula por cada mil células cancerosas que ingresan al torrente sanguíneo, logran sobrevivir y formar una metástasis consolidada (Alberts 2002).

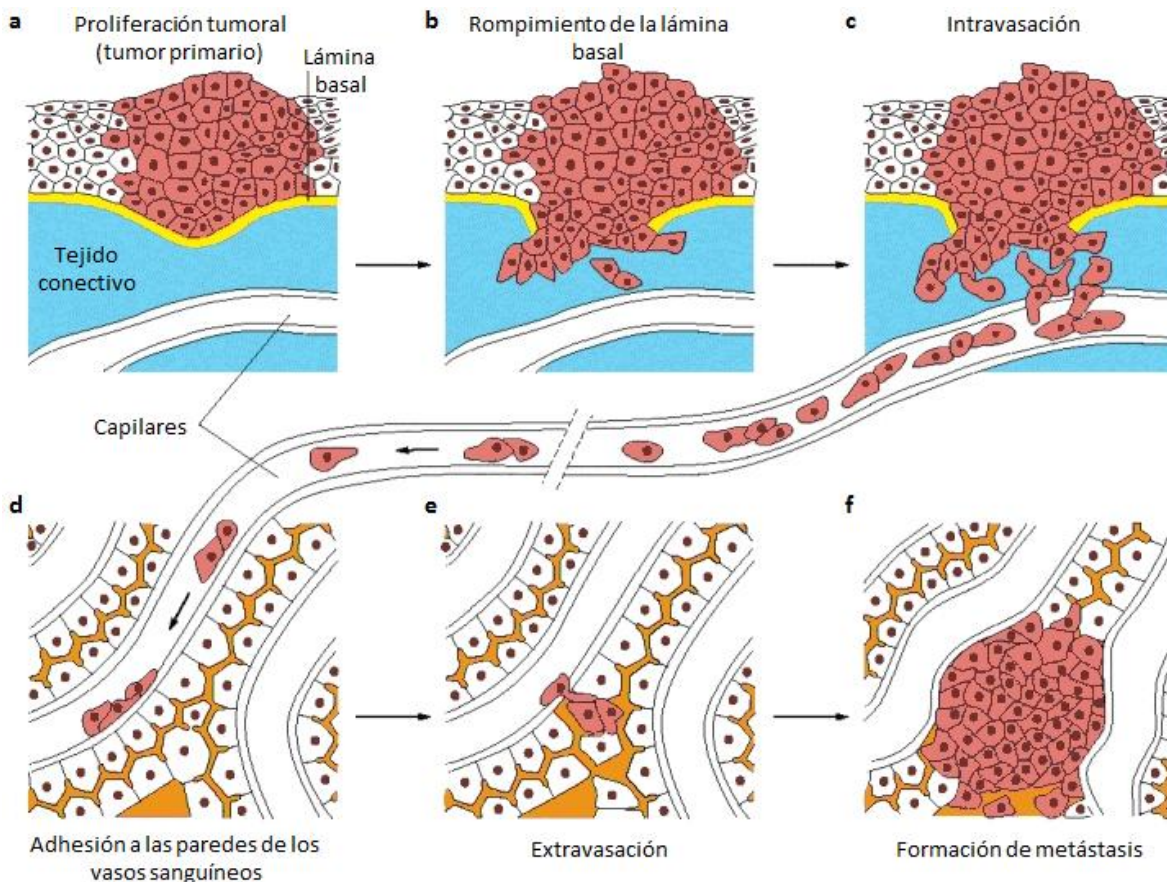


Figura 1| Pasos del proceso de metástasis. El esquema ilustra, de manera general, la diseminación de un cáncer a partir de un órgano. (a) Inicialmente las células proliferan descontroladamente formando una neoplasia. (b) Después algunas células cancerosas logran atravesar la lámina basal e invadir el tejido conectivo. (c) Algunas de estas células logran entrar al torrente sanguíneo directamente atravesando la pared del vaso sanguíneo o logran entrar a la linfa atravesando la pared de un vaso linfático. Las células cancerosas que entran a la linfa frecuentemente quedan atrapadas en nódulos linfáticos a lo largo del sistema linfático, dando lugar a metástasis en dichos nódulos. (d) En el sistema circulatorio, algunas células cancerosas se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos. (e) Estas células se extravasán invadiendo otros órganos. (f) Finalmente, algunas células siguen proliferando y forman la metástasis. (Figura modificada de Alberts 2002).

A lo largo de la historia, se han usado diferentes tratamientos contra la metástasis, como la radiación, la quimioterapia citotóxica, y más recientemente los fármacos biodirigidos y la inmunoterapia. Sin embargo, en este tiempo se ha constatado que el uso de monoterapias no es óptimo, ya que resulta en el desarrollo de resistencia por parte de las células cancerosas. Por ello se han combinado los esquemas terapéuticos para tratar de contrarrestar, o al menos limitar el desarrollo de resistencia (Holohan 2013). No obstante, para que exista esta posibilidad es primordial abastecer de nuevas terapias que permitan la combinación racional de fármacos. Por ejemplo, estadísticas de los Estados Unidos de Norte América muestran que, comparado con otras

enfermedades, el número de muertes causadas por cáncer en ese país se había venido incrementando de manera sostenida durante gran parte del siglo XX; sin embargo, es hasta la primera década del siglo XXI que se observa una ligera disminución en la tasa de mortalidad causada por cáncer. En esa misma década, el progreso obtenido del estudio de los mecanismos moleculares de las células cancerosas, permitió el desarrollo e introducción de fármacos biodirigidos basados en la inhibición de mecanismos blanco en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Por lo que se puede suponer que la combinación de terapias biodirigidas, citotóxicas, hormonales e inmunológicas, junto con el estudio de combinaciones que provean un beneficio terapéutico máximo (Eccles 2007), han contribuido a disminuir la tasa de mortalidad que se venía mostrando hasta la última década del siglo XX (Figura 2).

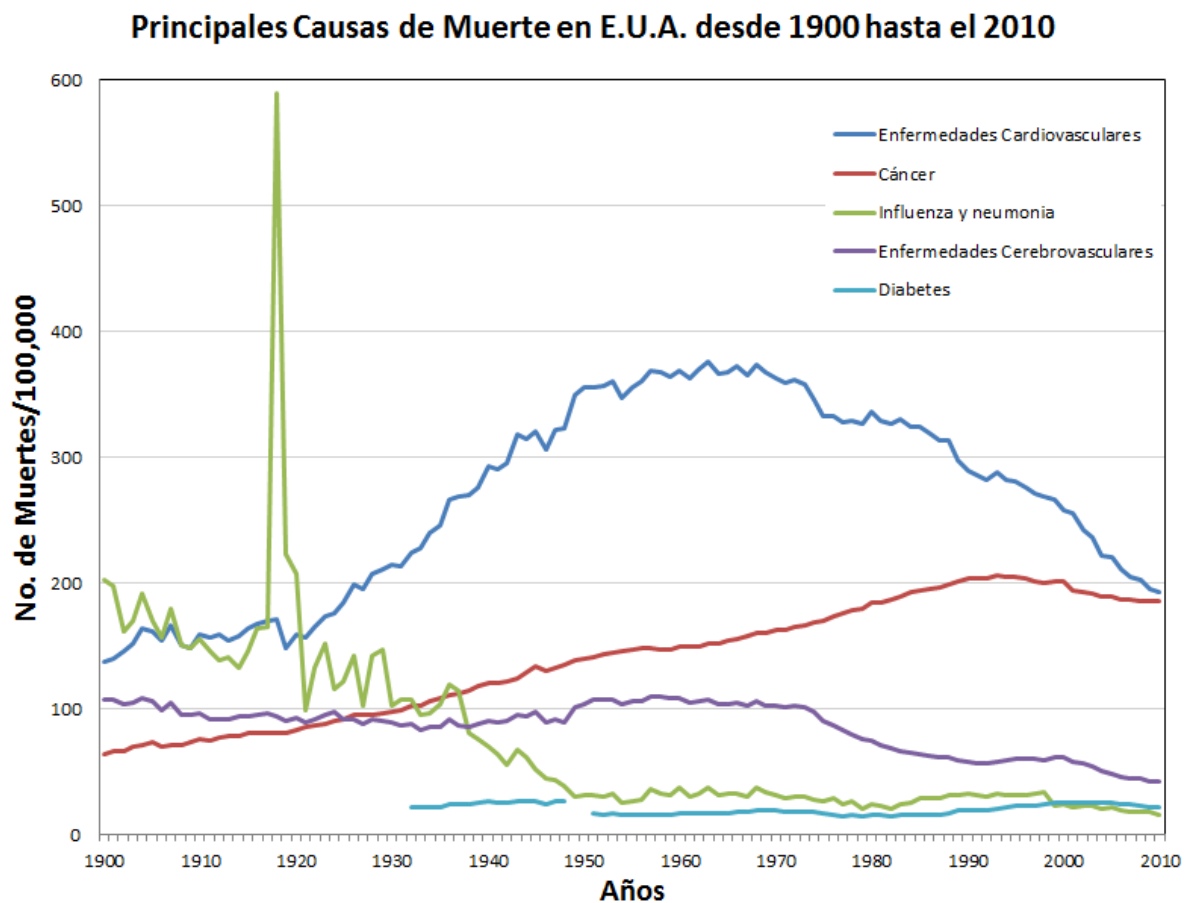


Figura 2| Principales causas de muerte en E.U.A. desde 1900 hasta el 2010. El cáncer ha sido una de las principales causas de muerte en E.U.A. desde 1900. A diferencia de otras enfermedades, el número de muertes provocadas por el cáncer se ha ido incrementando sostenidamente hasta la última década del siglo XX. (Figura modificada de Jones 2012).

La mayoría de los fármacos biodirigidos desarrollados hasta la fecha son inhibidores específicos de moléculas blanco involucradas en vías que habilitan alguna capacidad tumoral en la célula cancerosa. Esta especificidad de acción provoca menos efectos secundarios. No obstante, los resultados muestran que los beneficios clínicos de estos fármacos son transitorios, incrementando la posibilidad de recurrencia del cáncer en los pacientes (Hanahan 2011).

Lo anterior podría deberse a que varias de las características específicas de las células cancerosas son reguladas por vías de señalización parcialmente redundantes. En consecuencia, un agente terapéutico que inhiba una sola vía importante podría no inhabilitar completamente cierta capacidad de la célula cancerosa, permitiendo que estas células sobrevivan con una funcionalidad residual hasta que éstas y su progenie, eventualmente se adapten a la presión selectiva impuesta por la terapia aplicada, formando un nuevo tumor (Hanahan 2011). Sin embargo, aún faltan mecanismos moleculares de las células cancerosas por caracterizar (Sawyers 2005), lo que repercute en la falta de blancos terapéuticos y en el desarrollo de fármacos biodirigidos que permitan inhibir varias vías de señalización (Bild 2006) y contender con la resistencia (Klein 2005; Workman 2005). Por lo anterior, es necesario llevar a cabo investigaciones que nos permitan tener una visión que comprenda los mecanismos moleculares que sostienen los pasos necesarios para la consolidación de una metástasis, para poder así desarrollar fármacos que inhiban varios blancos terapéuticos vitales para las células cancerosas.

En ese sentido, buscar patrones particulares de las metástasis según el tipo tumoral, es primordial para detectar singularidades a nivel molecular, que den lugar a blancos terapéuticos factibles. De hecho, se han encontrado patrones claros que relacionan el sitio de metástasis con el sitio de origen tumoral, sugiriendo que el desarrollo de una metástasis en un tejido u otro no es un proceso aleatorio. De ahí que, en 1889 Stephen Paget propusiera la hipótesis de la “semilla y el suelo” como posible explicación a estas observaciones. Su hipótesis plantea que las células cancerosas (semillas) pueden formar metástasis preferentemente en órganos en los que el microambiente (suelo) sea óptimo para su proliferación y sobrevivencia (Paget 1889). Actualmente, este microambiente es conocido como “nicho metastásico” (Kaplan 2005; Kaplan 2006a; Kaplan 2006b).

Un ejemplo de lo anterior es el hueso, pues es uno de los órganos más frecuentemente afectados por las metástasis (Coleman 2006). Interesantemente, a pesar de que cualquier tipo de cáncer es

capaz de formar metástasis en el hueso, el microambiente de la médula ósea tiende a favorecer más al cáncer de próstata, al de mama y al de pulmón (Guise 2010). Particularmente, en el cáncer de próstata, el hueso es el sitio de formación de metástasis más frecuente (Bubendorf 2000; Disibio 2008; Hess 2006); por lo que encontrar los mecanismos detrás de esta asociación resulta muy pertinente.

1.3.- Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado, así como la sexta causa de muerte relacionada al cáncer en hombres de todo el mundo. En países desarrollados éste ocupa el primer lugar en incidencia, así como el tercero en muertes relacionadas al cáncer (Jemal 2011). En México, el cáncer de mayor incidencia y mortalidad es el prostático (International Agency for Research on Cancer 2008). Por lo tanto, comprender los procesos patológicos detrás de esta neoplasia es fundamental para combatir este problema de salud pública nacional e internacional.

Curiosamente, a pesar de la alta morbilidad y mortalidad del cáncer de próstata, su etiología permanece en gran parte desconocida. Los únicos factores de riesgo establecidos hasta el momento son edad avanzada, grupo étnico y antecedentes familiares. Se ha estimado que sólo un 42% del riesgo de desarrollar cáncer de próstata puede ser explicado por factores genéticos, dejando un alto porcentaje del riesgo sin alguna explicación contundente. Se ha postulado que la patogénesis del cáncer de próstata podría también involucrar interacciones entre factores genéticos y ambientales, pero a la fecha no hay evidencias suficientes que sostengan esta u otras explicaciones (Hsing 2006).

La próstata es una glándula exócrina tubuloalveolar del sistema reproductor masculino. Se localiza frente al recto y debajo de la vejiga rodeando a la uretra (Figura 3). La próstata sana de un hombre adulto en promedio es un poco más grande que una nuez y pesa entre 7 y 16 gramos (Leissner 1979). El parénquima de la próstata es epitelio pseudoestratificado, compuesto de células columnares y basales soportadas por un estroma fibroelástico de músculo liso con orientación aparentemente aleatoria. El epitelio prostático es altamente variable, contiene áreas de epitelio cúbico así como de estratificado, y regiones de transición epitelial en las regiones distales de los ductos más largos. En medio de la próstata, la uretra proveniente de la vejiga se denomina uretra prostática y se une con los ductos de las vesículas seminales. La próstata está rodeada por una

Localización de la próstata

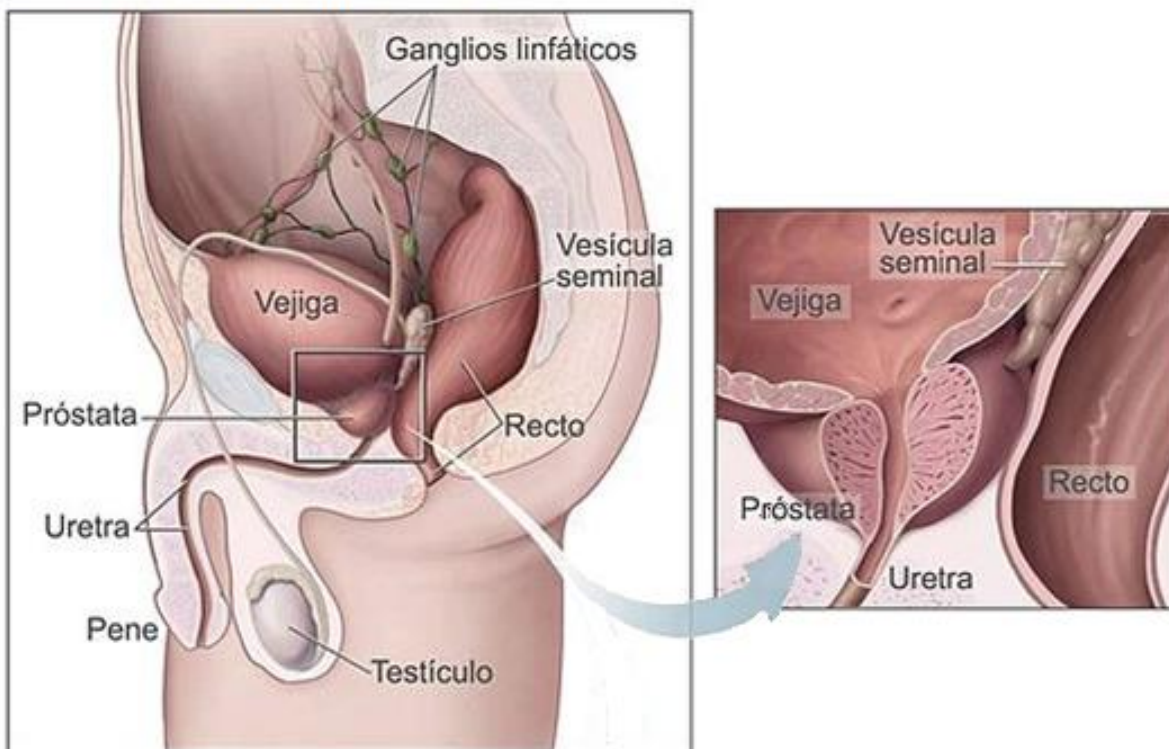


Figura 3| Esquema de la próstata y su ubicación. Del lado izquierdo se muestra en el plano sagital la posición de la próstata respecto a los tejidos cercanos. Del lado derecho se muestra como la próstata rodea a la uretra. (Figura modificada de Instituto Nacional del Cáncer 2007).

banda integral fibromuscular, así como por los músculos del diafragma pélvico, los cuales se contraen durante el proceso de eyaculación (Raychaudhuri 2008).

Estructuralmente, la próstata puede ser dividida en lóbulos o en zonas para su estudio. La clasificación en lóbulos es usada principalmente en anatomía, y divide a la próstata en los lóbulos: anterior, posterior, lateral y medio. La clasificación en zonas se usa en patología, y divide a la próstata en las siguientes cinco zonas: central, fibromuscular, transicional, periférica y periuretral (Figura 4) (Myers 2000).

Por consiguiente, el cáncer de próstata se define como el desarrollo de células cancerosas provenientes de tejido epitelial prostático. Sin embargo, el origen del cáncer de próstata no es siempre de la misma zona prostática, ya que del 70 al 80% de las veces, el cáncer de próstata proviene de células de la zona periférica, del 10 al 20% proviene de la zona transicional y alrededor del 2.5% de la zona central (Tabla 2) (Cohen 2008; McNeal 1988).

Zonas de la próstata

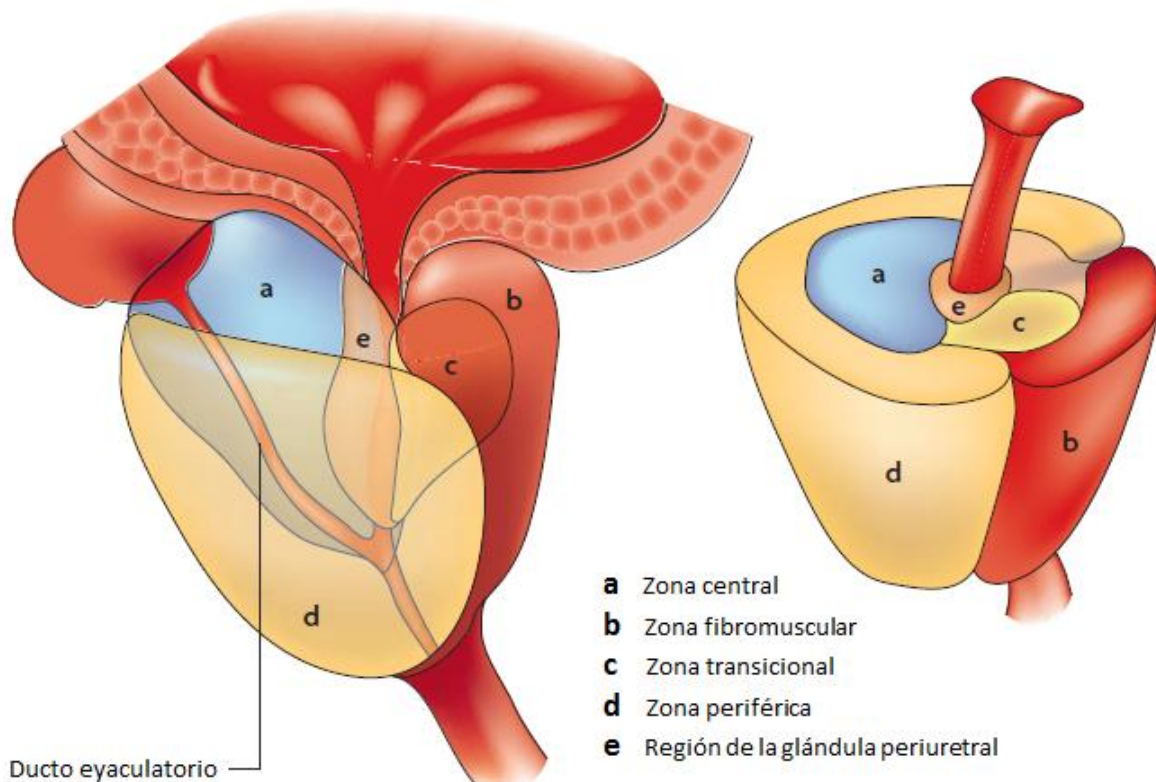


Figura 4| Esquema de la próstata dividida en zonas. La próstata puede ser dividida en 5 zonas para su estudio patológico, siendo las zonas central, transicional, periférica y periuretral de naturaleza glandular, mientras que la zona fibromuscular es músculo liso. (Modificado de De Marzo 2007).

La función de la próstata es secretar un fluido blanco, espeso y ligeramente alcalino, que constituye del 50 al 75% del volumen del semen, el cual además del fluido de la próstata contiene espermatozoides y fluido de las vesículas seminales (Huggins 1942). El semen es alcalino principalmente por la contribución del fluido seminal; esta alcalinidad ayuda a neutralizar la acidez del tracto vaginal, una importante función ya que los espermatozoides tienen una mayor viabilidad en un ambiente ligeramente alcalino. El fluido prostático es expulsado en las primeras fracciones eyaculatorias junto con la mayor parte de los espermatozoides, los cuales tienen mayor movilidad y mayor vida media que los pocos espermatozoides expulsados en la fracción del fluido seminal. Además de ser químicamente alcalino, el fluido prostático contiene enzimas coagulantes y antígeno prostático específico (PSA). Las enzimas coagulantes actúan sobre el fibrinógeno contenido en el fluido seminal, produciendo fibrina, la cual “coagula” el semen; esto ayuda a que el semen eyaculado se mantenga en el tracto reproductor femenino cuando el pene es retirado

Relación de las zonas prostáticas y el cáncer de próstata		
Zona	Fracción de la próstata	Relación con el cáncer de próstata
Zona periférica	~70%	El 70 a 80% de los cánceres de próstata se desarrollan a partir de esta zona.
Zona central	~20%	El 2.5% de los cánceres de próstata se desarrollan a partir de esta zona, aunque estos cánceres tienden a ser más agresivos y predispuestos a invadir las vesículas seminales.
Zona transicional	~5%	El 10 a 20% de los cánceres de próstata se desarrollan en esta zona. Ésta es la región de la glándula que crece a lo largo de la vida y es responsable de la hiperplasia benigna prostática.
Zona fibromuscular	~5%	Esta zona usualmente no contiene componentes glandulares, solo músculo y tejido conectivo. (Forma parte del estroma de la próstata).

Tabla 2 | Predisposición de cada tejido a desarrollar cáncer de próstata según la zona prostática. La zona periférica es la zona de la que surgen la mayoría de los tumores de próstata, seguida por la zona transicional y central.

(Sherwood 2007). Poco después, el semen coagulado es disuelto por el PSA – una proteasa que degrada a la fibrina – permitiendo la liberación de los espermatozoides en el tracto femenino (Balk 2003).

El PSA es una proteasa secretada principalmente por las células epiteliales de la próstata, la cual tiene una pequeña concentración basal en sangre menor a 4 ng/mL en hombres con próstata sana. Por lo tanto, el incremento en la concentración basal de PSA en sangre puede sugerir la presencia de cáncer de próstata (Catalona 1994). Debido a esto, se ha implementado la medición del nivel de PSA sanguíneo como un tipo de prueba pre-diagnóstica de cáncer de próstata. Sin embargo, el nivel de PSA sanguíneo también puede incrementarse por prostatitis, irritación de la próstata, hiperplasia benigna prostática, así como por una eyaculación reciente, dando lugar a falsos positivos (Herschman 1997; Nadler 1995). Por otro lado, en algunos casos el cáncer de próstata puede estar presente aún con la ausencia de un nivel elevado de PSA, dando como resultado falsos negativos (Thompson 2004). Por lo tanto, esta medición sólo funge como un indicativo indirecto de que la próstata puede estar sufriendo algún proceso patológico y no es considerada una prueba diagnóstica del cáncer de próstata.

De hecho pruebas que se usan para obtener información del estado de la próstata y que además son poco invasivas, son la medición de la concentración de PSA en sangre, la examinación rectal digital, la ecografía trans-rectal y la imagen de resonancia magnética. Si se sospecha la presencia de cáncer, entonces la toma de una biopsia es el elemento decisivo para el diagnóstico oportuno del cáncer (Bonekamp 2011). Si se detectan células cancerosas, estas son analizadas usando como parámetro el sistema Gleason de clasificación de avance tumoral (National Cancer Institute 2012).

La asignación del valor de clasificación Gleason se basa en el grado de diferenciación aparente de las células tomadas de la biopsia. Para determinar con mayor precisión el grado Gleason del tumor, los patólogos deben evaluar 5 posibles patrones en los tejidos analizados (Tabla 3).




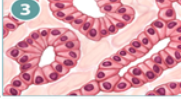
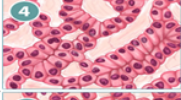
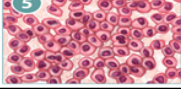
Patrones evaluados para el sistema de clasificación Gleason		
Próstata Sana	Las glándulas son pequeñas, bien formadas, compactadas y separadas unas de otras. Los núcleos de las células son pequeños y están orientados a la membrana basal de la célula.	
Patrón 1	El tejido prostático tumoral es muy similar al tejido prostático sano. Las glándulas son pequeñas, bien formadas y compactadas. Los núcleos de las células son más grandes. Esto corresponde a un carcinoma bien diferenciado.	
Patrón 2	El tejido tiene glándulas bien formadas, pero son más grandes y tienen más tejido entre ellas; lo que implica que el estroma se ha incrementado. Esto corresponde a un carcinoma moderadamente diferenciado.	
Patrón 3	El tejido tiene aún glándulas reconocibles, pero las células son más oscuras. A una mayor resolución, algunas de las células han dejado las glándulas y han empezado a invadir el tejido circundante. Esto corresponde a un carcinoma moderadamente diferenciado.	
Patrón 4	El tejido tiene pocas glándulas reconocibles. Numerosas células invaden el tejido circundante en grupos neoplásicos. Esto corresponde a un carcinoma poco diferenciado.	
Patrón 5	El tejido no tiene o tiene muy pocas glándulas reconocibles. Por lo general solo hay capas de células en todo el tejido circundante. Esto corresponde a un carcinoma anaplásico.	

Tabla 3 | Patrones Gleason evaluados en el cáncer de próstata. Del lado izquierdo se muestra la lista de patrones y su descripción. Del lado derecho se muestra un esquema de las características descritas de cada patrón. (Esquema modificado de LeaderLine Studios Inc 2013).

Después de examinar las células y reconocer los patrones presentes en el tejido, la determinación de la clasificación Gleason se hace mediante la suma de los dos patrones más frecuentes en el tejido. Si hay más de dos patrones entonces se toma primero el valor del patrón más común y se le suma el valor del patrón con mayor grado. Por ejemplo, si el patrón más común en el tumor es el 3, pero se observan algunas células con patrón 4, la clasificación de Gleason será 3+4=7. Esto

permite que la clasificación Gleason maneje matices de agresividad, ya que una clasificación Gleason de 4+3 es de peor pronóstico que la 3+4 a pesar de que el grado Gleason es 7 en ambos casos. Adicionalmente, los valores de clasificación Gleason pueden agruparse en tumores de grado bajo (≤ 5), intermedio (6) y alto (≥ 7), los cuales se relacionan directamente con el grado de avance del tumor y el pronóstico para el paciente (Epstein 2005).

Por otra parte, las etapas o estadios del cáncer de próstata se dividen en 4 y se describen a continuación (Figura 5) (National Cancer Institute 2012).

Estadio I: El cáncer se encuentra únicamente en la próstata; el tamaño del tumor es normalmente muy pequeño, por lo que difícilmente es detectado por el examen rectal digital. Si la clasificación Gleason y la concentración sanguínea de PSA son conocidas, usualmente el grado Gleason es igual o menor a 6 y la concentración de PSA es menor a 10 ng/mL.

Estadio IIA: El tumor tiene un tamaño mayor al del estadio uno y/o tiene un grado Gleason mayor. Además, sólo se encuentra en uno de los lóbulos de la próstata, pero no fuera de ésta.

Estadio IIB: El tumor tiene un tamaño mayor al del estadio uno y/o tiene un grado Gleason mayor. Además, se encuentra en más de un lóbulo de la próstata, pero no fuera de ésta.

Estadio III: El cáncer se ha extendido más allá de la próstata, éste ha invadido las glándulas seminales, pero no los ganglios linfáticos.

Estadio IV: El cáncer ha invadido la vejiga, el recto u otros órganos cercanos además de las vesículas seminales. Además, éste podría haber formado metástasis en varios ganglios linfáticos, en huesos y/o en otras partes del cuerpo.

Los tratamientos existentes para el cáncer de próstata son: vigilancia activa, cirugía, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y quimioterapia citotóxica; las cuales no son mutuamente excluyentes. La elección del tratamiento depende de la edad del paciente, el grado Gleason del cáncer, la concentración sanguínea de PSA, el estadio del cáncer, los síntomas y la salud general del paciente (National Cancer Institute 2012).

Estadios del cáncer de próstata

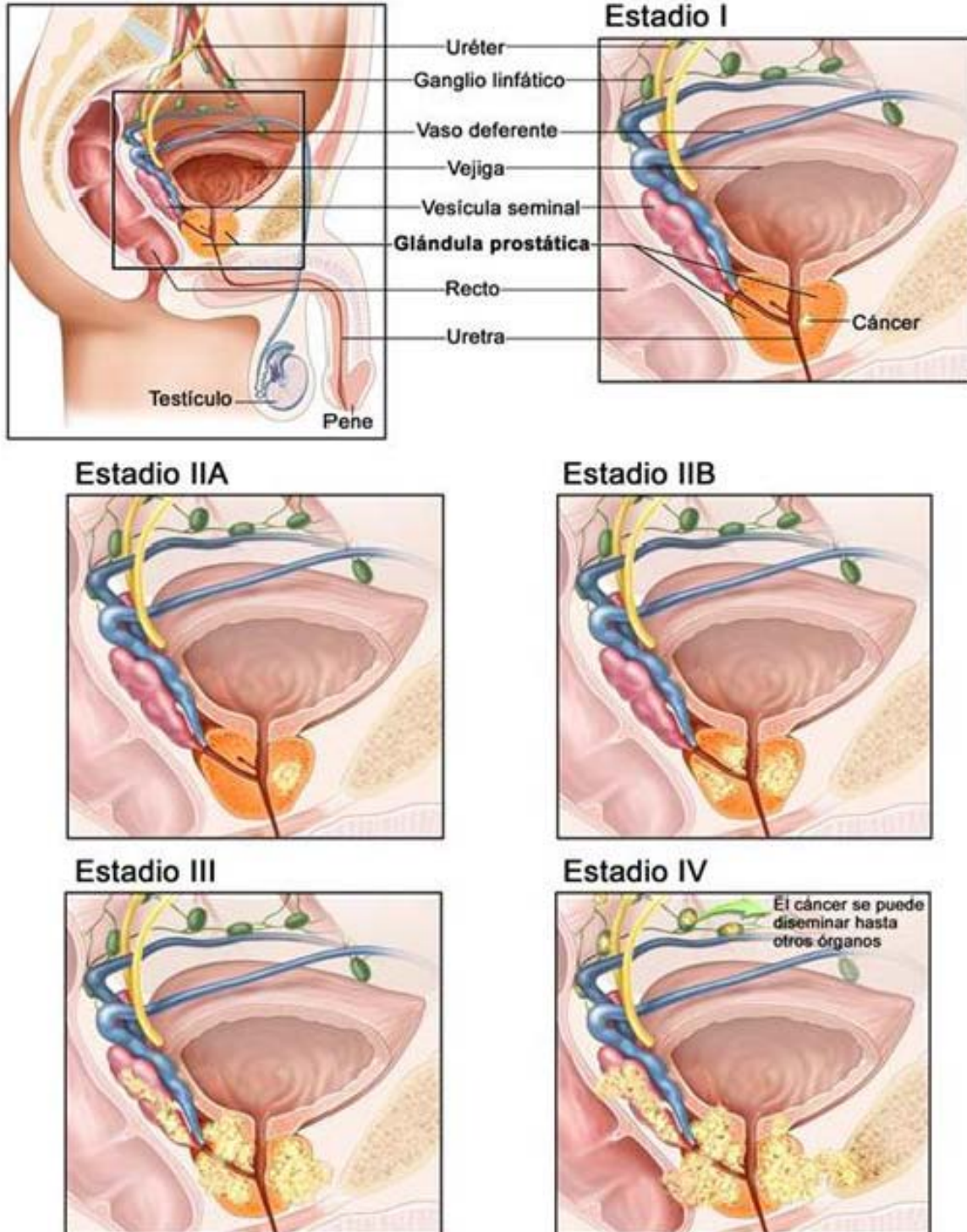


Figura 5| Esquema de la próstata y de los estadios de desarrollo del cáncer de próstata. A medida que el cáncer avanza desde el estadio I al IV, las células cancerosas proliferan dentro de la próstata, invaden la capa externa de la próstata hacia el tejido circundante, luego migran a los ganglios linfáticos y/o al sistema circulatorio generándose la posibilidad de hacer metástasis en otros órganos distantes a la próstata. (Figura modificada de Instituto Nacional del Cáncer 2013).

Vigilancia activa:

La vigilancia activa consiste en revisar al paciente frecuentemente, principalmente con respecto a la concentración sanguínea de PSA, su estado general de salud, examen rectal digital y atención a los posibles síntomas presentados. La vigilancia activa se sugiere cuando el cáncer de próstata está en un estadio igual o menor al IIB y tiene una clasificación Gleason menor a 6. La vigilancia activa se mantiene hasta que alguna prueba demuestre que el cáncer de próstata está creciendo o está cambiando (Instituto Nacional del Cáncer 2012).

Cirugía:

La cirugía consiste en la remoción total de la próstata y nódulos linfáticos circundantes. La cirugía es una opción para los pacientes que tienen un cáncer de próstata en estadio I, IIA o IIB, es decir, que el cáncer se encuentre únicamente en la próstata; aunque es también una opción para aminorar los síntomas de pacientes con cáncer de próstata avanzado (Instituto Nacional del Cáncer 2012).

Radioterapia:

La radioterapia consiste en el empleo de radiaciones ionizantes que generan daño al ADN de las células, así como especies reactivas de oxígeno. En conjunto estos efectos son perjudiciales principalmente para las células mitóticamente activas, como las tumorales. La radioterapia es una opción para pacientes con cualquier estadio de cáncer de próstata, aunque se indica principalmente en estadios iguales o menores al IIB. Los pacientes con estadios tempranos pueden ser tratados con radioterapia en lugar de la cirugía, por otra parte puede ser usada después de la cirugía para eliminar cualquier célula tumoral remanente en el área. En pacientes con cáncer de próstata avanzado, la radioterapia puede ser paliativa (Instituto Nacional del Cáncer 2012).

Terapia hormonal:

Para su correcto funcionamiento, la próstata necesita principalmente del andrógeno 5 α -Dihidrotestosterona (Amory 2008), por lo que generalmente también las células cancerosas de la próstata dependen de andrógenos para crecer y reproducirse. La terapia hormonal en el cáncer de próstata consiste en evitar que las células del cáncer de próstata sean estimuladas por los andrógenos. Esta terapia se prescribe a pacientes con cualquier estadio del cáncer prostático para

inhibir su crecimiento. Suele usarse antes, durante y después de la radioterapia, después de la cirugía, y en estadios avanzados junto con quimioterapia citotóxica (Instituto Nacional del Cáncer 2012).

Inmunoterapia:

La inmunoterapia consiste en manipular al sistema inmunológico del paciente para que éste se encargue de eliminar a las células cancerosas. En el caso del cáncer de próstata se usa una vacuna terapéutica antitumoral (Sipuleucel-T), la cual se administra un total de tres veces con un espacio de dos semanas entre cada administración. La terapia radica en aislar células presentadoras de antígeno del paciente, incubarlas ex-vivo con una proteína recombinante de fusión (PA2024) formada por fosfatasa ácida prostática (proteína presente en el 95% de las células cancerosas prostáticas) y factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos el cual ayuda a madurar a las células presentadoras de antígeno. Después, las células activadas son introducidas al paciente para estimular la respuesta inmunológica contra las células cancerosas (So-Rosillo 2006). Esta terapia se usa en pacientes con estadios III o IV, los cuales ya no responden a terapia hormonal (Instituto Nacional del Cáncer 2012).

Quimioterapia citotóxica:

La quimioterapia citotóxica se basa en el uso de fármacos que actúan matando principalmente a células mitóticamente activas, una de las principales características de la mayoría de las células cancerosas. Aunque también afecta a células que fisiológicamente tienen una alta tasa de proliferación como células de la médula ósea, del tracto digestivo y de los folículos pilosos. En general, los fármacos citotóxicos actúan interfiriendo con la mitosis mediante la alquilación al ADN, la inhibición de proteínas de replicación, el impedimento de elongación del ADN, Ácido Ribonucleico (ARN) y/o los microtúbulos, la intercalación de moléculas en el ADN y la generación de radicales libres (Malhotra 2003). Estos mecanismos de acción inducen la apoptosis en las células o en su defecto arresto del ciclo celular, afectando principalmente a las células cancerosas (Makin 2000). En pacientes con cáncer de próstata, la quimioterapia solo se usa en estadios III o IV (Instituto Nacional del Cáncer 2012).

A pesar de los avances en los tratamientos, el cáncer de próstata sigue siendo una de las principales causas de muerte relacionadas al cáncer en el mundo (Jemal 2011); de las cuales la

gran mayoría se deben al desarrollo de metástasis (Coghlin 2010). De ahí que el estudio y tratamiento de la metástasis del cáncer de próstata sea considerado un elemento fundamental en este padecimiento.

En ese sentido, al analizar la problemática de la metástasis del cáncer de próstata, surgen tres puntos críticos con los que ninguna de las opciones terapéuticas actuales ha podido contender. El primer punto es que el proceso metastásico ha sido encontrado en pacientes con estadios tempranos de cáncer de próstata, sugiriendo que la diseminación de estas células tumorales ocurre de forma temprana, dando lugar a micro-metástasis clínicamente silenciosas (Ellis 2003; Morgan 2007). El segundo punto es que aunque la mayoría de los pacientes con cáncer de próstata avanzado responden en un inicio a la privación de andrógenos de la terapia hormonal, casi todos los cánceres de próstata avanzado progresan a un estado de crecimiento independiente de hormonas llamado “cáncer de próstata resistente a castración” (García 2012), el cual se caracteriza por presentar niveles altos de PSA, evidencia radiográfica de progresión y/o empeoramiento de síntomas, a pesar de tener niveles de andrógenos terapéuticamente disminuidos (Chi 2009; Oh 1998). El tercer punto recae en que el 70 al 90% de las metástasis de cáncer de próstata se desarrollan en el hueso (Bubendorf 2000; Coleman 2006; Disibio 2008; Hess 2006) y que en la actualidad no hay tratamiento que erradique la metástasis en la médula ósea (Semenas 2012).

La progresión de un tumor primario a metástasis y a letalidad tarda en promedio 8 y 13 años respectivamente, después de los tratamientos iniciales (Pound 1999; Roberts 2009). Por otra parte, una vez que el cáncer ha alcanzado el estadio metastásico, éste además de poder ser independiente de hormonas suele presentar resistencia a fármacos citotóxicos. Esta resistencia se desarrolla como respuesta tanto a eventos intrínsecos como extrínsecos de las células cancerosas. Eventos intrínsecos incluyen la incorporación de transportadores promiscuos que incrementan el flujo de salida de los fármacos del interior de la célula cancerosa, la adquisición de mutaciones que impidan la unión y acción del fármaco con su blanco, así como la sobre expresión de proteínas que contrarresten el efecto de los fármacos, como proteínas anti-apoptóticas (Semenas 2012). Por otro lado, los eventos extrínsecos que llevan a la resistencia a fármacos del cáncer de próstata son la presencia de células cancerosas quiescentes (Visvader 2008), así como la interacción del microambiente con las células cancerosas, donde por ejemplo, el microambiente de la médula

ósea tiene un papel preponderante en la adquisición de resistencia por parte de las células del cáncer de próstata metastásico (Semenas 2012).

Debido a que el hueso es el sitio más común en el que las células de cáncer de próstata hacen metástasis, es crucial entender los mecanismos que facilitan la migración y proliferación de células cancerosas circulantes en la médula ósea. Existe evidencia que sugiere que las células tumorales diseminadas, migran a la médula ósea (fenómeno conocido como “homing”) usando mecanismos similares a los usados por las células troncales hematopoyéticas (CTHs) durante un trasplante de médula ósea. Además, las células del microambiente óseo y células endoteliales que forman los nichos de las CTHs expresan numerosas citocinas y quimiocinas que llegan al torrente sanguíneo y circulan por el sistema vascular. Del mismo modo, células cancerosas también suelen expresar, de manera ectópica, receptores de estas citocinas y quimiocinas. Estas interacciones de largo alcance podrían promover la metástasis de cáncer de próstata a la médula ósea (Semenas 2012).

Por otro lado, la posibilidad de que la alta frecuencia de metástasis de cáncer de próstata en médula ósea se deba a factores anatómicos ha sido previamente contemplada (Ye 2007). La glándula prostática está rodeada por un amplio plexo venoso y se conecta con las venas de la columna vertebral, esto provee una vía de diseminación vascular hacia la espina dorsal. De hecho, la conexión entre este grupo de venas (plexo de Batson) y el plexo prostático, son una de las explicaciones potenciales de la metástasis espinal lumbosacra, común en el cáncer de próstata avanzado (Batson 1995). Sin embargo, lo anterior no explica las metástasis al esqueleto axial, al cráneo y las costillas (Ye 2007), siendo la explicación molecular una posibilidad que hay que contemplar.

La médula ósea ha sido ampliamente estudiada ya que es el principal órgano dónde la hematopoyesis se lleva a cabo en el adulto (Taichman 2005). El estudio del microambiente de la médula ósea ha sido fundamental para entender el proceso de regulación de la hematopoyesis, ya que el estroma interactúa activamente con las CTHs y su progenie a través de las células que conforman el nicho de las CTHs y el microambiente óseo (Figura 6) (Kiel 2008; Nakamura 2010; Yin 2006). Esto ha permitido descubrir que la médula ósea es un microambiente de enorme complejidad debida a los distintos tipos celulares co-existiendo y las robustas redes de comunicación sostenidas por citocinas y contactos inter-celulares (Taichman 2005).

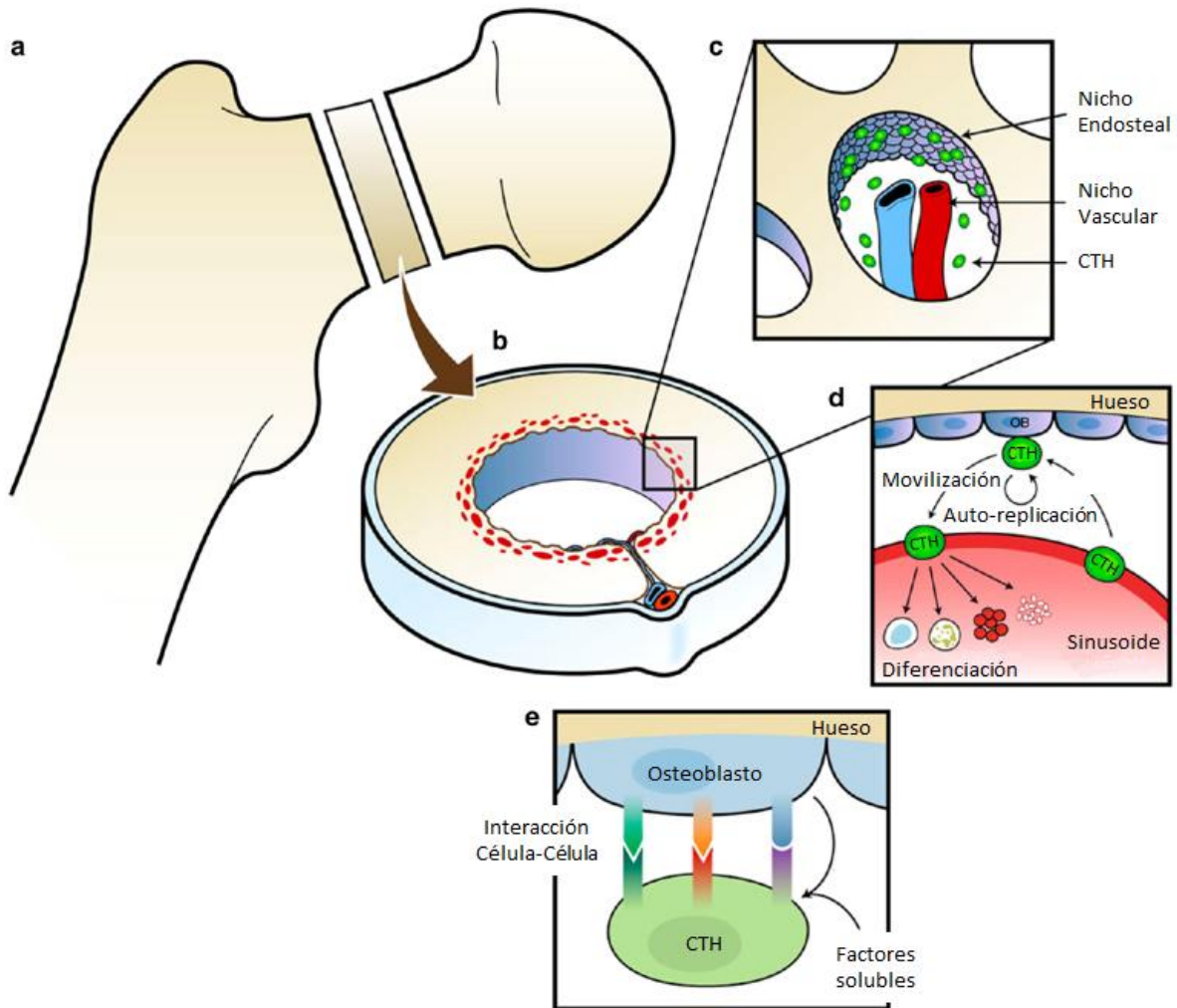


Figura 6| Esquema de la médula ósea. (a, b) Localización macroscópica del nicho de las CTHs en el hueso. (c) La región endosteal y vascular forman parte del microambiente que sostiene a las CTHs. (d) La interacción de las CTHs con los nichos en el microambiente medular, regula el “homing”, la auto-replicación, la movilización y la diferenciación de las CTHs. OB indica osteoblasto. (e) La regulación de estos eventos es mediada por factores solubles secretados por células del microambiente, así como por interacciones célula-célula. (Figura modificada de Shiozawa 2008b).

Con respecto a la interacción entre las células cancerosas y el microambiente de la médula ósea, se ha postulado un proceso metastásico paulatino en el que las comunicaciones intercelulares son fundamentales. Debido a que este proceso comienza con pocas células cancerosas en la médula ósea, es generalmente asintomático y su detección oportuna en la clínica es poco frecuente; de tal forma que cuando la metástasis es evidente, su erradicación es poco probable. Se considera que el proceso de metástasis comienza con el “homing” de células cancerosas, donde las células son atraídas al hueso por moléculas solubles secretadas por células de la médula ósea, posteriormente la interacción de las células cancerosas con osteoblastos, fibroblastos, osteoclastos, células

trocales mesenquimales, células endoteliales, CTHs, linfocitos, macrófagos, plaquetas, neuronas y osteocitos, promueve la sobrevivencia y quiescencia de las células cancerosas de manera similar a como sucede con las CTHs. Después la proliferación de las células cancerosas conlleva a la colonización y formación de micro-metástasis, finalizando en la expansión y formación de macro-metástasis (Figura 7) (Weilbaecher 2011).

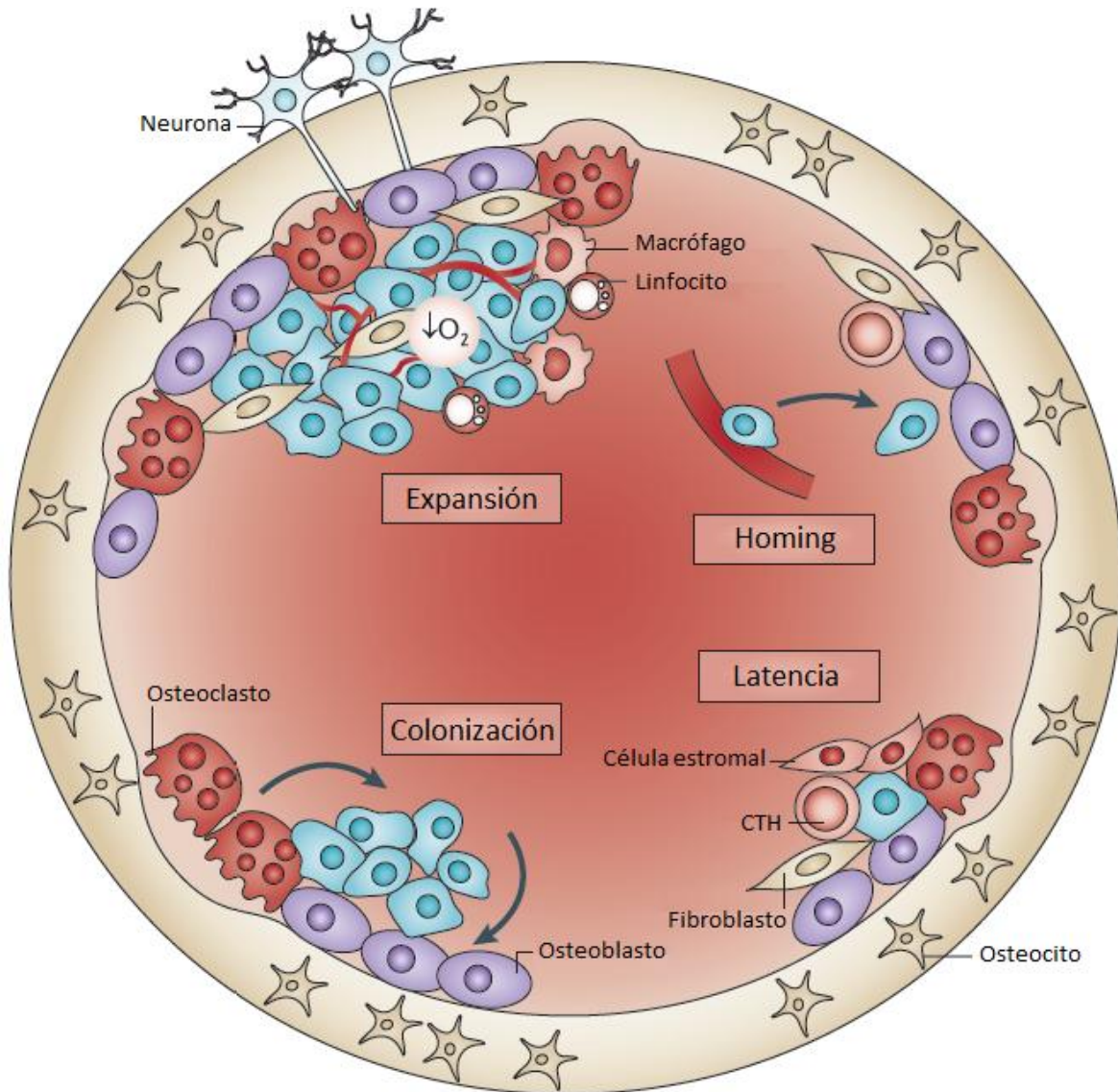


Figura 7| Esquema del proceso metastásico en la médula ósea. Representación de las interacciones celulares entre las células cancerosas y las células del microambiente óseo durante el proceso de metástasis en la médula ósea: "homing", latencia, colonización y expansión. (Figura modificada de Weilbaecher 2011).

En general las interacciones inter-celulares son mediadas tanto por proteínas solubles como por proteínas de membrana, induciendo respuestas celulares tanto por parte de las células cancerosas como de las células del microambiente. Además, se ha encontrado evidencia de que la médula ósea provee señales de localización, moléculas de adhesión y mecanismos que regulan la quiescencia y supervivencia de células tumorales (Joyce 2009; Pedersen 2012; Shiozawa 2008b). En la metástasis del cáncer de próstata se ha reportado por ejemplo, la importancia de las moléculas SDF-1/CXCR4 secretadas por el estroma de la médula ósea en modelos animales de cáncer de próstata (Taichman 2002). Otros estudios han mostrado que receptores expresados por células que forman el nicho de las CTHs en la médula ósea, regulan la adhesión, migración, “homing” y proliferación de células de cáncer de próstata (Shiozawa 2008a). Por ejemplo, el factor de célula troncal, mejor conocido como “Stem Cell Factor” (SCF) y su receptor c-Kit, han sido objeto de diversas investigaciones, ya que son cruciales en la proliferación, migración, adhesión y supervivencia fisiológica de diferentes tipos celulares, además han sido implicadas en diversos tipos de cáncer, son blancos terapéuticos de fármacos bio-dirigidos, y se sabe que el SCF es secretado en gran medida por células del microambiente de la médula ósea (Lennartsson 2012). Por todo lo anterior, la relación del SCF y c-Kit con el cáncer de próstata y la metástasis en la médula ósea es de gran interés para la presente investigación.

1.4.- Stem Cell Factor

El SCF (también conocido como Steel Factor, ligando KIT o KITLG) es un factor de crecimiento que se expresa tanto de forma membranal como soluble. Es expresado por fibroblastos y células endoteliales a través de todo el cuerpo, generando una concentración basal de 3.3 ± 1.1 ng/mL del SCF soluble en sangre (Langley 1993). La activación de c-Kit por su ligando SCF es crucial en la hematopoyesis, melanogénesis, espermatogénesis y en el desarrollo de células cebadas (Ashman 1999; Roskoski 2005), pues se ha observado que promueve la proliferación, migración, supervivencia y diferenciación de progenitores hematopoyéticos, melanocitos y células germinales. El gen del SCF se localiza en el cromosoma 12 en los humanos (Ropers 1989) y es codificado por nueve exones (Martin 1990). La regulación de la expresión del SCF membranal o soluble es llevada a cabo tanto a nivel del ARN mensajero (ARNm) como a nivel de la proteína. Se han reportado seis transcritos alternativos del SCF en el humano, de los cuales cuatro son

codificantes; sin embargo, de éstos sólo dos son ampliamente expresados y tratados en la literatura científica (Lennartsson 2012).

La expresión de estos dos transcritos es regulada por “splicing” alternativo y proteólisis, dando lugar a la isoforma membranal o a la soluble según sea el caso (Anderson 1991). Estos ARNm producto del “splicing” alternativo difieren únicamente en el exón 6, el cual codifica para el sitio de escisión que se encuentra entre el dominio extracelular – que es el sitio de unión a c-Kit – y el dominio transmembranal. La isoforma sin el exón 6 se conforma de 220 aminoácidos (aa) y corresponde a la isoforma membranal, mientras que la isoforma que mantiene el exón 6 se conforma de 248 aa, pero al ser procesada y liberada conserva sólo 165 aa, siendo ésta la isoforma soluble (Figura 8a). El SCF membranal (SCFm) permanece anclado a la membrana mientras que el SCF soluble es liberado al medio extracelular; sin embargo, ambas isoformas tienen la capacidad de formar homodímeros mediante interacciones no covalentes (Figura 8b). Además, estas isoformas del SCF tienen el dominio de unión a c-Kit, por lo que al homodimerizarse pueden unirse al receptor y promover su activación (Hsu 1997). No obstante, la activación del receptor con una u otra isoforma conlleva a diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en las cascadas de señalización subsecuentes; es decir, no tienen funciones fisiológicas redundantes (Kapur 1998; Lyman 1998).

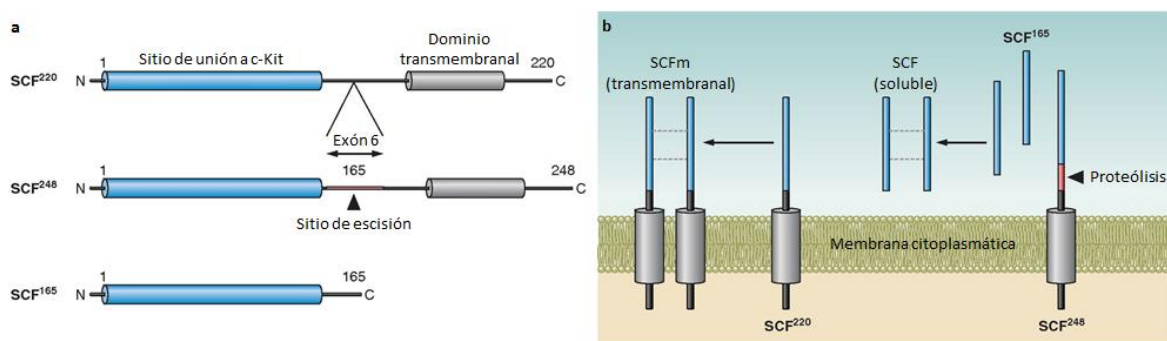


Figura 8 | Representación esquemática del “splicing” alternativo del ARNm y el procesamiento del SCF. (a) El SCF es expresado en dos formas transmembranales debido al “splicing” alternativo del exón 6, SCF²²⁰ y SCF²⁴⁸. En el ARNm del SCF²⁴⁸, el exón 6 se mantiene y codifica para un sitio proteolítico de escisión, generando el SCF soluble SCF¹⁶⁵. (b) El SCF²²⁰, que no tiene el sitio de proteólisis, forma dímeros de SCF transmembranal (SCFm), mientras que el SCF²⁴⁸ es procesado, liberando el SCF¹⁶⁵, el SCF soluble. Las líneas punteadas indican la dimerización del SCF mediante interacciones no covalentes. (Figura modificada de Lennartsson 2012).

El gen que codifica para el ARNm del SCF tiene una región 5' no codificante corta, un marco de lectura abierto de 0.8 kilobases (kb) y una región 3' no codificante larga. En la región 5', hay tres motivos ATG donde el tercero es el inicio de la traducción. Veintiocho bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción se encuentra una caja TATA de secuencia consenso (TATAAA) y tres motivos GGCGGG empalmados; éstos son sitios de unión para los factores de transcripción TFIID y SP1, respectivamente (Bedell 1996). Adicionalmente, HIF1 α induce la expresión del SCF en respuesta a la hipoxia, así como a la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (Han 2008). Por otra parte, se ha reportado que la activación de c-Kit por SCF estabiliza e induce la expresión de HIF1 α (Pedersen 2008), lo que sugiere la posibilidad de un circuito de retroalimentación positiva que a su vez podría contribuir a la angiogénesis en tumores incluso en ausencia de hipoxia (Lennartsson 2012).

Estructuralmente, el SCF soluble es una citocina tipo “paquete de cadenas α -hélice cortas” lo que implica que tiene un centro de α -hélices de 10-20 aa cada una con un arreglo topológico “arriba-arriba-abajo-abajo”. En su conformación homodimérica, los dos monómeros interactúan cabeza con cabeza mediante interacciones no covalentes (Figura 9) (Jiang 2000; Zhang 2000). El proceso de dimerización del SCF es un proceso dinámico que podría estar implicado en la regulación de la dimerización y activación de c-Kit; interesantemente la mayoría del SCF circulante presente en el suero sanguíneo se encuentra en forma de monómero (Hsu 1997). El SCF de humano es una proteína N-glicosilada fisiológicamente (Zhang 2000). Cuando es expresado en células de ovario de hámster chino, el SCF contiene alrededor de 30% de carbohidratos, tanto N-glicosilados como O-glicosilados; sin embargo, la presencia o ausencia de carbohidratos en el SCF no parece influir en su actividad biológica (Arakawa 1991). Por otro lado, el SCF recombinante expresado en *Escherichia coli*, donde los monómeros están covalentemente unidos, exhibe una actividad biológica *in vitro* diez veces mayor comparada con el SCF silvestre, sugiriendo una correlación entre la afinidad de dimerización y la actividad biológica. Lo anterior es consistente con el modelo en el que la dimerización del SCF induce la dimerización de su receptor c-Kit, y la subsecuente activación de cascadas de señalización (Hsu 1997).

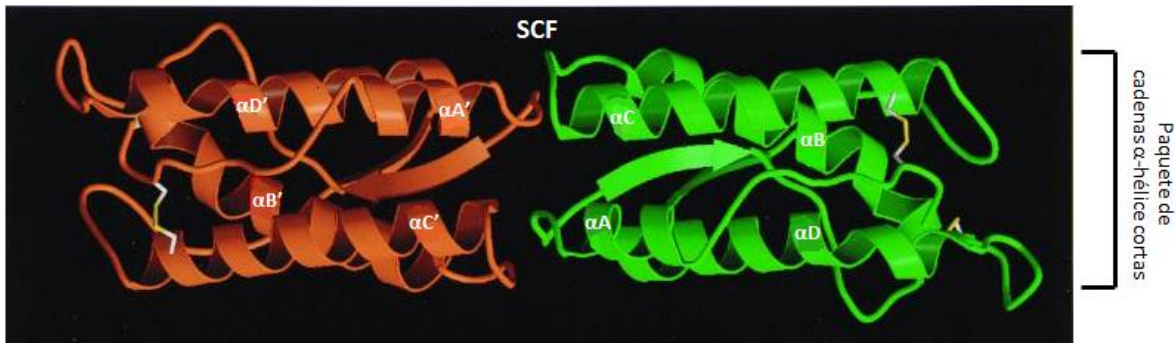


Figura 9 | Modelo del homodímero de SCF. La homodimerización del SCF es establecida mediante interacciones no covalentes, en el modelo un monómero es representado de color anaranjado y el otro de color verde, cada α -hélice está etiquetada y los enlaces disulfuro se muestran con los átomos de azufre en color amarillo. (Figura modificada de Zhang 2000).

1.5.- c-Kit

c-Kit (también conocido como KIT) es el receptor transmembranal del SCF. Así como el SCF, los patrones de expresión de c-Kit durante la embriogénesis del ratón sugieren que c-Kit está involucrado en la proliferación, migración y diferenciación de linajes hematopoyéticos, germinales, neuronales y melanoblastos (Keshet 1991; Matsui 1990; Orr-Urtreger 1990). Interesantemente, c-Kit ha sido detectado en células hematopoyéticas en estadios tempranos (Broudy 1997), incluyendo células troncales (Okada 1991) y progenitoras (Ogawa 1991), y su expresión se pierde durante la diferenciación de todas las células de linaje hematopoyético a excepción de células cebadas (Metcalf 1997) y dendríticas (Ray 2010). La proliferación y sobrevivencia de células hematopoyéticas en estadios tempranos, dependen de señales mediadas por c-Kit; esto ocurre mediante una gran sinergia con otras citocinas y factores. Por otra parte, los datos de expresión también sugieren que la señalización de c-Kit podría ser importante en el sistema nervioso, en la placenta, el corazón, los pulmones y el riñón gestacional. Además, la expresión de c-Kit ha sido demostrada en células intersticiales de Cajal, células endoteliales, epiteliales y endocrinas durante la embriogénesis aunque su proliferación, migración o sobrevivencia no parecen ser dependientes de la expresión de c-Kit en esta etapa del desarrollo (Bernex 1996).

El gen de c-Kit se localiza en el segmento del cromosoma 4q11 en el humano (d'Auriol 1988; Yarden 1987), se compone de 21 exones y más de 34 kb. El primer exón codifica para el codón de inicio de la traducción y el péptido señal, los exones del 2 al 9 codifican para el dominio

extracelular de c-Kit, el exón 10 codifica para el dominio transmembranal, mientras que los exones del 11 al 21 codifican para el dominio intracelular del receptor (Figura 10) (Lennartsson 2012).

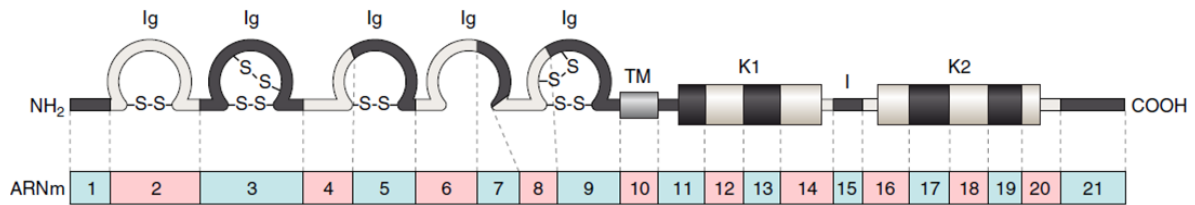


Figura 10| Representación de la correspondencia entre los exones del ARNm de c-Kit y su contraparte en la estructura proteica de c-Kit. El exón 1 codifica para el codón de inicio de la traducción y el péptido señal. Los exones 2 al 9 codifican para la región extracelular, que se compone de 5 dominios tipo inmunoglobulina (Ig). El exón 10 codifica para el dominio transmembranal (TM). Los exones 11 al 14 codifican para el subdominio de cinasa 1 (K1). El exón 15 codifica para el inserto de cinasa (I). Los exones 16 al 20 codifican para el subdominio de cinasa 2 (K2). El exón 21 codifica para el dominio carboxilo terminal (COOH). Se muestran los enlaces disulfuro (S-S) entre cisteínas. (Figura modificada de Lennartsson 2012).

Un importante sitio de inicio de la transcripción de c-Kit se encuentra a 58 pares de bases (pb) río arriba del codón de inicio de la traducción, además en la región 5' se localizan sitios de unión consenso para AP-2, factores de transcripción tipo hélice-vuelta-hélice, Sp1, Ets y Myb (Yamamoto 1993; Yasuda 1993). Adicionalmente, una región crítica para la actividad del promotor se encuentra a ± 139 pb río arriba del inicio de la traducción, y contiene sitios de unión funcionales para los factores de transcripción Myb y Ets-2, que fungen como reguladores de la expresión de c-Kit en células hematopoyéticas (Ratajczak 1998). Por otra parte, se ha demostrado la importancia de Sp1 en la actividad máxima del promotor (Park 1998), así como la presencia de tres sitios de unión funcionales de AP-2 en la región promotora de c-Kit (Huang 1998).

Aparte de la regulación de los niveles de expresión por factores de transcripción, se ha reportado la regulación post-transcripcional de c-Kit por los microARNs miR-193b, miR-221 y miR-222. Interesantemente se ha detectado la expresión de miR-193b en células de leucemias (Gao 2011) y miR-221 en células de melanoma (Igoucheva 2009); además se ha reportado que miR-221 y miR-222 regulan la expresión de c-Kit en células hematopoyéticas y que podrían ser reguladores potenciales de su expresión en tumores de estroma gastrointestinal (Felli 2005; Koelz 2011).

c-Kit es un receptor con actividad de cinasa de tirosinas (RTK). Los RTKs constituyen una gran familia de receptores de superficie que colaboran en la regulación de procesos celulares que requieren comunicación intercelular tal como supervivencia, proliferación, diferenciación y

migración (Hubbard 2000; Robinson 2000). Todos los RTKs tienen la siguiente estructura modular: en la región extracelular se exhibe el dominio de unión al ligando el cual tiene la capacidad de interactuar con otras moléculas del medio extracelular, en particular con su cognado; una región transmembranal formada por una sola α -hélice que atraviesa toda la membrana y que facilita su localización en ésta, y un dominio intracelular conservado con actividad de cinasa de tirosinas el cual sufre modificaciones químicas que provocan su asociación e interacción con otras proteínas intracelulares. Los RTKs se mantienen en la membrana celular como monómeros inactivos, y en algunos casos como dímeros preformados. En ambos casos, la unión de su ligando provoca cambios conformacionales que inducen la dimerización del receptor y que los dominios con actividad de cinasa de tirosinas queden adyacentes en la región intercelular promoviendo su transactivación mediante autofosforilación (Hubbard 2004). Esta activación desencadena cascadas de transducción de señales intracelulares que anteceden la respuesta celular (Lemmon 2010).

Existen 20 familias de RTKs codificadas en el genoma humano (Lemmon 2010; Robinson 2000), de las cuales la clase de RTKs III resulta particularmente interesante en términos de su funcionalidad y consideraciones clínicas (Verstraete 2012). La familia de RTKs III se compone de cinco miembros: c-Kit, el receptor del factor estimulador de colonias 1, el receptor tipo Fms con actividad de cinasa de tirosinas 3, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas α y el β . A nivel molecular, la clase III de RTKs se caracteriza por la presencia de una región extracelular glicosilada dividida en cinco dominios tipo inmunoglobulina (Ig) (de ± 100 aa cada uno), una α -hélice transmembranal de alrededor de 25 residuos, una región reguladora yuxtamembranal de 40 residuos, un dominio conservado con actividad de cinasa de tirosinas que contiene una región de inserto de cinasa de longitud variable (de 70-100 aa), que reside entre los dominios de cinasa, y el carboxilo terminal (COOH-terminal) (Matthews 1991; Qiu 1988; Yarden 1986). El RTK codificado por el gen KIT es una proteína transmembranal con un dominio extracelular compuesto por cinco dominios tipo Ig seguidos por una región transmembranal. La parte intracelular de c-Kit comienza con la región yuxtamembranal, una región de gran importancia para la regulación de la actividad de cinasa de c-Kit (Lennartsson 2012). En el dominio de cinasa, el sitio de unión al ATP está separado del sitio de fosfotransferasa por una secuencia intercinasa requerida para la interacción con proteínas propias de la cascada de señalización activada por c-Kit, de tal manera que el dominio de cinasa se compone de dos subdominios separados por una secuencia de ± 80 aa (Besmer 1993). Finalmente, la proteína termina en su COOH-terminal. La mayoría de los sitios

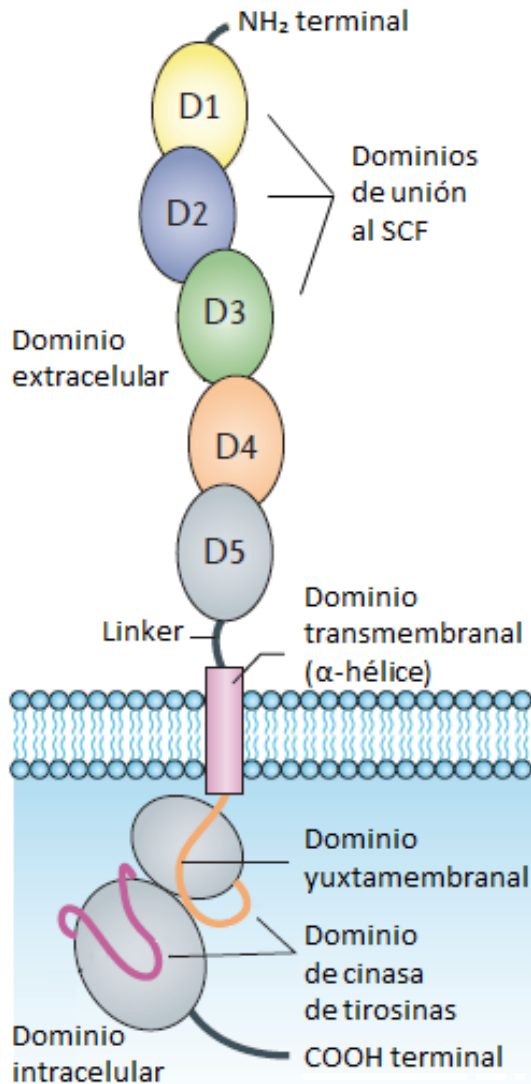


Figura 11| Representación esquemática de los dominios estructurales de c-Kit. La región extracelular de c-Kit consta de 5 dominios glicosilados tipo Ig. Los tres primeros dominios unen al SCF, mientras que los dominios 4 y 5 están involucrados en el proceso de dimerización. El dominio transmembranal está formado por una sola α -hélice; inmediatamente después, en la región intracelular se encuentra el dominio yuxtamembranal, el cual se compone de ± 30 aa y tiene una función reguladora de la actividad de cinasa de tirosina del receptor. El dominio de cinasa de tirosinas está separado por un inserto de cinasa. Los últimos 50 aa forman el COOH-terminal. Cuando las tirosinas son fosforiladas, el dominio yuxtamembranal, el inserto de cinasa y el COOH-terminal funcionan como sitios de acoplamiento para proteínas de transducción de señales. (Figura modificada de Verstraete 2012).

fosforilados después de la activación de c-Kit inducida por la unión del ligando, se localizan tanto en la región yuxtamebranal, en el inserto de cinasa y en el COOH-terminal (Figura 11) (Lennartsson 2012).

El “splicing” alternativo del ARNm que codifica para c-Kit genera al menos cuatro isoformas de c-Kit en los humanos. Dos de estas isoformas difieren una de la otra por la presencia o ausencia de la secuencia de aa GNNK, en la región yuxtamebranal intracelular de la proteína (Zhu 1994). Las otras isoformas difieren en la presencia o ausencia de un único residuo de serina en la región de inserto de cinasa de c-Kit (Crosier 1993). Las células germinales postmeióticas expresan un transcrito más corto que codifica para una versión truncada de c-Kit (tr-Kit) la cual contiene únicamente la segunda parte del dominio de cinasa y el COOH-terminal, ésta variación de c-Kit no tiene actividad de cinasa (Rossi 1992); a pesar de ello, tr-Kit es capaz de señalar probablemente funcionando como proteína de andamio (Paronetto 2003).

La proteína de c-Kit se compone de 976 aa, pesando aproximadamente 110 kDa; sin embargo, al madurar c-Kit es *N*-glicosilado de manera heterogénea incrementando su peso a un rango de 145 a 160 kDa (Qiu 1988; Yarden 1987). Existen hasta nueve sitios de *N*-glicosilación en c-Kit, la mayoría de los cuales están concentrados en el

dominio extracelular muy cerca de la membrana plasmática. Otras modificaciones post-traduccionales en c-Kit conocidas son la fosforilación en residuos de tirosina y serina, tanto constitutivos como inducida la fosforilación en residuos de serina en respuesta a la unión del ligando (Blume-Jensen 1994), lo cual puede ser importante para una respuesta apropiada del receptor. Además, se ha reportado una forma soluble de c-Kit que es proteolíticamente generada, es capaz de unirse al SCF y circula en el suero sanguíneo a altas concentraciones, sin embargo su papel en la modulación de la actividad del SCF *in vivo* aún no ha sido esclarecida (Wypych 1995). Finalmente, la ubiquitinación inducida por la unión al ligando es la responsable de regular la internalización y degradación de c-Kit (Masson 2006; Sun 2007; Zeng 2004).

La activación de los factores de crecimiento siempre requiere de la dimerización u oligomerización de las moléculas monoméricas de los receptores (Lemmon 2010). La dimerización de c-Kit es por lo general inducida por la unión con el ligando, sin embargo en algunos casos la dimerización puede llevarse a cabo de forma independiente (Lennartsson 2012).

La cinética de activación de c-Kit es rápida y la dimerización puede ser detectada minutos después de la adición del ligando (Broudy 1998). La dimerización de c-Kit es inducida por la interacción simultánea del SCF homodimerizado con dos monómeros del receptor (Lemmon 1997). Se sabe que sólo los tres primeros dominios tipo Ig de la región extracelular de c-Kit son los responsables de reconocer al SCF, pues tienen una forma y carga complementaria que permite la unión estrecha con el SCF, además después de la unión estos tres dominios no sufren cambios estructurales (Yuzawa 2007; Zhang 2000). Por otra parte, la unión con el SCF también induce un cambio conformacional que permite la generación de interacciones homotípicas entre los dominios extracelulares tipo Ig 4 y 5 de dos monómeros de c-Kit adyacentes (Yuzawa 2007). Como consecuencia de lo anterior, las regiones transmembranales de los monómeros se acercan más una a la otra (15 Å); lo que potencialmente hace posible interacciones proteína-proteína entre las regiones transmembranales. Estas interacciones acercan entre sí a los dominios intracelulares con actividad de cinasa de tirosinas, posicionándolos de una manera óptima para su activación y subsecuente trans-fosforilación (Figura 12) (Lennartsson 2012).

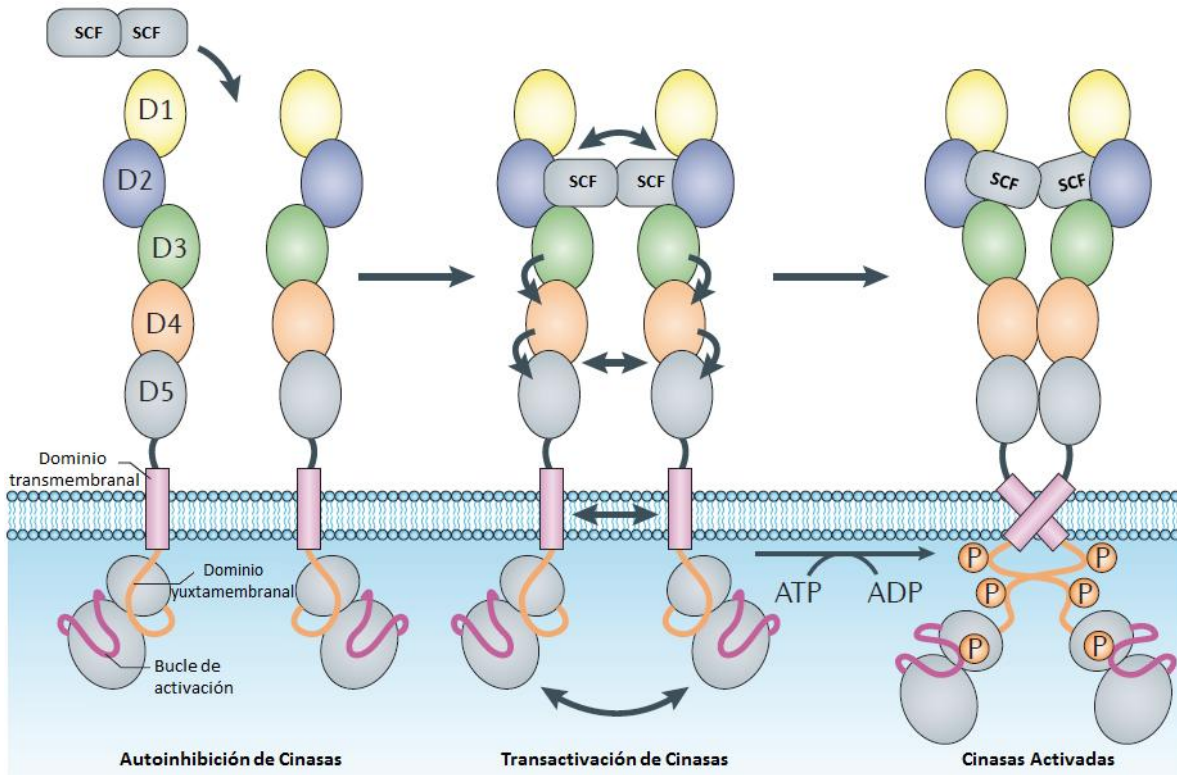


Figura 12| Representación esquemática del mecanismo de activación de c-Kit inducido por la unión con el SCF. (Izquierda) Los dominios con actividad de cinasa de tirosinas son autoinhibidos en *cis* por el dominio yuxtamembranal. Interacciones repulsivas entre los dominios 4 y 5 pueden evitar la asociación de los monómeros de c-Kit en ausencia de ligando. (Centro) La unión no covalente del SCF con los dominios 1, 2 y 3, provoca un cambio conformacional en los monómeros de c-Kit, los acerca y facilita interacciones homotípicas entre los dominios 4 y 5, y los dominios transmembranales. (Derecha) El homodímero del SCF sufre un cambio en su eje horizontal durante la formación del complejo ternario. El ensamblaje ternario extracelular, induce interacciones entre las regiones intracelulares, liberando al dominio yuxtamembranal de su posición inhibitoria. Esto hace posible y eficiente la trans-fosforilación del dominio yuxtamembranal (Tyr568 y 570), permitiendo la posterior auto-fosforilación de la región del inserto de cinasa (Tyr703, 721,730 y 747), del dominio de cinasa (Tyr823 y 900) (por cinasas Src), y del COOH-terminal (Tyr936). (Figura modificada de Verstraete 2012).

c-Kit ha sido cristalizado tanto en estado inactivo como en estado activo en unión a su ligando, permitiendo así conocer estructuralmente el complejo c-Kit/SCF y cómo la dimerización del receptor inicia el proceso de señalización (Figura 13) (Mol 2003; Yuzawa 2007). Adicionalmente, se ha observado que c-Kit adopta una estructura canónica de cinasa, con dos dominios de cinasa, entre los que se encuentra el sitio de unión al ATP y el sitio activo. Por otra parte, se ha dilucidado el proceso de activación del receptor. En el estado inactivo, la región yuxtamembranal forma un bucle en forma de horquilla que se inserta en el sitio activo bloqueando la α C-hélice y el sitio de unión al ATP, suprimiendo la actividad de cinasa (Chan 2003). Para su activación, el proceso de dimerización de c-Kit es inducido por el SCF y posteriormente estabilizado por las interacciones

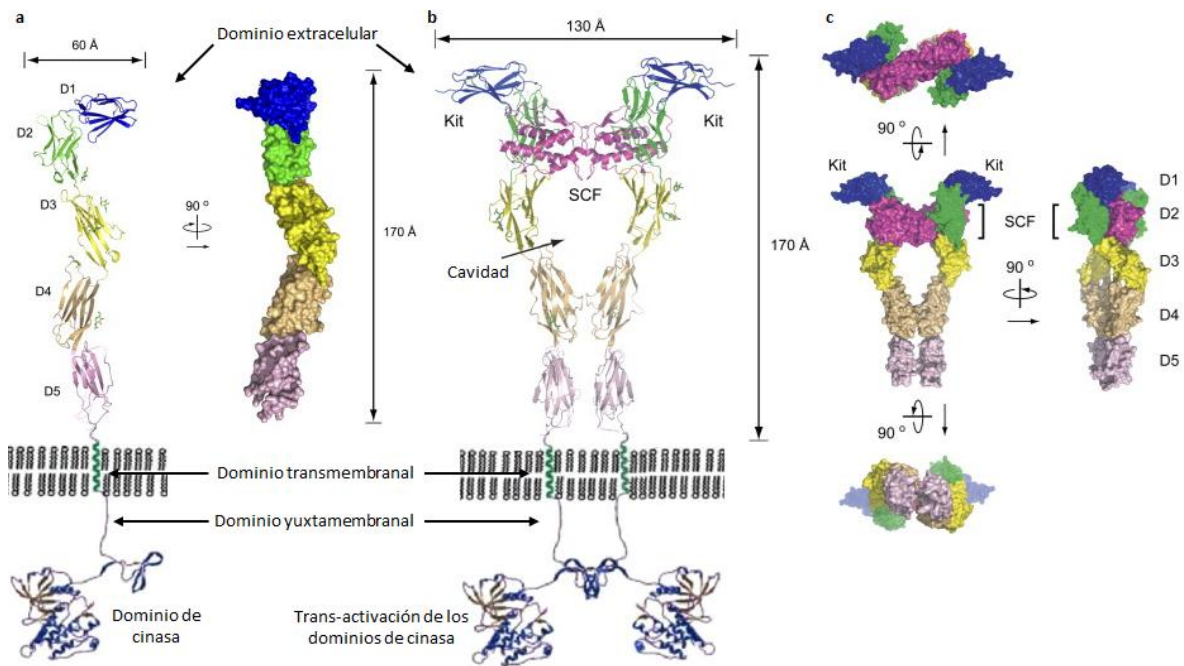


Figura 13| Esquema de la estructura molecular de c-Kit en su forma inactiva y activa unido al SCF. (a) Diagrama de cinta de un monómero de c-Kit en su conformación inactiva (izquierda) y representación de la superficie del dominio extracelular del mismo monómero habiendo sido rotado 90° en el eje vertical (derecha). (b) Diagrama de cinta del complejo SCF/c-Kit, dónde los monómeros de c-Kit interactúan, forman una cavidad y sufren un cambio conformacional que provoca la trans-activación de los dominios de cinasa. (c) Representación de la superficie extracelular del complejo SCF/c-Kit. Las figuras muestran una vista del complejo desde arriba (arriba), de frente (centro izquierda), de lado (centro derecha) y de abajo (abajo). Las imágenes muestran que el homodímero del SCF interactúa simétricamente con los dominios 1, 2 y 3 de ambos monómeros de c-Kit. Adicionalmente, se observa como los dominios 4 y 5 interactúan homofílicamente a través de contactos laterales entre los monómeros de c-Kit. Los dominios tipo inmunoglobulina (D) están representados de distinto color cada uno. El SCF está representado de color magenta en todos los casos. Los carbohidratos unidos a asparaginas de los dominios extracelulares de c-Kit se muestran en color verde en los diagramas de cinta. (Figura modificada de Mol 2003; Yazawa 2007).

homotípicas entre los dominios Ig 4 y 5 de los monómeros adyacentes de c-Kit, lo que provoca un cambio conformacional en la región intracelular de cada monómero. Este cambio conformacional y el acercamiento entre los dominios de cinasa permite que éstos trans-fosforilen al dominio yuxtamembranal en los residuos de tirosina Tyr568 y Tyr570, liberando completamente este dominio de su configuración inhibitoria (DiNitto 2010; Mol 2003; Mol 2004). Posterior a la trans-fosforilación de los dominios yuxtamembranales, los dominios de cinasa proceden a la auto-fosforilación de otros residuos de tirosina de forma ordenada, primero la región yuxtamembranal, seguida del inserto de cinasa y al final el bucle de activación (DiNitto 2010). Ocho residuos de tirosina han sido detectados *in vivo* como sitios de fosforilación (Tyr568, 570, 703, 721, 730, 823, 900 y 936) (Lennartsson 2005) y dos *in vitro* en el dominio de cinasa activado (Tyr547 y 553) (DiNitto 2010). De los residuos de tirosina identificado *in vivo* como sitios de fosforilación, siete,

incluidos los de la región yuxtamembranal involucrados en la regulación de la actividad de cinasa, actúan como sitios de acoplamiento para moléculas de señalización con dominios homólogos Src 2 (SH2), que a su vez desencadenan vías de transducción de señales intracelulares (Lennartsson 2012).

Las vías de señalización activadas por c-Kit mejor conocidas son: la vía de la cinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K), la de la familia de cinasas sarcoma (Src), la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la vía de la fosfolipasa C γ (PLC γ), y la vía de la cinasa Janus y el transductor de señal y activador de la transcripción (JAK-STAT). Es importante destacar que las vías de señalización activadas por la unión del SCF con c-Kit, no operan de forma aislada si no que están integradas y pueden activarse al mismo tiempo. Esto se debe a que distintos sitios de fosforilación sirven como sitios de acoplamiento de diversas proteínas involucradas en las vías de señalización antes descritas. Cada una de las vías activadas tiene funciones que en algunos casos son distintas y en otros redundantes, pero que dependiendo del tipo celular y del contexto fisiológico en cuestión los procesos celulares que inducen son proliferación, diferenciación, sobrevivencia, migración y producción de citocinas (Figura 14) (Lennartsson 2012).

Por otra parte, se ha demostrado que c-Kit interactúa directamente con otros tipos de receptores membranales, generando una activación sinérgica entre el SCF y otras citocinas como la interleucina 33 (Drube 2010), interleucina 7 (Jahn 2007), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (Lennartsson 2004) y la eritropoyetina (Wu 1995), promoviendo la proliferación de células hematopoyéticas.

La atenuación de la señalización de c-Kit es importante para obtener una intensidad y duración de señalización adecuada respecto a las necesidades del proceso biológico que se desarrolle. Existen al menos tres niveles de atenuación de la función de c-Kit, las cuales actúan de forma concertada: (1) internalización y degradación del receptor, (2) inactivación del dominio de cinasa mediante la fosforilación de residuos de serina y (3) defosforilación de tirosinas (Lennartsson 2012).

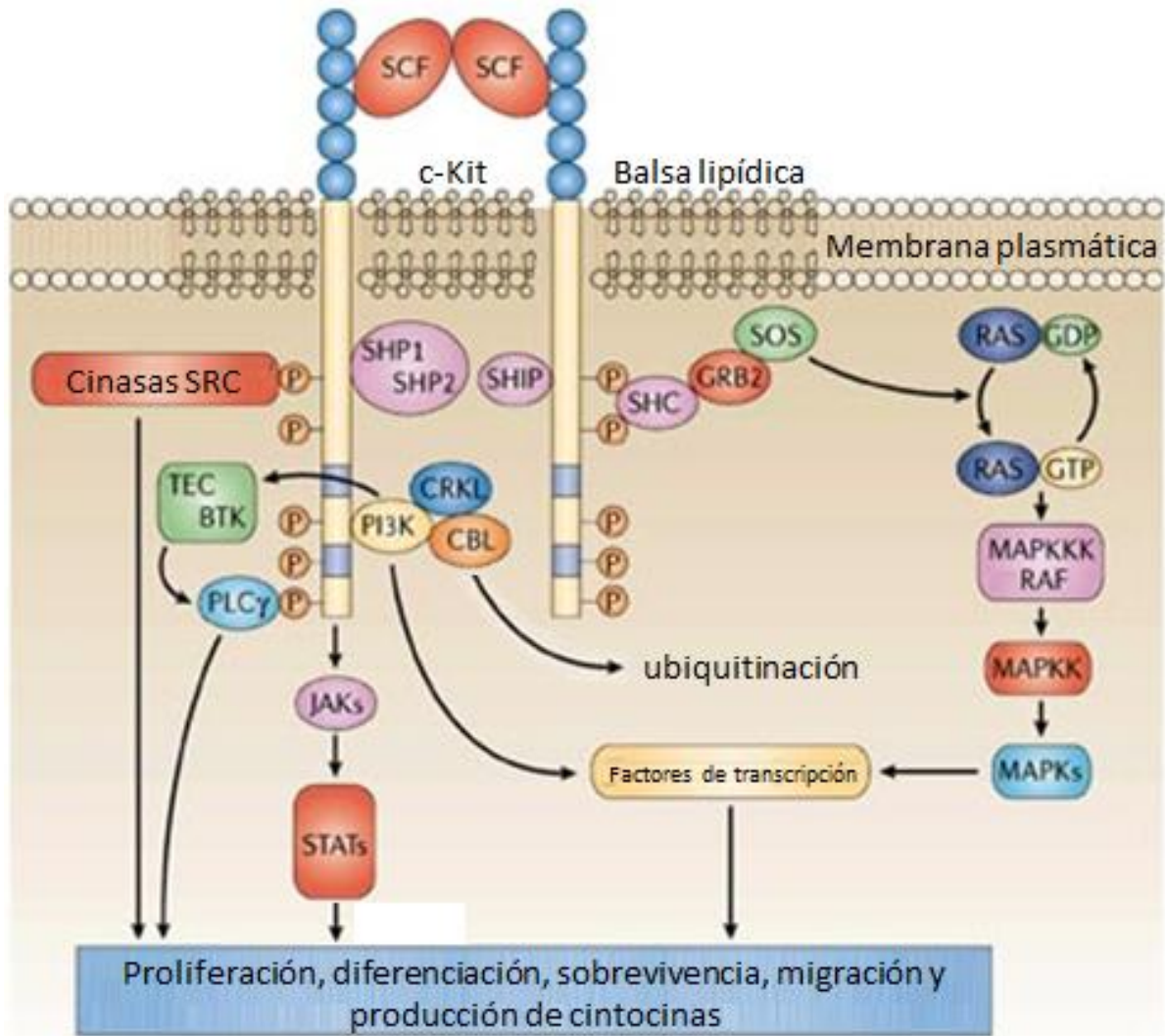


Figura 14| Esquema de las vías de señalización activadas por la dimerización de c-Kit inducida por el SCF. Los sitios fosforilados durante la activación de c-Kit, son sitios de acoplamiento para: proteínas adaptadoras intracelulares como SHC y GRB2; proteínas de la familia de cinasas Src; y para las proteínas de señalización PLC γ y PI3K. La activación subsecuente de estas proteínas de señalización, así como de las vías de señalización JAK-STAT y MAPK, promueve la proliferación, diferenciación, supervivencia, migración y producción de citocinas según el tipo celular y el contexto fisiológico en cuestión. Abreviaturas del esquema: “Bruton’s tyrosine kinase” (BTK), “casitas B-lineage lymphoma” (CBL), “chicken tumour virus no. 10 [CT10] regulator of kinase - like” (CRKL), “guanosine diphosphate” (GDP), “growth-factor-receptor-bound” (GRB2), “guanosine triphosphate” (GTP), “Janus kinase-signal transducer” (JAK), “mitogen-activated protein kinase” (MAPK), “MAPK kinases” (MAPKK), “MAPKK kinases” (MAPKKK), “phosphatidylinositol 3-kinase” (PI3K), “phospholipase C γ ” (PLC γ), “rapidly accelerated fibroblastoma” (RAF), “rat sarcoma” (RAS), “Stem Cell Factor” (SCF), “Src homology 2 (SH2)-domain-containing transforming protein C” (SHC), “SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase” (SHIP), “SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase” (SHP), “son of sevenless homologue” (SOS), “signal transducer and activator of transcription” (STAT), “tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma” (TEC). (Figura modificada de Gilfillan 2006).

La mono-ubiquitinación de residuos de lisina de receptores de membrana, ha sido asociada con su posterior internalización (Haglund 2003). Una vez internalizado, el receptor c-Kit activado es degradado proteolíticamente tanto en lisosomas como en proteosomas (Miyazawa 1994; Zeng

2004). Posterior a la degradación, la membrana celular es repoblada por receptores c-Kit mediante su síntesis proteica (Shimizu 1996). Por otra parte, la activación de c-Kit induce una retroalimentación negativa, ya que incrementa la actividad de la proteína cinasa C (PKC). PKC fosforila a los residuos de serina 741 y 746, lo que inactiva al dominio de cinasa del receptor (Blume-Jensen 1993; Blume-Jensen 1995; Edling 2007). Además, el dominio extracelular de c-Kit puede ser liberado de la membrana plasmática como consecuencia de la activación de PKC (Yee 1994).

Además, como sucede con la mayoría de RTKs, la fosforilación de residuos de tirosina de c-Kit es contrarrestada por proteínas con actividad de fosfatasa de tirosinas, en particular se ha observado que SHP1 se une y desfosforila residuos de tirosina de c-Kit, aunque posiblemente hay un gran número de fosfatasas que regulan los eventos de señalización desencadenados por c-Kit (Kozlowski 1998; Paulson 1996).

1.6.- Stem Cell Factor y c-Kit en el Cáncer

El primer indicio de la existencia de c-Kit se dio en 1986, cuando el oncogen viral v-c-Kit fue identificado como el gen transformante del virus del sarcoma felino Hardy-Zuckerman 4 (de ahí su nombre “c-Kit” tomado de “kitten”; gatito en español) (Besmer 1986). Poco después, el gen homólogo de humano fue clonado y secuenciado (Yarden 1987). Actualmente, se sabe que c-Kit está involucrado en numerosos cánceres humanos, como el carcinoma pulmonar de células pequeñas, melanomas, mastocitomas, cáncer colorectal, carcinoma testicular, leucemia mieloide aguda y en más del 80% de los tumores de estroma gastrointestinal (Lennartsson 2012).

Desde hace algunos años, c-Kit ha sido clasificado como un proto-oncogen, es decir que su sobre-expresión o mutación puede conducir a cáncer. De hecho, se considera que la señalización descontrolada de c-Kit y de los otros miembros de la familia III de RTKs puede ser un factor inductor de la transformación oncogénica, y que la señalización aberrante de los mismos está indirectamente implicada en la carcinogénesis influyendo en la biología del tumor y la metástasis (Vestrate 2012). La transformación oncogénica, relacionada a esta clase de receptores, puede ser causada por una variedad de eventos como mutaciones intra-génicas con ganancia de función en el gen que codifica para el receptor (dónde el receptor puede activarse de manera independiente a la unión de su ligando), fusión de genes como resultado de re-arreglos cromosomales, sobre-

expresión del ligando y/o receptor y circuitos de retroalimentación autócrina (Toffalini 2010), como se explica a continuación.

En algunos cánceres, como el tumor de estroma gastrointestinal (GIST), se cree que las mutaciones con ganancia de función en c-Kit son el principal evento que provoca el desarrollo tumoral. El GIST es el sarcoma más común del tracto gastrointestinal humano y casi todos expresan c-Kit. Además, el 70-80% de los GISTs tienen mutaciones en el gen de c-Kit con ganancia de función (Antonescu 2011; Corless 2011). Por otra parte, se sabe que la mayoría de los GISTs producen SCF, lo que sugiere la existencia de un mecanismo autócrino/parácrino, el cual podría cooperar en el desarrollo del cáncer (Theou-Anton 2006). Sin embargo, se cree que el principal factor oncogénico de los GISTs son las mutaciones con ganancia de función (Lennartsson 2006). Las mutaciones con ganancia de función en c-Kit pueden ser divididas en dos clases: las que suceden en la región yuxtamembranal y las que suceden cerca del bucle de activación. Se sabe que el dominio yuxtamembranal regula negativamente la actividad del dominio de cinasa de tirosinas (Chan 2003), por lo que mutaciones en este dominio afectan su interacción con el dominio de cinasa, liberándolo de su posición inhibitoria. Además, mutaciones puntuales en el dominio yuxtamembranal pueden inducir la dimerización constitutiva de c-Kit (Kitayama 1995). Ambos eventos promueven la activación del dominio de cinasa. El otro sitio donde frecuentemente hay mutaciones con ganancia de función es cerca del bucle de activación, particularmente en el codón 816, que se encuentra en el segundo sub-dominio de cinasa, y el cuál al cambiarse el residuo de ácido aspártico por un residuo de tirosina, histidina, asparagina o valina, se produce la activación independiente de ligando (Moriyama 1996). Mutaciones en el dominio yuxtamembranal, incluyendo deleciones, mutaciones puntuales, duplicaciones en tándem o combinaciones de éstas, son comúnmente observadas en pacientes con GIST (Lennartsson 2006). No obstante, también otros tipos de tumores han presentado este tipo de mutaciones, como linfomas (Hongyo 2000) y mastocitosis sistémica (Buttner 1998). Mutaciones en el dominio de cinasa son frecuentemente observados en mastocitosis (Longley 1996; Nagata 1995), leucemia de células cebadas, leucemia mieloide aguda (Ashman 2000), tumores de células germinales testiculares (Tian 1999), disgerminoma ovárico (Pauls 2004) y germinomas intracraneales (Sakuma 2004).

Por otra parte, la sobre-expresión de c-Kit, del SCF o de ambos, puede inducir un circuito autócrino, el cual se ha observado contribuye al progreso canceroso (Mosesson 2004). Los tipos de

cáncer en los que se ha observado la expresión simultánea de c-Kit y su ligando son carcinoma mamario, carcinoma colorectal, carcinoma pulmonar de células pequeñas, cánceres ginecológicos y neuroblastomas (Heinrich 2002). En efecto, se considera que los circuitos autócrinos podrían ser la base del desarrollo y progresión de los cánceres donde se sobre-expresen el receptor y el ligando, ya que este mecanismo promueve la proliferación de las células cancerosas y/o las protege de la muerte celular (Lennartsson 2006). Aunado a lo anterior, la expresión ectópica de c-Kit es considerada un factor que contribuye a la progresión del fenotipo maligno. Por ejemplo, de manera fisiológica solo un pequeño número de células del sistema hematopoyético expresa a c-Kit, por el contrario, se ha observado que en pacientes con leucemia mieloide aguda, alrededor del 85% de células leucémicas expresan c-Kit (Broudy 1992; Heinrich 2002), además se ha reportado que células de leucemia mieloide aguda expresan SCF y proliferan más al ser estimuladas con SCF, lo que sugiere la existencia de un circuito autócrino de proliferación (Ikeda 1991; Ikeda 1993; Kanakura 1993). Asimismo se ha reportado la existencia de un circuito autócrino mediado por la co-expresión del SCF y c-Kit, el cual induce la proliferación de células pequeñas de cáncer de pulmón (Krystal 1996). Por otra parte, se ha demostrado la sobre-expresión de c-Kit en el oncocitoma renal y en el carcinoma cromóforo renal (Huo 2005), en contraste, no se ha observado sobre-expresión de c-Kit en otros tipos de cánceres renales, sugiriendo un papel de c-Kit en estos tipos de cáncer renal. Adicionalmente, se ha reportado la sobre-expresión de c-Kit en el 70% de pacientes con carcinoma pulmonar de células pequeñas (Hida 1994; Sekido 1991), aunado a la expresión concomitante de c-Kit y SCF generando un circuito autócrino (Hibi 1991). En general, se considera que la expresión ectópica y la sobre-expresión de c-Kit provocan una hipersensibilidad al SCF por parte de las células cancerosas; de hecho, se cree que la sobre expresión de c-Kit y del SCF en tumores estimula la proliferación de manera autócrina y parácrina (Heinrich 2002; Lennartsson 2006). Por otra parte, si el nivel de sobre-expresión de c-Kit es lo suficientemente alto, se puede inducir incluso la activación del receptor de manera independiente a la unión del ligando sin que existan mutaciones en el receptor de por medio (Figura 15) (Lennartsson 2006).

Adicionalmente, la expresión del ARNm correspondiente a la versión trunca de c-Kit (tr-Kit) ha sido detectada en 30% de las líneas celulares de tumores gastrointestinales y hematológicos examinados (Takaoka 1997).

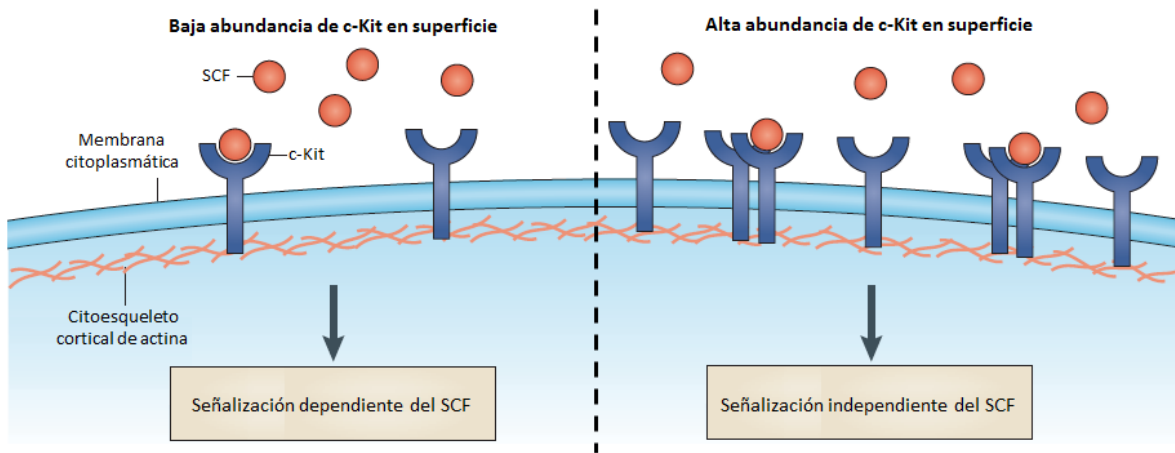


Figura 15| Esquema del efecto de la abundancia y distribución de c-Kit en la superficie celular. El control de la abundancia y distribución de c-Kit en la superficie celular es un elemento clave en la homeostasis celular, ya que la activación de las vías de señalización depende de la dimerización del receptor. Una gran abundancia local de c-Kit puede promover su homo-dimerización independiente del ligando y activar vías de señalización de manera anómala, induciendo un fenotipo canceroso. Distintos dominios en la membrana plasmática, así como el dinámico citoesqueleto cortical de actina tienen un papel importante en la distribución y activación de c-Kit tanto dependiente como independiente del SCF. (Figura modificada de Casaletto 2012).

En resumen, en la mayoría de los tumores en los que c-Kit promueve un fenotipo canceroso, su dominio de cinasa es activado de manera anómala. En consecuencia, la actividad de c-Kit es desregulada, provocando que diferentes vías de señalización sean sobre-activadas, de tal forma que por lo general, la sobrevivencia y proliferación de estas células se ve patológicamente incrementada. De esta forma se considera que c-Kit contribuye a la formación y progresión del cáncer en cuestión (Lennastsson 2006). Por lo tanto, la detección y caracterización de la expresión y funcionalidad de c-Kit en los tipos tumorales donde su participación se sospeche es imperante; por ejemplo, en el cáncer de próstata.

1.7.- Stem Cell Factor y c-Kit en el Cáncer de Próstata

Se ha investigado el patrón de expresión del SCF y de c-Kit en tejido de próstata sana, hiperplasia prostática benigna (HPB), adenocarcinoma prostático primario y metástasis de cáncer de próstata. Para reconocer estos patrones de expresión, es relevante identificar los tipos celulares que conforman tanto al parénquima como al estroma de la próstata (Figura 16).

En cortes histológicos de tejido de próstata sana se ha encontrado que tanto células intersticiales de Cajal del tejido fibromuscular prostático como células cebadas residentes del tejido prostático expresan altos niveles de la proteína SCF (Lammie 1994). Por otra parte, se observaron bajos

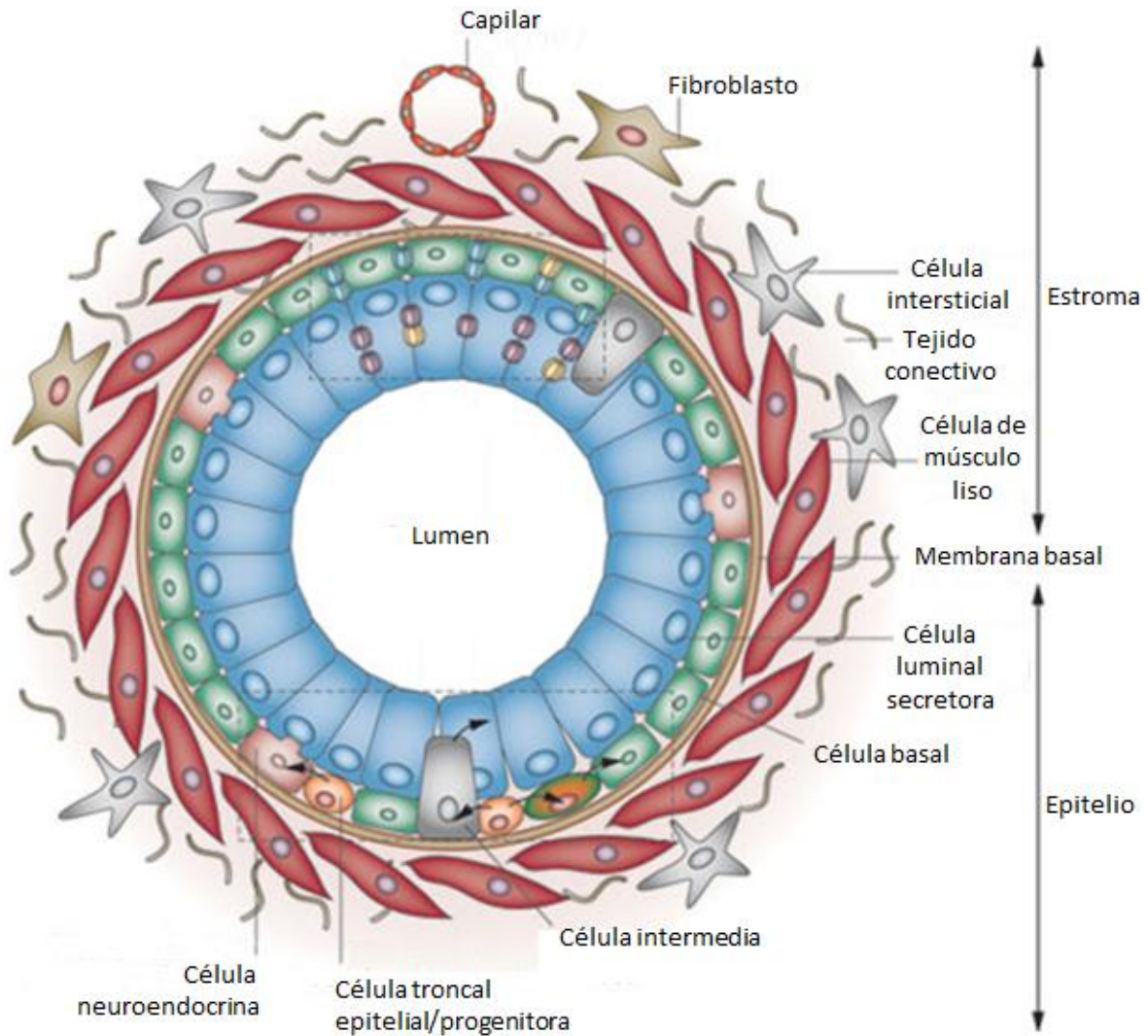


Figura 16| Modelo de los tipos celulares que conforman y mantienen el parénquima de la próstata. Las células troncales del epitelio prostático situadas en la capa basal de la próstata se diferencian en células basales, neuroendocrinas y progenitores luminales; los progenitores luminales dan origen a células luminales secretoras maduras. Las flechas unidireccionales representan el flujo de diferenciación de las células epiteliales. Las flechas bidireccionales agrupan los tipos celulares estromales y epiteliales. (Figura modificada de Czyż 2012).

niveles de ARNm del SCF principalmente en células de la capa basal (Simak 2000) así como expresión de la proteína SCF en estas mismas células (Imura 2012). La proteína c-Kit en la próstata sana se ha encontrado también en células intersticiales de Cajal y células cebadas residentes, pero no en células epiteliales (Imura 2012; Shafik 2005; Simak 2000; Van der Aa 2003). ARNm de c-Kit ha sido detectado en bajos niveles y con un patrón heterogéneo en células basales epiteliales de los ductos y acinos prostáticos (Imura 2012; Simak 2000).

En cortes histológicos de próstata de pacientes con HBP, se ha reportado la expresión de la proteína SCF en células intersticiales, células cebadas y en células basales epiteliales de acinos de la próstata. La inmuno-tinción del SCF en las células epiteliales fue muy diferente a la observada en la próstata sana, mostrando una tinción heterogénea e intensa en el citoplasma, así como una frecuencia de expresión del 24% (13 de 53) (Simak 2000) al 95% (21 de 22) (Wiesner 2008) de los cortes histológicos analizados. Importantemente, la inmuno-reactividad más pronunciada se observó en los nódulos hiperplásicos (Simak 2000). Se ha reportado también, la expresión de la proteína c-Kit en células basales epiteliales en un intervalo del 5% (1 de 22) (Wiesner 2008) al 17% (9 de 53) (Simak 2000) de los cortes histológicos analizados; en los casos positivos, el patrón de expresión se observó principalmente en acinos de nódulos hiperplásicos (Simak 2000). La co-expresión de las proteínas SCF y c-Kit en células basales epiteliales se observó en 9% (5 de 53) de los tejidos analizados (Simak 2000). Por otra parte, se ha observado que el número de células intersticiales que expresa al receptor c-Kit aumenta hasta tres veces en los cortes de próstata de pacientes con HBP que en cortes de próstata sana, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Imura 2012).

En cortes histológicos de adenocarcinomas prostáticos primarios se ha observado la expresión del SCF en células del estroma fibromuscular y en células epiteliales cancerosas. La inmuno-tinción observada en las células cancerosas es heterogénea pero muy pronunciada, y la frecuencia de expresión del SCF en células epiteliales cancerosas de las muestras analizadas va del 39% (18 de 46) (Simak 2000) al 95% (20 de 21) (Wiesner 2008). Interesantemente, aunque en bajos niveles, los transcritos del SCF y de c-Kit fueron detectados en las células cancerosas de todas las muestras analizadas (Simak 2000). La inmuno-tinción de c-Kit en células epiteliales cancerosas ha sido reportada en distintos porcentajes en distintos trabajos como se describe a continuación:

En el 2000, Simak *et al* reportaron que en 0.02% (1 de 46) de los cortes histológicos de adenocarcinomas prostáticos analizados se observó la expresión de la proteína c-Kit en células epiteliales cancerosas. En particular, grupos de células cancerosas mostraron una fuerte inmuno-tinción tanto citoplásmica como membranal, así como un número mayor de células cebadas en áreas peritumorales y endotumorales. Como se esperaba, también se detectó la expresión de c-Kit en células del estroma fibromuscular de todas las muestras analizadas. Importantemente, en este trabajo no se reporta ni la edad de los pacientes ni el grado de avance de los tumores analizados.

En el 2004, Di Lorenzo y colaboradores reportaron la expresión de c-Kit en las células estromales de la zona transicional del tejido prostático de todas las muestras que analizaron. Por otra parte, la expresión de c-Kit en células epiteliales cancerosas fue detectada en 27% (26 de 94) de los cortes histológicos de adenocarcinomas prostáticos. La expresión epitelial se encontró en la zona periférica del tejido prostático. Interesantemente, de los 94 pacientes que formaron parte de este estudio 13 tuvieron recaída; de los cuales 7 fueron positivos a la expresión de c-Kit y 6 no. Es decir, 27% (7 de 26) de pacientes con células epiteliales cancerosas que expresaban c-Kit sufrieron recaída después de haber sido tratados mediante cirugía, mientras que 9% (6 de 68) de pacientes sin células epiteliales cancerosas positivas a c-Kit recayeron. Di Lorenzo *et al*, concluyeron que a pesar de no ser estadísticamente significativo ($p=0.055$), parece haber un mayor riesgo de recurrencia cuando las células epiteliales cancerosas expresan c-Kit que cuando no. Los cortes histológicos fueron tomados de prostatectomía radical realizada como terapia a 94 pacientes de entre 64 y 79 años de edad, con una edad media de 68 años. El valor de PSA previo a la cirugía se encontró entre 11 y 20 en 70 pacientes y >20 en los otros 24, mientras que el valor Gleason fue de 8 en 49 pacientes y 9 en 45. Se considera que todos los pacientes que formaron parte de este estudio tenían un cáncer de próstata avanzado de alto riesgo.

En el 2008, Wiesner *et al* reportaron que en 14% (3 de 21) de cortes histológicos de cáncer de próstata primario detectaron células epiteliales cancerosas que expresaban c-Kit. La expresión de c-Kit por células epiteliales no fue detectada en tumores primarios con un valor Gleason menor a 7, y solo en 25% (3 de 12) de tumores con un valor Gleason igual o mayor a 7 se observó la expresión de c-Kit en el compartimento epitelial. Las muestras fueron obtenidas de 21 pacientes de entre 54 y 74 años de edad mediante prostatectomía radical como terapia. 43% (9 de 21) de los tumores analizados tenían un valor Gleason de 5 a 6, y 57% (12 de 21) de tumores tuvieron un valor Gleason igual o mayor a 7.

Por otra parte, en el 2004 Paronetto y colaboradores reportaron la expresión de la versión trunca de c-Kit (tr-Kit) producto del "splicing" alternativo del ARNm de c-Kit (Figura 17) en tumores primarios de cáncer de próstata. Detectaron que en 43% (10 de 23) de los cortes histológicos de cáncer de próstata primario analizados, células epiteliales de glándulas prostáticas neoplásicas expresaban a tr-Kit, mientras que glándulas normales de la región contra-lateral, (definida como la región de la próstata que aún no ha sido invadida por el tumor), no mostraron inmuno-tinción

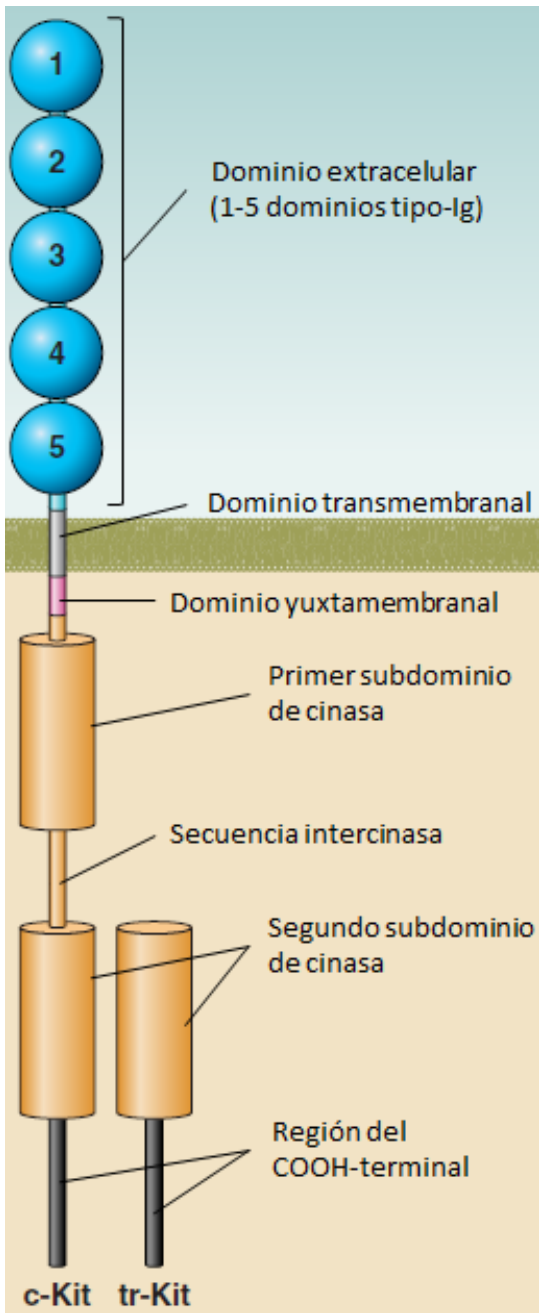


Figura 17] Representación de los dominios estructurales de c-Kit y tr-Kit. Los dominios estructurales de tr-Kit comprenden una secuencia corta del segmento de intercinasa, el segundo subdominio de cinasa que es el dominio de fosfotransferasa y la región del carboxilo terminal del receptor. tr-Kit no contiene el sitio de unión al ATP, por lo que se considera que es catalíticamente inactivo (Toyota 1994); sin embargo parece tener la capacidad de señalizar mediante la interacción directa con el dominio SH2 de las cinasas tipo Src (Sette 2002). (Figura modificada de Lennartsson 2012).

contra tr-Kit. Encontraron además que 28% (4 de 14) de pacientes con un valor Gleason de 4 a 6 y 66% (6 de 9) de pacientes con un valor Gleason de 7 a 9 expresaban a tr-Kit. En contraste, en 0% (0 de 3) de las HBP analizadas se detectó la expresión de tr-Kit. Este resultado sugiere que la expresión de tr-Kit se correlaciona directamente con el nivel avance del tumor prostático. Adicionalmente, encontraron una correlación positiva entre la expresión de tr-Kit y la fosforilación en tirosinas de Src y de la proteína adaptadora Sam68. Src tiene un papel importante en la proliferación y transformación metastásica de células de cáncer de próstata (Migliaccio 2000; Slack 2001); Sam68 es una proteína de andamiaje en la vía de señalización de Src (Paronetto 2003, Fusaki 1997), aparentemente involucrada en el control de la proliferación celular (Liu 2000). Las muestras de tumores y tejido prostático contra-lateral fueron obtenidas de 23 pacientes de entre 58 y 77 años de edad a los que se les practicó una prostatectomía radical como terapia. Las muestras de HBP fueron obtenidas de pacientes a los que se les realizó una prostatectomía debido a la sospecha de HBP, posterior a su consentimiento informado.

En resumen, la expresión de c-Kit en células epiteliales cancerosas de tumores prostáticos con un valor Gleason menor a 7 no ha sido detectada (Wiesner 2008), pero la expresión de

tr-Kit se ha observado en 28% (4 de 14) de este tipo de muestras (Paronetto 2004). En contraste, en los tumores con un valor Gleason mayor o igual a 7 se ha detectado la expresión de c-Kit en 25% (3 de 12) (Wiesner 2008) a 27% (26 de 94) (Di Lorenzo 2004), así como la expresión de tr-Kit en 66% (6 de 9) de los tumores analizados (Paronetto 2004). Adicionalmente, podría haber una correlación directa entre la expresión de c-Kit por parte de las células epiteliales de cáncer de próstata y el riesgo de recaída posterior a la prostatectomía radical (Di Lorenzo 2004); asimismo la expresión ectópica de tr-Kit podría contribuir a la transformación celular mediante la activación de cinasas Src (Paronetto 2004).

Por otra parte, a partir de biopsias obtenidas de autopsias de pacientes con cáncer de próstata, Wiesner y colaboradores reportaron la expresión del SCF y c-Kit en muestras de metástasis óseas. En 85% (17 de 20) de las muestras se detectó la expresión del SCF en los compartimentos epiteliales de las metástasis. La expresión de c-Kit en células epiteliales cancerosas de metástasis óseas se detectó en 40% (8 de 20) de las muestras. En este estudio, la diferencia en la expresión de c-Kit entre células epiteliales de HBP y células epiteliales cancerosas de metástasis ósea fue estadísticamente significativa.

En la tabla 4 se resumen las frecuencias de expresión de las proteínas del SCF y c-Kit en distintos tipos de tejido epitelial prostático, obtenidas a partir de cortes histológicos analizados por inmunohistoquímica. Desde luego, las diferencias en los resultados pueden deberse a variaciones técnicas, como el uso de distintos protocolos de fijación de tejido, uso de distintos anticuerpos, así como diferencias en la selección de pacientes (Di Lorenzo 2004; Wiesner 2008).

Adicionalmente se ha investigado la expresión del SCF y de c-Kit en las líneas celulares de cáncer de próstata DU145, LNCaP y PC3. La línea celular DU145 fue aislada de una metástasis cerebral de adenocarcinoma prostático de un hombre de 69 años, la morfología de las células es de tipo epitelial y éstas pueden crecer en mono-capa (Stone 1978). DU145 presenta un potencial metastásico moderado (Pulukuri 2005), forma colonias en agar suave (Savarese 1998) así como tumores en ratones desnudos con una alta similitud al tumor metastásico del paciente (Mickey 1977). Además, las células DU145 no son sensibles a hormonas (Alimirah 2006) y no expresan PSA (Stone 1978). Por su parte, la línea celular LNCaP fue aislada de una metástasis de cáncer de próstata en un nódulo linfático supraclavicular izquierdo de un hombre de 50 años, la morfología de las células es epitelial y pueden crecer en mono-capa (Horoszewicz 1983). El potencial

Frecuencias de expresión de las proteínas del SCF y c-Kit en tejido epitelial prostático					
Tipo de Tejido		SCF (%)	c-Kit (%)	No de muestras analizadas	Referencias
Próstata sana	Células epiteliales lumbales	0	0	4	Simak 2000
		0	0	10	Imura 2012
	Células epiteliales basales	0 100	0 0	4 10	Simak 2000 Imura 2012
Hiperplasia Benigna Prostática	Células epiteliales lumbales	0	0	53	Simak 2000
	Células epiteliales basales	24	17	53	Simak 2000
	Células epiteliales (NE)	95	5	22	Wiesner 2008
Cáncer de Próstata	Gleason < 7	-	0	9	Wiesner 2008
	Gleason ≥ 7	-	27	94	Di Lorenzo 2004
		-	25	12	Wiesner 2008
Gleason (NR)	39	0.02	46	Simak 2000	
	95	-	21	Wiesner 2008	
Metástasis ósea de Cáncer de Próstata		85	40	20	Wiesner 2008

Tabla 4 | Frecuencias de expresión del SCF y de c-Kit en tejido epitelial prostático analizado por inmunohistoquímica. NE = No especifican el tipo de célula epitelial; NR = No reportan el valor Gleason de las muestras analizadas.

metastásico de la línea celular LNCaP es bajo (Pulukuri 2005), forma colonias en agar suave (Savarese 1998) así como tumores en ratones desnudos, preserva diferenciación funcional, es responsiva a hormonas y produce PSA (Horoszewicz 1983). Por último, la línea celular PC3 fue aislada de una metástasis ósea de adenocarcinoma prostático de un hombre de 62 años, su morfología es de tipo epitelial y puede crecer en mono-capa (Kaighn 1979). Esta línea celular tiene un potencial metastásico alto (Pulukuri 2005), también forma colonias en agar suave y produce tumores en ratones desnudos (Kaighn 1979). Comparado con células epiteliales prostáticas sanas, el crecimiento de las células PC3 tiene una dependencia muy reducida al suero; además, las células PC3 no responden a andrógenos y no expresan PSA. Las características funcionales y morfológicas de PC3 son las de un adenocarcinoma poco diferenciado (Kaighn 1979).

Con respecto a la expresión del SCF y c-Kit en las líneas celulares antes mencionadas se ha reportado lo siguiente:

Savarese y colaboradores reportaron en 1998 la detección del ARNm del SCF, mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), en células DU145, LNCaP y PC3. Además, mediante el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) observaron que las células DU145 secretan al medio en promedio 62 ± 18 ng/mL, las células PC3 59 ± 40 ng/mL y las

células LNCaP <3 ng/mL de SCF después de 96 hrs. Por otra parte detectaron con inmunohistoquímica la expresión de c-Kit en las tres líneas celulares.

En el 2000, Simak *et al* confirmaron la presencia de ARNm del SCF en células DU145, LNCaP y PC3; por el contrario no detectaron la presencia de ARNm de c-Kit en ninguna de estas líneas celulares.

Küblet *et al* reportaron en el 2005 que mediante inmunohistoquímica no habían detectado la expresión de c-Kit en alguna de las líneas celulares DU145, LNCaP ni PC3.

En contraste, en el 2008 Wiesner y colaboradores reportaron una cuantificación relativa del ARNm del SCF y de c-Kit en las tres líneas celulares mediante la reacción en cadena de la polimerasa semi-cuantitativa en tiempo real, normalizando la expresión del SCF y c-Kit según la expresión basal de células estromales de médula ósea. Encontraron que respecto a la expresión basal de células estromales de médula ósea, la media relativa del ARNm del SCF fue mayor en DU145 y PC3, pero menor en LncAP; por su parte, la media relativa del ARNm de c-Kit fue menor en las tres líneas celulares. Adicionalmente, cuantificaron con ELISA la concentración de SCF en el medio condicionado y encontraron que las células DU145, LncAP y PC3 secretaron al medio en promedio 70, 25 y 20 pg/mL de SCF, respectivamente. Por otra parte, detectaron la presencia del SCF membranal en las tres líneas celulares mediante Western blot, con una mayor expresión en DU145 y PC3. No obstante, mediante la misma técnica solo detectaron la presencia de c-Kit en el extracto proteico de DU145. Posteriormente, usando un modelo de ratón “Severe combined immunodeficiency” (SCID) en los que habían implantado un trozo de fémur de humano, hicieron un xenotrasplante intra-óseo y sub-dérmico con células PC3. Mediante inmunohistoquímica y Western blot observaron que las células PC3 expresaban SCF. En contraste, con los mismos métodos encontraron que las células del trasplante sub-dérmico no expresaban c-Kit, a diferencia de las células trasplantadas a la médula ósea, las cuales expresaron en abundancia al receptor.

En el 2012, Ma *et al* cuantificaron mediante citometría de flujo el porcentaje de células DU145 y PC3 que expresaba c-Kit, y reportaron que en promedio el $0.75 \pm 0.33\%$ de células DU145 y el $0.6 \pm 0.1\%$ de células PC3 expresaban al receptor.

En resumen, se ha reportado la expresión ectópica de c-Kit en el cáncer de próstata (Di Lorenzo 2004; Simak 2000) y que dicha expresión se ve incrementada en los estadios más avanzados de este cáncer, incluyendo la metástasis ósea (Wiesner 2008). Además, se ha detectado la expresión

de c-Kit en líneas celulares de metástasis de cáncer de próstata (Ma 2012; Savarese 1998; Wiesner 2008). En consecuencia, se ha propuesto que la metástasis ósea del cáncer de próstata podría ser resultado de una diseminación o crecimiento selectivo, mediado en parte, por la expresión ectópica y activación de c-Kit (Patrawala 2006; Simak 2000). No obstante, aún no se conocen por completo los efectos del SCF en células de cáncer de próstata, los cuales podrían contribuir en el entendimiento del papel de c-Kit y su ligando en la metástasis del cáncer de próstata y corroborar, descartar o redefinir su importancia en la progresión del cáncer prostático hacia la metástasis ósea.

2.- Hipótesis

Se ha reportado que las células derivadas de cáncer de próstata expresan al receptor c-Kit y que éste es funcional, por lo que se espera que se incremente la proliferación, migración, sobrevivencia y el crecimiento independiente de anclaje de dichas células en respuesta a la estimulación con SCF.

3.- Objetivos

3.1.- Objetivo General

Evaluar el efecto del SCF en el potencial metastásico de las células de cáncer de próstata DU145 y PC3 mediante aproximaciones *in vitro*.

3.2.- Objetivos Particulares

- Analizar la expresión del gen de c-Kit en las células DU145 y PC3.
- Examinar la presencia de la proteína de c-Kit en las células DU145 y PC3.
- Determinar el porcentaje de células DU145 y PC3 que expresen al receptor c-Kit en la membrana citoplasmática.
- Investigar el efecto de concentraciones crecientes de SCF en la proliferación celular de DU145 y PC3 en el tiempo.
- Estudiar el efecto de concentraciones crecientes de SCF en la migración de células DU145 y PC3.

- Investigar el efecto de concentraciones crecientes de SCF en la muerte inducida por falta de nutrientes en células DU145 y PC3 en el tiempo.
- Evaluar el efecto de concentraciones crecientes de SCF en el crecimiento independiente de anclaje de células DU145 y PC3.

4.- Material y Métodos

4.1- Cultivos celulares

Se usaron las líneas celulares de metástasis de cáncer de próstata DU145 y PC3, así como la línea celular de leucemia eritroide K562. Las células DU145 y PC3 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Invitro) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) (ByProducts) y 0.6% de penicilina y estreptamicina (Invitro). Las células K562, derivadas de una eritroleucemia, son células no adherentes con forma esférica (Lozzio 1975), fenotípicamente similares a células mieloides en estadios tempranos de su desarrollo (Andersson 1979; Klein 1976; Lozzio 1981), fueron usadas como control positivo de la expresión de c-Kit (Ogawa 1994). Las células K562 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con 5% de SFB y 0.6% de penicilina y estreptamicina. Todos los ensayos se realizaron con medio RPMI 1640 con 10% de SFB y 0.6% de penicilina y estreptamicina. El SFB fue inactivado a 56°C por 30 min antes de ser adicionado al medio RPMI 1640. Todas las células y todos los ensayos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 95% aire y 5% CO₂.

4.2- Análisis de la expresión de c-Kit por RT-PCR

Se aisló ARN total usando el RNeasy® Plus Mini Kit (QUIAGEN) de acuerdo al protocolo del fabricante. La RT-PCR se realizó usando el kit “PyroMark OneStep RT-PCR” (QUIAGEN). Los oligonucleótidos para la amplificación del ARNm de c-Kit fueron: oligonucleótido río arriba 5'-GTTGAGGCAACTGCTTATGG-3' y oligonucleótido río abajo 5'-GCTTCTGCATGATCTTCCTG-3', que amplifican un fragmento de 289 pb (Ulivi 2004). La transcripción reversa se realizó a 50°C por 30 min. El protocolo para la amplificación subsecuente de c-Kit fue: 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1.5 min y 72°C por 1 min, posteriormente la extensión final se hizo a 72°C por 10 min. El control interno se realizó mediante la amplificación del ARNm del gen constitutivo H6PD usando los siguientes oligonucleótidos: oligonucleótido río arriba 5'-GCTACGCTCGGATCTTGTC-3' y oligonucleótido río abajo 5'-CCCAGTGCTTTTCGCTCT-3' que amplifican un fragmento de 60 pb. La transcripción reversa se hizo a 50°C por 30 min; el protocolo

de amplificación de H6PD fue: 95°C por 15 min, después se realizaron 45 ciclos de 94°C por 0.5 min, 50.5°C por 0.5 min y 72°C por 0.5 min, se finalizó la amplificación a 72°C por 10 min. ARN de las células K562 fue incluido como control positivo de la expresión de c-Kit.

4.3.- Análisis de la expresión de c-Kit por Western blot

Para separar y aislar proteína total de las células, éstas fueron cosechadas con verseno (25.09 mM Trizma base; 136.89 mM NaCl; 5.37 mM KCl; 1.08 mM EDTA) y lisadas usando el amortiguador del ensayo de radioinmunoprecipitación "RIPA" (50 mM Trizma HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% deoxicolato de sodio; 1% SDS) con 100 µL/mL del coctel de inhibidores de proteasas "cOmplete, EDTA-free" (Roche Applied Science). La concentración de proteína fue determinada con el kit "DC Protein Assay" (BIO RAD). Después 30 µg de proteína total de cada línea celular, fueron cargadas y separadas en un gel 10% SDS-PAGE; posteriormente fueron transferidas a membranas de polivinilideno fluorado (PVDF) "Immobilon®-P" (MILLIPORE). Las membranas fueron lavadas con el amortiguador salino de fosfatos (PBS) (136.89 mM NaCl; 2.68 mM KCl; 10.14 mM Na₂HPO₄; 1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4) y bloqueadas con el amortiguador de bloqueo (PBS; 5% leche en polvo "Svelty®" (Nestle)) por 2 hrs a temperatura ambiente. Luego las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos por separado durante la noche a 4°C. Para detectar la proteína c-Kit se usó el anticuerpo primario "c-Kit (Ab81) Mouse mAb" (Cell Signaling) y se amplificó la señal incubando la membrana con el anticuerpo biotinilado "Polyclonal Swine Anti-Goat, Mouse, Rabbit Immunoglobulins/ Biotinylated »Multi-Link«" (DakoCytomation) por 2 hrs a temperatura ambiente, después se incubó con streptavidina acoplada a peroxidasa "Streptavidin/HRP" (DakoCytomation) otras 2 hrs a temperatura ambiente. Como control de carga se detectó a la proteína GAPDH usando el anticuerpo primario monoclonal "GAPDH antibody [EPR1977Y]" (GeneTex), seguido de una incubación de 2 hrs a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa "goat anti-rabbit IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugate" (invitrogen) el cual reconoce inmunoglobulinas de conejo.

4.4.- Análisis de la expresión de c-Kit por citometría de flujo

Las células fueron cosechadas con verseno, luego fijadas con para-formaldehído al 3% y teñidas con el anticuerpo monoclonal "Anti-c-Kit [104D2] (FITC) · (ab119107)" (abcam) diluido 1:2.5 en PBS con 0.05% de albumina sérica bovina (BSA). Las células se incubaron con el anticuerpo por 1 hr a temperatura ambiente y en oscuridad, para después ser lavadas con PBS. La citometría de flujo y

el análisis de los datos se realizaron en una unidad de citometría “FACScalibur” con el software “Cell Quest” (Becton Dickinson).

4.5.- Ensayos de proliferación *in vitro*

Células DU145 y PC3 fueron sembradas por separado a una densidad de 5,000 células por pozo en placas de 96 pozos. Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 ng/mL) de SCF recombinante humano (SCF) (PREPROTECH) en RPMI 1640 con 10% de SFB; el medio y el SCF fueron renovados cada 2 días. La proliferación se evaluó con el ensayo colorimétrico MTT a los 2, 4 y 6 días de incubación.

4.6.- Análisis por citometría de flujo de células estimuladas con SCF

Se sembraron 1×10^6 células DU145 y PC3 por separado en cajas petri con 10 mL de RPMI 1640 con 10% de SFB. Las células fueron estimuladas con 1 ng/mL de SCF; el medio y el SCF fueron renovados cada dos días. A los 6 días de incubación las células se analizaron por citometría de flujo como se describió anteriormente.

4.7.- Ensayos de migración *in vitro*

Los ensayos de migración se realizaron usando cámaras de Boyden. Este ensayo consiste en sembrar células en insertos con un fondo poroso a través del cual las células pueden migrar y ser cuantificadas. Los insertos son colocados en pozos donde se añade medio y el quimio-atrayente a evaluar. Para este estudio se usaron dos tipos de insertos con poros de $8 \mu\text{m}$ de diámetro: a) insertos con fondo de policarbonato no transparente (nunc™); b) insertos con fondo transparente de PET (BD Falcon™).

En ambos casos se incubaron las células DU145 y PC3 en medio RPMI 1640 sin SFB 24 hrs antes de iniciar el ensayo. Posteriormente, las células fueron cosechadas con verseno y fueron resuspendidas en amortiguador quelante (medio RPMI 1640; 5% BSA; 1.08 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), las células fueron centrifugadas y se resuspendieron 1×10^6 células/mL en medio RPMI 1640 sin SFB. Se adicionaron 300 μL de ésta suspensión en cada una de los insertos y se añadieron 500 μL de medio RPMI 1640 con 10% de SFB como control positivo, sin SFB como control negativo y sin SFB con diferentes concentraciones (1, 10, 100 ng/mL) de SCF en el grupo experimental. Después de 18 hrs de incubación se quitaron las células que quedaron en la parte interna de los insertos con un hisopo y se procedió a la evaluación.

Los ensayos de migración con insertos de fondo no transparente fueron evaluados con el kit “QCM™ 24-Well Colorimetric Cell Migration Assay” (MILLIPORE), en el cual las células que migraron a través de la membrana de policarbonato son teñidas con la solución de tinción celular provista. Después, la solución de tinción es extraída con el amortiguador de extracción del kit y la densidad óptica (DO) fue medida en un espectrofotómetro de placas “ELx800” (BIO-TEK®) a una longitud de onda de 570 nm. Los ensayos con insertos de fondo transparente fueron evaluados recortando el fondo del inserto y tiñendo las células que migraron con el reactivo “ProLong® Gold protector con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI)” (invitrogen). Posteriormente, se tomaron micrografías de 5 áreas al azar con un aumento 10X usando un microscopio confocal de disco giratorio (DSU). Una vez obtenidas las imágenes, se hizo un conteo semi-automático de los núcleos teñidos de las células que migraron usando el software ImageJ.

4.8.- Ensayos de sobrevivencia *in vitro*

Células DU145 y PC3 fueron sembradas a una densidad de 50,000 células por pozo en placas de 96 pozos en medio RPMI 1640 con 10% de SFB y se incubaron por toda la noche. Al día siguiente se retiró el medio y se cambió por medio RPMI 1640 sin SFB con concentraciones crecientes (1, 10, 100 ng/mL) de SCF; como control negativo se incubaron células con medio RPMI 1640 sin SFB ni SCF. El medio y el SCF fueron renovados cada 3 días, por un período de 12 días para DU145, y de 6 días para PC3. Las células sobrevivientes se continuaron cultivando por 12 días más en presencia de medio RPMI 1640 con 10% de SFB renovándolo cada 3 días. El número de células se evaluó con el ensayo colorimétrico MTT cada 3 días antes de la adición de SFB y cada 6 días por 12 días después de la adición de SFB.

4.9.- Ensayos de crecimiento independiente de anclaje

Células DU145 y PC3 fueron cosechadas y resuspendidas a una densidad de 5×10^5 células/mL de medio RPMI 1640 e incubadas por 8 días en matriz de agar usando el kit “CytoSelect™ 96-Well Cell Transformation Assay (Cell Recovery Compatible, Colorimetric)” (CELL BIOLABS, INC.); se añadieron diferentes concentraciones (1, 10, 100 ng/mL) de SCF, así como un control negativo sin SCF. Para comparar el crecimiento independiente de anclaje entre las células incubadas con SCF y el control negativo, el agar fue solubilizado y las células cuantificadas con la solución de MTT provista, midiendo la DO a 570 nm. Para analizar la expresión de c-Kit en las células que formaron las colonias en agar suave, células DU145 y PC3 de tres pozos con 100 ng/mL de SCF y de 3 pozos

del control negativo, fueron recuperadas por separado y cosechadas por centrifugación. Una vez colectadas, las células fueron resuspendidas en 20 μ L de PBS y colocadas sobre un porta objetos, dentro de un círculo con ± 9 mm de diámetro, delimitado con cera. Las células se trataron tomando como base el protocolo de frotis y tinción inmunofluorescente de McNeilly *et al*, 1991. La suspensión se dejó secar a temperatura ambiente, después las células se lavaron con H₂O Milli-Q® (MILLIPORE), y se dejaron secar de nuevo a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se fijaron con acetona por 10 min a temperatura ambiente y se incubaron 1 hr a 37°C en cámara húmeda y protegidas de la luz, con 20 μ L del anticuerpo monoclonal “Anti-c-Kit [104D2] (FITC) · (ab119107)” diluido 1:2.5 en PBS. Después las muestras se lavaron con PBS por 10 min y se montaron con el reactivo “ProLong® Gold protector con DAPI”. Las células fijadas y teñidas se analizaron usando un microscopio confocal de disco giratorio (DSU).

4.10.- Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos de proliferación, migración y crecimiento independiente de anclaje son presentados en histogramas mostrando la media \pm el error estándar de la media. Las cinéticas de crecimiento y de sobrevivencia son presentadas en curvas mostrando la media \pm el error estándar de la media en cada uno de los tiempos de evaluación. Los resultados de los ensayos de proliferación, migración, sobrevivencia y crecimiento independiente de anclaje fueron normalizados considerando al control sin tratamiento como 100%. Los resultados de los ensayos de proliferación, de formación de colonias y de migración fueron analizados con ANOVA de una vía haciendo una comparación múltiple con la prueba de Dunnett entre el control negativo y los tratamientos. Los resultados de las cinéticas de crecimiento fueron analizados con ANOVA de dos vías haciendo una comparación múltiple con la prueba de Holm-Šidák en cada tiempo entre el control negativo y el tratamiento. Los resultados de los ensayos de sobrevivencia fueron analizados con ANOVA de dos vías haciendo una comparación múltiple con la prueba de Dunnett en cada tiempo entre el control negativo y los tratamientos. Una $p \leq 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa. Se usó el software Graph Pad PRISM (versión 6.01) para analizar los datos.

5.- Resultados

5.1.- Expresión de c-Kit en células de cáncer de próstata

Inicialmente se investigó la expresión de c-Kit en las células de cáncer de próstata DU145 y PC3 (Figura 18a), ya que algunos estudios han reportado la expresión de c-Kit en estas células (Wiesner 2008; Ma 2012) mientras que otros han reportado lo contrario (Küblet 2005; Simak 2000). Para ello, se usó como control positivo de la expresión de c-Kit a la línea celular de eritroleucemia K562 (Ogawa 1994). Primero se buscó la presencia del ARNm de c-Kit en las tres líneas celulares mediante RT-PCR. Se observó la amplificación de un fragmento del tamaño esperado (289 pb) tanto en las células K562 como en las células de cáncer de próstata, por lo que se deduce la presencia de transcritos de c-Kit en las tres líneas celulares (Figura 18b). Posteriormente, se

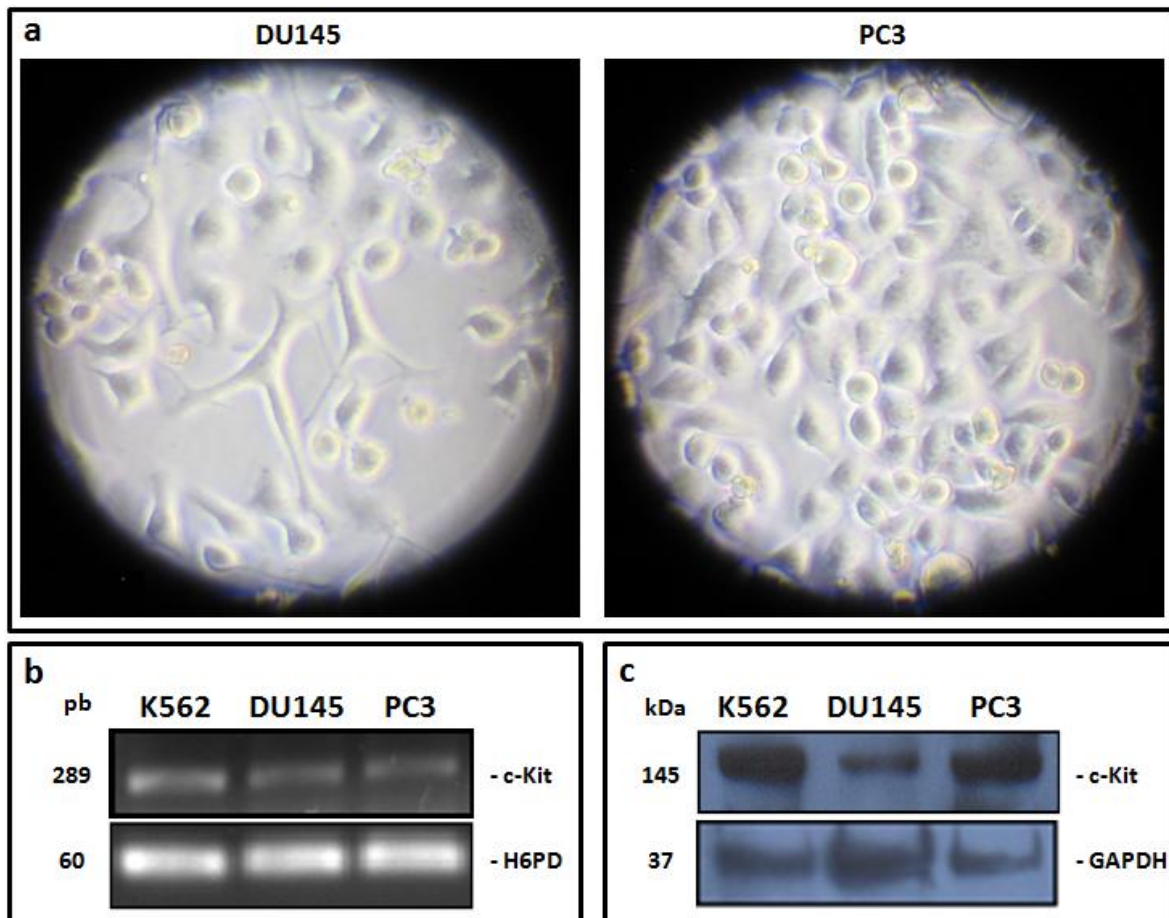


Figura 18| Análisis de la expresión de c-Kit en células de cáncer de próstata. (a) Micrografías de células DU145 y PC3 en cultivo. (b) La expresión del gen de c-Kit fue investigada mediante RT-PCR de ARN total de células DU145 y PC3; ARN total de células K562 fue usado como control positivo. La evaluación de la expresión de H6PD se incluyó como control interno. pb: pares de bases. (c) La expresión de la proteína c-Kit fue evaluada mediante Western blot, a partir de proteína total aislada de células DU145 y PC3; proteína total de K562 fue usada como control positivo. La evaluación de la expresión de GAPDH se adicionó como control interno.

investigó por Western blot la presencia de la proteína correspondiente a c-Kit en extractos de proteína total de células K562, DU145 y PC3. Como se muestra en la figura 18c, una banda del peso molecular esperado para c-Kit (145 kDa) fue detectado en los extractos proteicos de las células de cáncer de próstata y de las células K562. Por lo tanto, estas células expresan a c-Kit constitutivamente.

Se sabe que un tumor se compone de una población heterogénea de células (Gerlinger 2012; Marusyk 2012), por lo tanto es importante conocer la proporción de células que potencialmente podrían responder al SCF extracelular, para ello el receptor c-Kit debe estar presente en la membrana citoplasmática. Por consiguiente investigamos el porcentaje de células que expresa al receptor en la membrana celular mediante el uso de citometría de flujo. Como se muestra en la figura 19, el porcentaje de células DU145 que expresa al receptor c-Kit en la membrana celular fue de 3.68%, mientras que el 0.88% de células PC3 expresan a c-Kit en la membrana celular. Por su parte, 20.42% de células K562 expresan a c-Kit en la membrana citoplasmática. Nuestros resultados muestran que una proporción de células DU145 y PC3 expresan a c-Kit en la membrana celular.

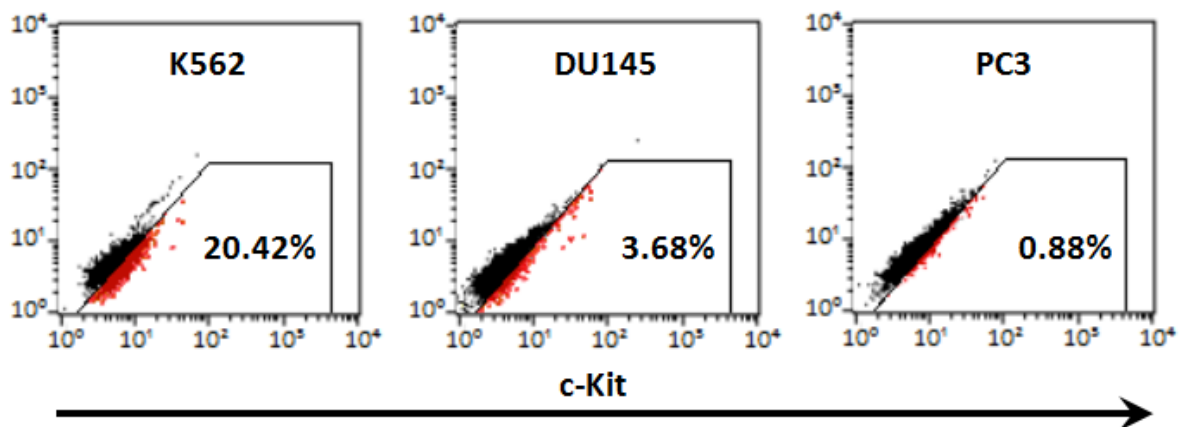


Figura 19 | Análisis de la expresión de c-Kit en la membrana citoplasmática de células de cáncer de próstata. Imágenes representativas del análisis por citometría de flujo de la expresión membranar de c-Kit en células DU145 y PC3; las células K562 fueron usadas como control positivo de la expresión de c-Kit membranar. Se usó un anticuerpo anti-c-Kit acoplado a FITC, el cual reconoce un epítipo extracelular del receptor.

5.2.- Efecto del SCF sobre la proliferación de células de cáncer de próstata

Una de las principales características de una célula cancerosa es la reproducción descontrolada (Hanahan 2011), la cual puede ser incrementada por factores de crecimiento como el SCF

(Gschwind 2004; Krasagakis 2011). Dado que los análisis de expresión indican que una pequeña proporción de células de cáncer de próstata DU145 y PC3 expresan constitutivamente a c-Kit, se decidió investigar si la estimulación de c-Kit por su cognado podría inducir la proliferación de estas células. Con este fin, células DU145 y PC3 fueron incubadas en presencia de concentraciones crecientes (0.5, 1, 5, 10, 50, 100 ng/mL) de SCF y el número de células presente fue evaluado a los 2, 4 y 6 días de haber iniciado el experimento. Como se muestra en la figura 20, el número de

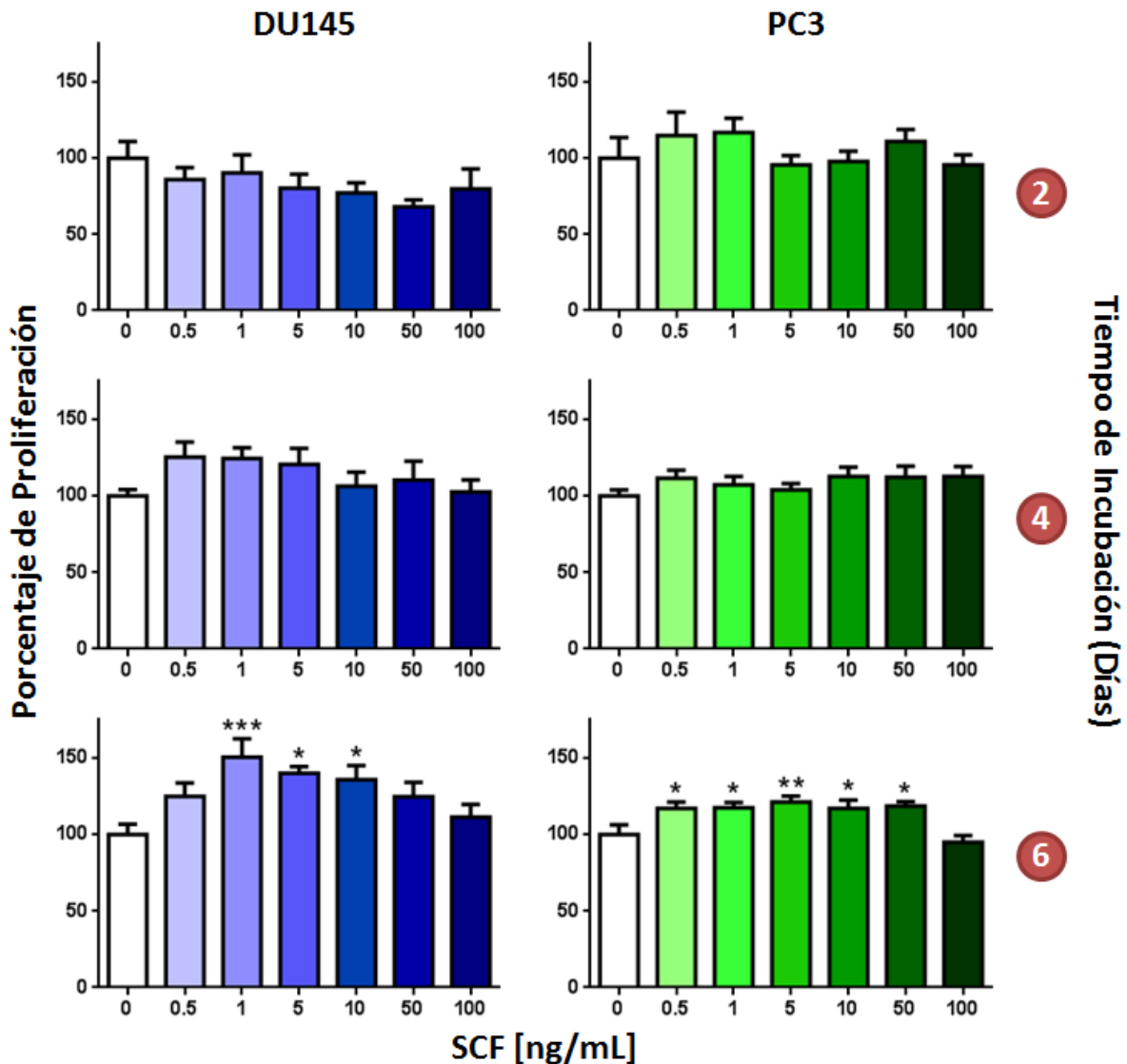


Figura 20 | Efecto del SCF sobre la proliferación de células de cáncer de próstata. Células DU145 y PC3 fueron tratadas con concentraciones crecientes de SCF. La proliferación celular fue evaluada a los 2, 4 y 6 días mediante ensayos de MTT. Los valores reportados representan la media de tres pruebas independientes por triplicado. En cada tiempo los valores se normalizaron tomando como 100% el control sin tratamiento. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se hizo una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control negativo y los tratamientos en cada uno de los tiempos. * $p \leq 0.05$ vs control negativo; ** $p \leq 0.01$ vs control negativo; *** $p \leq 0.001$ vs control negativo.

células a los 2 y 4 días no es significativamente distinto al número de células presentes en el control negativo; sin embargo, la estimulación de células DU145 y PC3 con SCF por 6 días incrementó de manera dosis dependiente la proliferación celular en ambas líneas celulares. En las células DU145, el incremento fue significativamente mayor al control sin tratamiento a partir de la estimulación con 1 ng/mL y hasta 10 ng/mL ($p \leq 0.05$), teniendo un máximo efecto con 1 ng/mL donde el incremento fue de 50% respecto al control sin tratamiento ($p \leq 0.001$). Por su parte, en las células PC3 se observó un incremento significativo a partir de la estimulación con 0.5 ng/mL y hasta 50 ng/mL ($p \leq 0.05$); el máximo efecto se observó con 5 ng/mL donde el incremento fue de 21% respecto al control negativo ($p \leq 0.01$). En la figura 21 se muestran las cinéticas de crecimiento de las células DU145 y PC3 a los 6 días de incubación. La cinética de crecimiento de las células DU145, después de haber sido estimuladas con 1 ng/mL de SCF, muestra que el incremento en la proliferación es significativo hasta el día 6 de incubación ($p < 0.0001$). De la misma forma, la cinética de crecimiento de las células PC3, después de haber sido estimuladas con 5 ng/mL de SCF, muestra que el incremento de la proliferación es significativo hasta el día 6 de incubación ($p \leq 0.001$). En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que el receptor c-Kit expresado por las células DU145 y PC3 es funcional, y que su activación inducida por concentraciones fisiológicas de SCF es capaz de estimular significativamente la proliferación de células de cáncer de próstata.

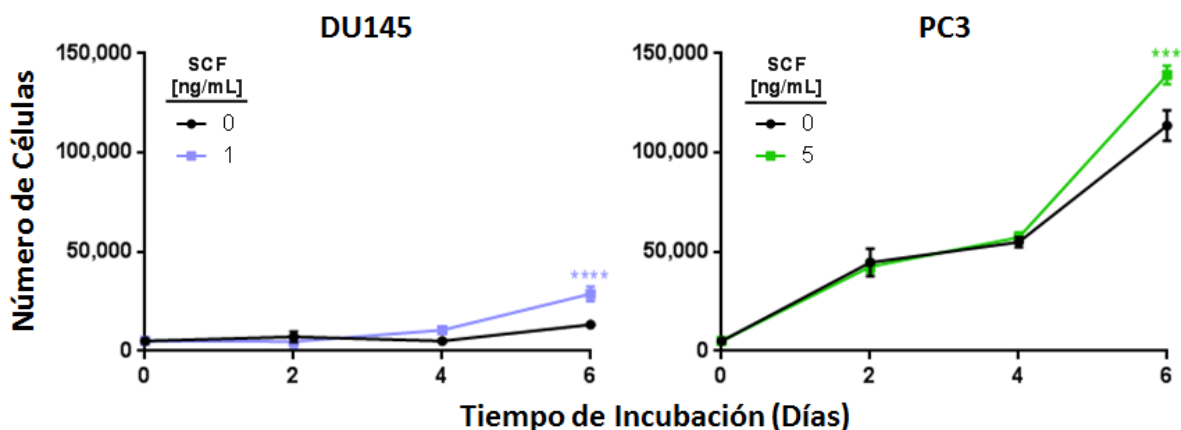


Figura 21| Cinética de crecimiento de células de cáncer de próstata estimuladas con SCF. Células DU145 fueron estimuladas con 1 ng/mL de SCF por 6 días. Células PC3 fueron estimuladas con 5 ng/mL de SCF por 6 días. El SCF fue adicionado cada 2 días y el número de células fue evaluado usando el ensayo de MTT en los tiempos indicados. Cada punto representa la media de tres ensayos independientes por triplicado. Las barras de error representan el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Holm-Šidák) entre el control sin tratamiento y las células tratadas con SCF. *** $p \leq 0.001$ vs control negativo; **** $p < 0.0001$ vs control negativo.

Por otra parte, dado que se ha reportado que el microambiente de la medula ósea es capaz de inducir la expresión de c-Kit en células PC3 (Wisner 2008), decidimos investigar el efecto del SCF en la expresión de c-Kit membranar de células DU145 y PC3. Para ello, una vez determinadas las concentraciones de SCF que incrementan la proliferación de células de cáncer de próstata, así como el tiempo en que el incremento es significativo, se estimularon células DU145 y PC3 con 1 ng/mL de SCF cada 2 días por un lapso de 6 días. Posteriormente, se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células que expresaba a c-Kit en la membrana. Como se muestra en la figura 22, el porcentaje de células que expresa a c-Kit en la membrana en ambas líneas celulares disminuyó

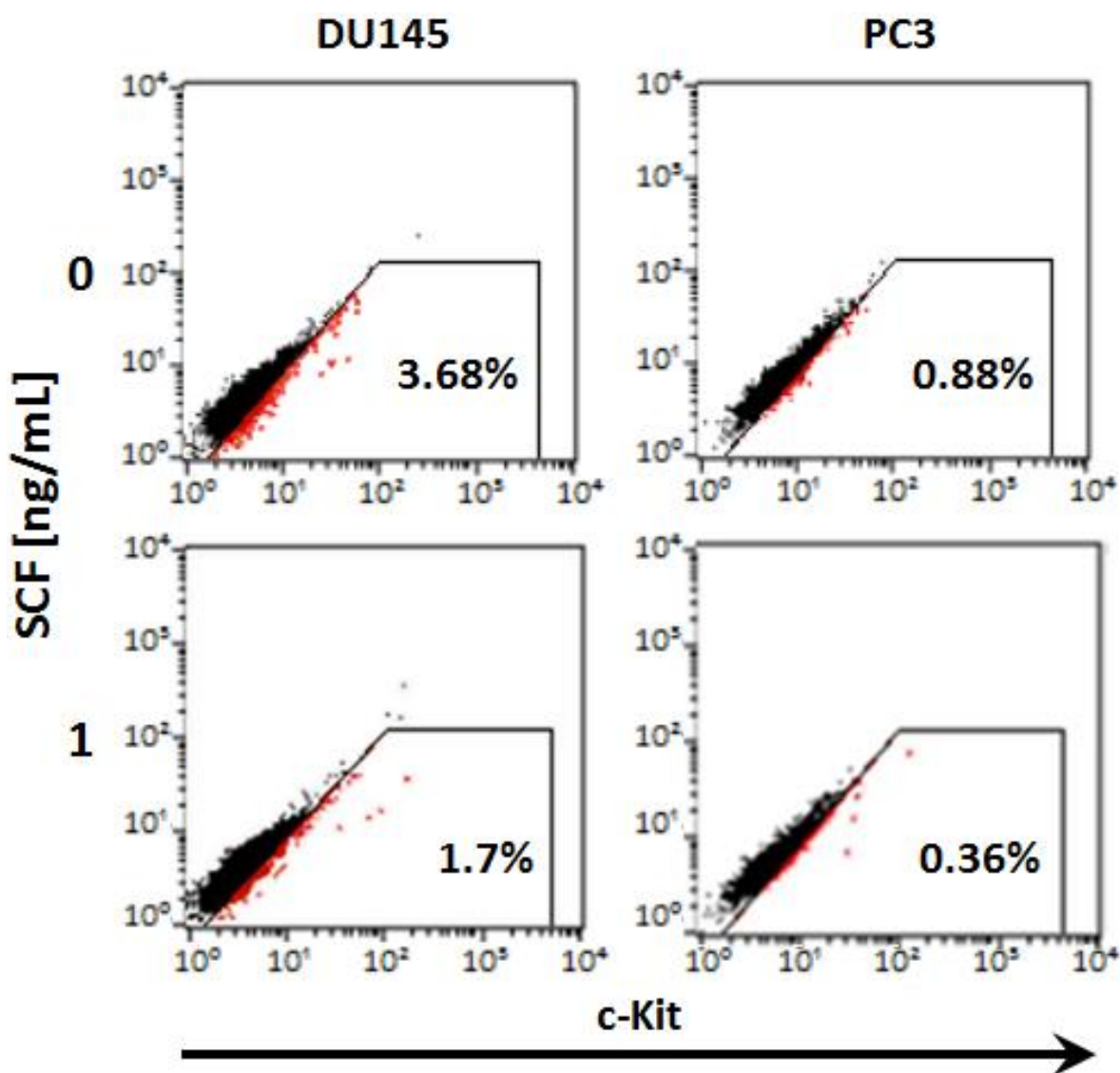


Figura 22| Efecto del SCF sobre la expresión de c-Kit en células de cáncer de próstata. Las células fueron tratadas con 1 ng/mL de SCF por un lapso de 6 días o sin SCF como control negativo. Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de células que expresaba a c-Kit en la membrana citoplasmática mediante citometría de flujo.

con respecto al porcentaje que lo expresa antes del tratamiento. Comparado con los controles sin tratamiento, la estimulación con SCF redujo el porcentaje de células DU145 que expresan c-Kit en la membrana de 3.68% a 1.7% (lo que representa una disminución del 53%), mientras que en las células PC3 este porcentaje se redujo de 0.88% a 0.36% (lo que representa una disminución del 59%).

5.3.- Efecto del SCF sobre la migración de células de cáncer de próstata

La migración celular es un componente esencial de la metástasis, particularmente en el proceso de diseminación de células cancerosas del tumor primario hacia tejidos cercanos y distantes (Condeelis 2003; Farrow 2008; McSherry 2007); cuando la diseminación y migración de células cancerosas es dirigida, el proceso de metástasis es más eficiente (Roussos 2011a). El tipo de migración dirigida en la metástasis por quimiotaxis es la quimiotaxis, ya que se define como el fenómeno en el que el movimiento de las células es dirigido en respuesta a un gradiente químico extracelular soluble (Roussos 2011b). La quimiotaxis de células cancerosas puede ser mediada por factores de crecimiento, como el SCF, ya que las cascadas de señalización activadas por estos factores pueden provocar cambios en la dinámica del citoesqueleto e inducir una migración polarizada (Gilfillan 2006; Roussos 2011b). Con base en esto, se investigó si el SCF podría inducir la quimiotaxis de células de cáncer de próstata mediante ensayos de migración *in vitro*. Para ello, las células se sembraron en insertos de migración (cámaras de Boyden), se añadieron concentraciones crecientes (1, 10 y 100 ng/mL) de SCF en la parte inferior de los insertos y se evaluó la migración mediante un ensayo colorimétrico. En la figura 23 se muestra que comparado con el control sin tratamiento, ninguna de las concentraciones de SCF indujo un incremento significativo de la quimiotaxis de células DU145 o PC3. El control positivo con SFB se usó para demostrar que las células son capaces de migrar a través de la membrana porosa de los insertos, y en efecto el incremento en la migración del control positivo comparado con el control negativo es significativo en ambas líneas celulares ($p \leq 0.01$). No obstante, considerando que el porcentaje de células DU145 y PC3 que expresa constitutivamente a c-Kit, es menor al 4% y 1% respectivamente, es probable que el ensayo colorimétrico no sea lo suficientemente sensible como para detectar diferencias significativas entre el control negativo y los tratamientos. Por tal motivo se procedió a evaluar la migración mediante el conteo directo de las células migrantes en cada una de las condiciones.

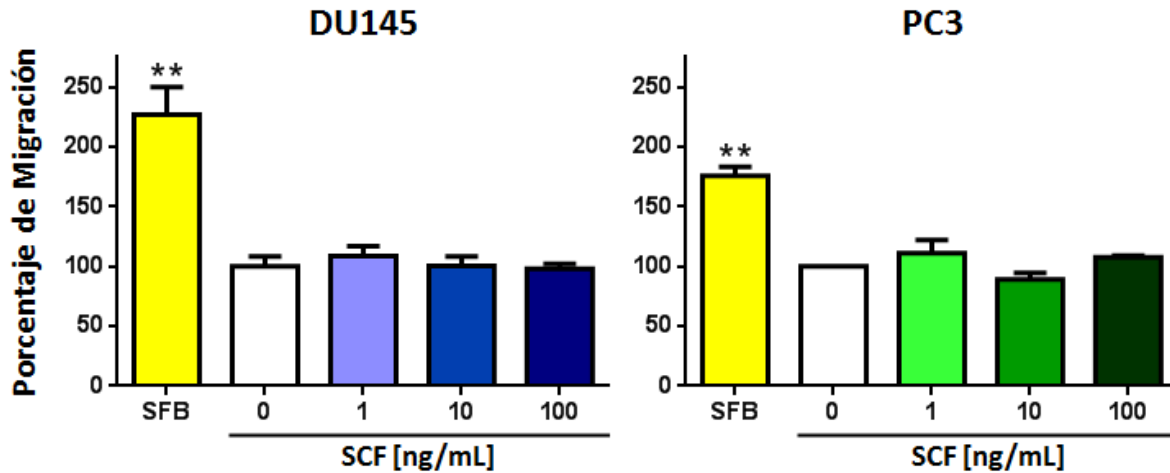


Figura 23| Efecto del SCF sobre la migración de células de cáncer de próstata evaluado por colorimetría. La quimiotaxis de células DU145 y PC3 en respuesta a concentraciones crecientes de SCF fue evaluada *in vitro* usando insertos de migración (cámaras de Boyden). Se usó SFB al 10% como control positivo de la migración celular, y las células sin SCF como control negativo. La cuantificación de la migración se realizó mediante un ensayo colorimétrico y la determinación de la densidad óptica. Los histogramas muestran la media de dos ensayos independientes y las barras de error representan el error estándar de la media. Se hizo una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control negativo y cada una de las otras condiciones. ** $p \leq 0.01$ vs control negativo.

En este ensayo se sembraron células DU145 y PC3 en insertos de migración (cámaras de Boyden) con fondo transparente de PET, y se añadieron concentraciones crecientes (1, 10 y 100 ng/mL) de SCF en la parte inferior de los insertos. Para poder contabilizar una a una las células que migraron, éstas se tiñeron con DAPI y se tomaron micrografías de cinco campos al azar de cada una de las membranas porosas de los insertos. Posteriormente se hizo un conteo semi-automático de los núcleos de las células migrantes usando el software ImageJ. Como se muestra en la figura 24a, mediante esta estrategia tampoco se detectó algún incremento significativo de la quimiotaxis de células de cáncer de próstata respecto al control sin tratamiento. No obstante, se observó un incremento estadísticamente no significativo de la quimiotaxis de células DU145 con 10 y 100 ng/mL de SCF respectivamente, al comparar el número de células que migró en estas condiciones con las que migraron en el control sin tratamiento. En las células PC3 no se detectó incremento de la migración en los tratamientos con SCF respecto al control negativo. Se usó 10% de SFB como control positivo de la migración, donde la quimiotaxis fue significativamente mayor que en el control negativo en ambas líneas celulares ($p < 0.0001$). Micrografías representativas de los campos analizados de cada una de las condiciones se muestran en la figura 24b.

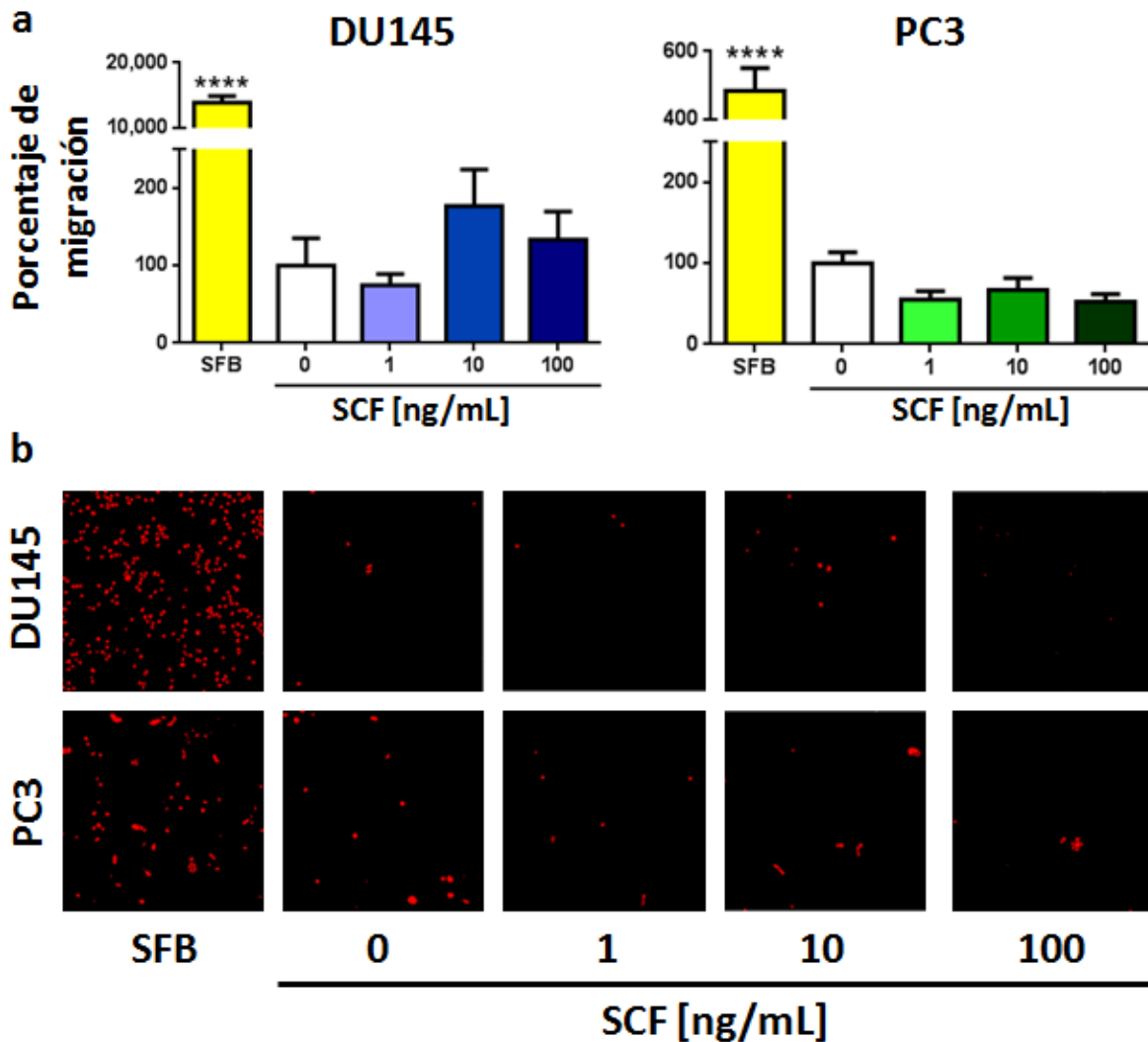


Figura 24| Efecto del SCF sobre la migración de células de cáncer de próstata evaluado por microscopía de fluorescencia. La quimiotaxis de células DU145 y PC3 en respuesta a concentraciones crecientes de SCF fue evaluada *in vitro* usando insertos de migración (cámaras de Boyden) con fondo transparente de PET. Se usó 10% de SFB como control positivo de la migración celular, y las células sin SCF como control negativo. Las células que migraron fueron teñidas con DAPI. Se tomaron micrografías de 5 campos al azar de cada uno de los insertos en un microscopio de fluorescencia. La cuantificación de la migración se realizó mediante el conteo semi-automático de las células que migraron usando el software ImageJ. (a) En los histogramas se muestra la media del porcentaje de migración y el error estándar de la media de tres ensayos independientes. Los datos se normalizaron considerando el número de células que migraron en el control negativo como 100%. Se hizo una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control negativo y cada una de las otras condiciones. **** $p < 0.0001$ vs control negativo. (b) Micrografías (10X) representativas de los fondos de los insertos de migración con las células que migraron teñidas con DAPI. Las imágenes que se muestran fueron procesadas con el software ImageJ por lo que los núcleos de las células se ven rojos; esto permite un mayor contraste con el fondo negro.

Los resultados de los ensayos de migración muestran que el SCF no induce significativamente la quimiotaxis de células de cáncer de próstata. Sin embargo, en las células DU145 se detectó un incremento estadísticamente no significativo de la quimiotaxis con 10 y 100 ng/mL de SCF. Por lo

tanto podrían ser necesarios otro tipo de ensayos de migración para identificar con precisión si este incremento *in vitro* pudiera tener algún significado en la metástasis de cáncer de próstata.

5.4.- Efecto del SCF sobre la muerte por falta de nutrientes en células de cáncer de próstata

En el cáncer, además de la proliferación, la resistencia a la muerte celular es un factor central (Brown 2005; Klein 2005); demasiado crecimiento y poca muerte celular pueden inducir el desarrollo tumoral (Hanahan 2000; Krammer 1998). De los distintos tipos de muerte celular, las células tienen un mecanismo intrínseco de autodestrucción llamado muerte celular programada o apoptosis. Defectos en las vías de señalización que inducen la apoptosis o la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas pueden conducir a la expansión de una población de células neoplásicas y favorecer el proceso de metástasis (Igney 2002). En ese sentido, señales de sobrevivencia, incluidos los factores de crecimiento como el SCF, tienen un papel fundamental, ya que éstos pueden favorecer la resistencia a la apoptosis mediante la activación de cascadas de señalización que interfieran con la maquinaria de apoptosis y la inducción de la expresión de genes anti-apoptóticos (Gilfillan 2006; Igney 2002).

Con base en lo anterior, se investigó el efecto del SCF sobre la muerte celular inducida por la falta de nutrientes en células de cáncer de próstata. Como se muestra en la figura 25, después de 12 días de exposición a la falta de nutrientes el número de células DU145 sobrevivientes había sobrepasado la sensibilidad del ensayo por MTT; por su parte, en las células PC3 el número de células sobrevivientes sobrepasó la sensibilidad del ensayo a los 6 días. Sin embargo, en el microscopio era posible observar células DU145 y PC3 sobrevivientes a esos días; por lo tanto se decidió recuperar las células sobrevivientes adicionando nuevamente medio sin añadir más SCF. Esto con la finalidad de que las posibles diferencias pudieran ser cuantificables considerando que el número de células se incrementa exponencialmente respecto al tiempo. En las células DU145, se detectó un incremento significativo entre el número de células presentes en los pozos donde se adicionó SCF y el control sin tratamiento a los 12 días de haber recuperado a las células sobrevivientes ($p \leq 0.05$). En los pozos a los que se les adicionó 1 ng/mL de SCF, se detectaron un 62% más de células DU145 que en el control sin tratamiento ($p < 0.0001$), cuando fueron estimuladas con 10 ng/mL de SCF se detectaron 49% más células DU145 que en el control sin tratamiento ($p \leq 0.01$) y cuando éstas fueron estimuladas con 100 ng/mL de SCF detectaron 41% más de células que en el control negativo ($p \leq 0.05$). Por el contrario, a los 12 días de haber

recuperado a las células PC3 sobrevivientes, no se detectó alguna diferencia significativa en el número de células presentes entre el control sin tratamiento y los tratamientos (Figura 25). Estas observaciones indican que el SCF tiene la capacidad de proteger significativamente a células DU145 de la muerte inducida por falta de nutrientes.

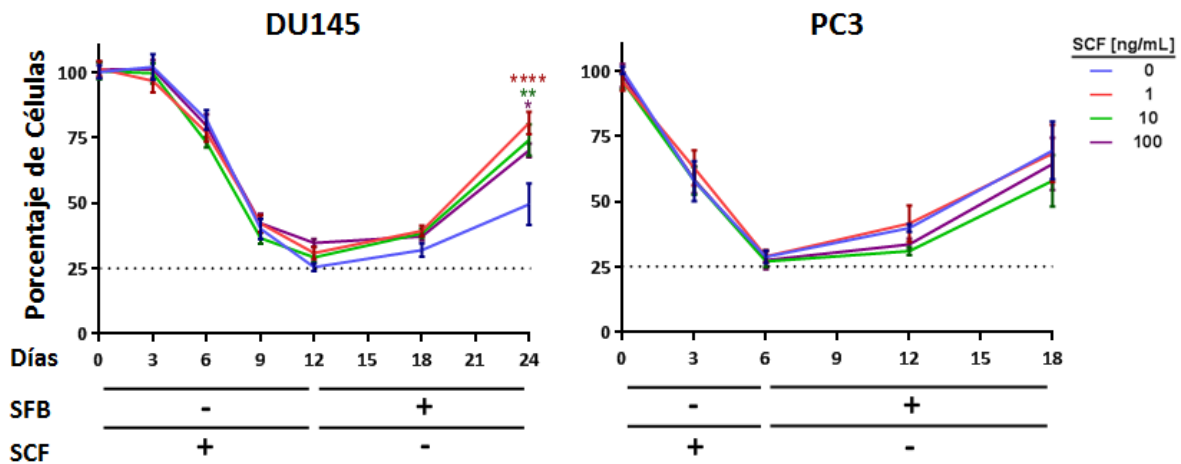


Figura 25| Efecto del SCF sobre la muerte inducida por falta de nutrientes en células de cáncer de próstata. Células DU145 fueron cultivadas por 12 días en medio sin SFB, en presencia de concentraciones crecientes de SCF o sin SCF como control negativo. El número de células se cuantificó cada 3 días mediante el ensayo de MTT. Las células sobrevivientes fueron recuperadas añadiendo medio con 10% de SFB y se dejó de añadir SCF. El número de células fue cuantificado por MTT cada 6 días por 12 días después de iniciar la recuperación. Células PC3 fueron cultivadas por 6 días en medio sin SFB, en presencia de concentraciones crecientes de SCF o sin SCF como control negativo. El número de células se cuantificó cada 3 días mediante el ensayo de MTT. Las células sobrevivientes fueron recuperadas añadiendo medio con 10% de SFB y se dejó de añadir SCF. El número de células fue cuantificado por MTT cada 6 días por 12 días después de iniciar la recuperación. Las gráficas muestran la media y el error estándar de la media en cada tiempo de evaluación. En ambos casos se hizo una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre los tratamientos y el control negativo. La línea punteada representa la sensibilidad del ensayo de MTT. * $p \leq 0.05$ vs control negativo; ** $p \leq 0.01$ vs control negativo; *** $p < 0.0001$ vs control negativo.

5.5.- Efecto del SCF sobre el crecimiento independiente de anclaje de células de cáncer de próstata

Se ha reportado que el perfil de expresión génica de células cancerosas con capacidad de crecer de manera independiente al anclaje, se correlaciona con el perfil de expresión génica de células metastásicas de pacientes, siendo este perfil una posible herramienta de pronóstico respecto al potencial metastásico de las células cancerosas en la clínica (Mori 2009). Paralelamente, se ha reportado que la capacidad de células cancerosas de crecer independientemente al anclaje, puede ser aumentada por efecto de la estimulación con ciertos factores de crecimiento y citocinas

(Hamburger 1987; Korc 1991), así como por la sobre-expresión de algunos co-receptores de receptores de factores de crecimiento (Gatza 2011).

Considerando lo anterior y que el crecimiento clonogénico independiente del anclaje es esencial en la metástasis, se investigó si el SCF tiene algún efecto en la capacidad de crecer de manera independiente al anclaje de células de cáncer de próstata. Para ello, se hicieron ensayos de formación de colonias en agar suave con células DU145 y PC3 en presencia de concentraciones crecientes (1, 10 y 100 ng/mL) de SCF y sin SCF como control negativo. Los ensayos se analizaron cuantitativamente usando la solución de MTT. Como se muestra en la figura 26, el SCF no tuvo un efecto significativo en el crecimiento independiente de anclaje de células DU145 al compararlo con el control sin tratamiento. En contraste, en las células PC3 se detectó un incremento significativo del número de células que crecieron en agar suave al ser estimuladas con 100 ng/mL de SCF ($p \leq 0.01$); este incremento fue de 37% en comparación con el control sin tratamiento. No obstante, las concentraciones de 1 y 10 ng/mL de SCF también incrementaron el crecimiento de células PC3 en 15% y 21% respectivamente, por lo que a pesar de que estas diferencias no fueron significativas, el efecto del SCF sobre el crecimiento independiente de anclaje de células PC3 parece ser dosis dependiente (Figura 26). Estos resultados sugieren que el SCF es capaz de incrementar la capacidad clonogénica y de crecimiento independiente de anclaje de células PC3.

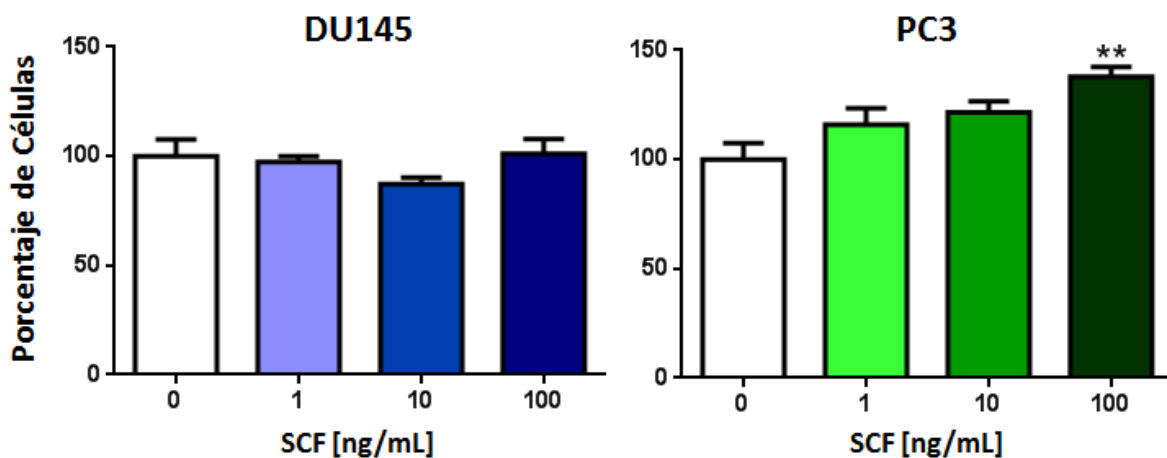


Figura 26| Efecto del SCF sobre el crecimiento independiente de anclaje de células de cáncer de próstata. Células DU145 y PC3 fueron sembradas en agar suave con concentraciones crecientes de SCF o sin SCF como control negativo. El número de células presentes en cada condición fue evaluado a los 8 días de incubación mediante el ensayo de MTT. La densidad óptica detectada en cada condición fue normalizada considerando como 100% la densidad óptica de los controles sin tratamiento. En los histogramas se muestra la media y las barras de error representan el error estándar de la media. En ambos casos se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control negativo y los tratamientos. ** $p \leq 0.01$ vs control negativo.

Dado que se detectó un incremento significativo en el número de células PC3 que creció clonógicamente en agar suave al ser incubadas con 100 ng/mL de SCF, se averiguó si este incremento se correlacionaba con un aumento en la proporción de células que expresa a c-Kit. Con esta finalidad, se sembraron células DU145 y PC3 en agar suave en presencia de 100 ng/mL de SCF o sin SCF como control negativo. Después de 8 días de incubación, el agar fue disgregado y las células colectadas. Las células fueron fijadas y teñidas con DAPI y un anticuerpo acoplado a fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), que reconoce un epítipo extracelular de c-Kit. Posteriormente, las células fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia.

Sorprendentemente, se detectó una alta frecuencia de expresión del receptor c-Kit principalmente en las colonias que no se disgregaron. La expresión de c-Kit se observó tanto en el control sin tratamiento, como en las células que fueron estimuladas con 100 ng/mL de SCF en ambas líneas celulares (Figura 27a). Como se muestra en la figura 27b, se observa una fuerte localización de la tinción de c-Kit en el citoplasma. Estas observaciones muestran que principalmente las células DU145 y PC3 que expresan c-Kit son capaces de crecer de manera independiente al anclaje, por lo que en principio, éstas podrían ser células cancerosas con un mayor potencial metastásico.

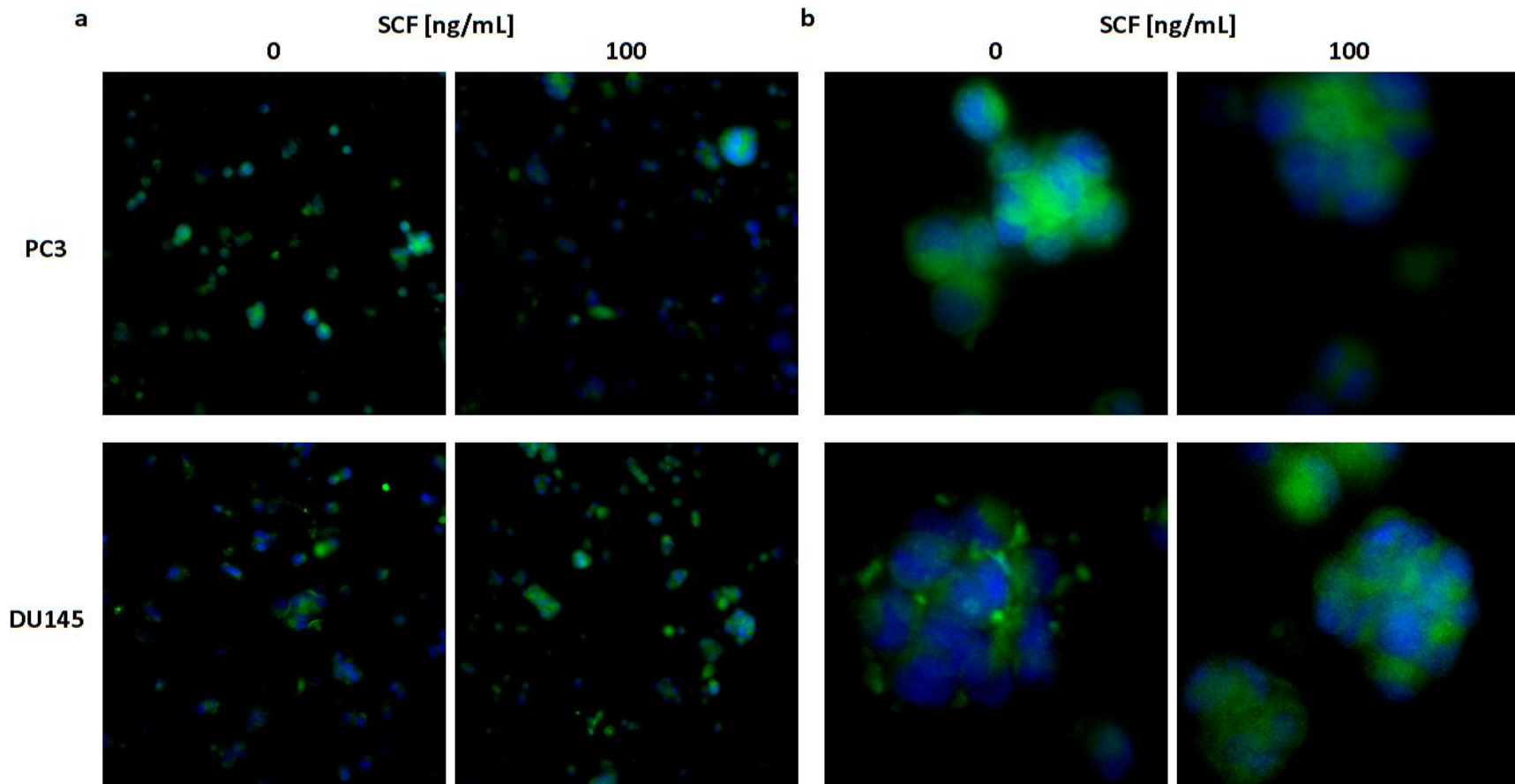


Figura 27 | Análisis de la expresión de c-Kit en células de cáncer de próstata con capacidad de crecer de manera independiente al anclaje. Células DU145 y PC3 fueron cultivadas en agar suave en presencia de 100 ng/mL de SCF o sin SCF como control negativo. Después de 8 días de incubación, el agar fue disgregado y las células colectadas. Las células fueron fijadas y teñidas con DAPI y un anticuerpo acoplado a FITC, el cual reconoce un epítipo extracelular del receptor c-Kit. (a) Micrografías representativas tomadas con un aumento 20X. (b) Acercamiento digital representativo de grupos de células DU145 y PC3, extraídas a partir de micrografías hechas con un aumento 20X.

6.- Discusión

En el presente trabajo, se investigó la expresión de c-Kit así como el efecto del SCF en el potencial metastásico de células de cáncer de próstata. Estudios previos sugieren que la expresión ectópica de c-Kit en células epiteliales de cáncer de próstata aumenta conforme aumenta el estadio del cáncer prostático (Di Lorenzo 2004; Imura 2012; Simak 2000; Wiesner 2008). Considerando que la progresión metastásica del cáncer de próstata ocurre principalmente en la médula ósea (Bubendorf 2000; Disibio 2008; Hess 2006) y que el SCF es un factor ampliamente expresado por el microambiente medular (Lennartsson 2012), es fundamental discernir el papel del SCF y su receptor en la metástasis del cáncer de próstata.

A diferencia de los estudios de la expresión de c-Kit en cortes histológicos de cáncer de próstata, la expresión de este receptor en líneas celulares de cáncer de próstata ha sido controversial. Algunos estudios han reportado que las células de cáncer de próstata DU145 y PC3 no expresan a c-Kit (Küblet 2005; Simak 2000), mientras que otros estudios han observado y cuantificado la expresión de c-Kit en estas líneas celulares (Ma 2012; Savarese 1998; Wiesner 2008). En este trabajo hemos detectado la presencia de transcritos de c-Kit en las dos líneas celulares de cáncer de próstata, confirmando lo previamente reportado por Wiesner *et al* en el 2008. En dicho trabajo se observó mediante el análisis cuantitativo del ARNm de c-Kit, que la expresión relativa de c-Kit es mayor en células DU145 que en células PC3, pero que la expresión de c-Kit en ambas líneas celulares es mucho menor que la expresión basal de c-Kit de células estromales de médula ósea (Wiesner 2008).

Por nuestra parte, observamos que la expresión de la proteína c-Kit en células DU145 y PC3 es baja, ya que la proteína sólo pudo ser detectada por Western blot cuando la señal fue amplificada. A diferencia de lo reportado por Wiesner *et al* en el 2008, nosotros detectamos la expresión basal de la proteína c-Kit en ambas líneas celulares. Esto podría deberse a diferencias en los métodos utilizados, principalmente en que en este trabajo se detectó la presencia de c-Kit en extractos de proteína total usando un anticuerpo primario biotinilado con el cual se amplifica la detección del antígeno en cuestión, mientras que Wiesner *et al* buscaron la presencia de c-Kit separando el conjunto de proteínas de la membrana celular y no amplificaron la señal; por lo que probablemente no fueron capaces de detectar la presencia de c-Kit en extractos de proteína membranal de células PC3 de manera basal. Esto es muy probable ya que en el mismo trabajo,

lograron detectar la expresión de la proteína de c-Kit en células PC3 después de haber sido trasplantadas a médula ósea de humano injertado en ratones SCID (Wiesner 2008).

Por otra parte, sabemos que c-Kit debe estar presente en la superficie celular para poder reconocer a su ligando en el medio extracelular y ser activado; por lo que analizamos la expresión membranar de c-Kit en células de cáncer de próstata mediante citometría de flujo. Detectamos que 3.68% de células DU145 y 0.88% de células PC3 expresan a c-Kit en la membrana. Cabe destacar que la proporción de células DU145 y PC3 que expresa c-Kit previamente había sido investigada por esta misma técnica (Ma 2012). En general, los bajos porcentajes de células que expresan c-Kit que detectamos concuerdan con lo previamente reportado por Ma y colaboradores, pues en ese trabajo observan que 0.78% de células DU145 y 0.6% de células PC3 expresan c-Kit.

Sin embargo en el trabajo de Ma *et al*, no se reporta un control positivo de la expresión de c-Kit, no se especifica si el porcentaje reportado corresponde a la proporción de células que expresa a c-Kit sólo en la membrana o también en el citoplasma, no se indica en el método si las células fueron o no permeabilizadas y tampoco la ficha técnica del anticuerpo que usaron menciona si el epítipo de c-Kit que éste reconoce se encuentra en un dominio extracelular o intracelular del receptor. Por lo tanto, hasta ahora no se conocía con precisión el porcentaje de células DU145 y PC3 que expresan a c-Kit en la membrana citoplasmática. Por nuestra parte, en el presente estudio se usó un anticuerpo primario acoplado a un fluoróforo, así como un control positivo de la expresión de c-Kit (células K562). En conjunto, esto disminuye el error provocado por la adición de un anticuerpo secundario y al tener un control positivo de la expresión de c-Kit hace que en nuestro sistema los porcentajes detectados sean más confiables. De cualquier forma, en ambos casos se detectó que las células DU145 y PC3 que expresan a c-Kit representan una minoría. Por lo tanto, se puede concluir que células DU145 y PC3 expresan a c-Kit, y que solo un pequeño porcentaje de estas células expresan al receptor en la superficie celular, en conformidad con lo previamente reportado en otros trabajos (Ma 2012; Savarese 1998; Wiesner 2008).

Estudios previos han reportado que c-Kit puede encontrarse involucrado en la proliferación de células cancerosas, como en células de leucemia mieloide aguda (Tohda 1993), ya que frecuentemente se ha observado que células de leucemia mieloide aguda expresan al receptor c-Kit sin mutaciones de por medio (Ikeda 1991), y que la estimulación con SCF induce su

proliferación (Pietsch 1992). También se ha observado que el SCF promueve la proliferación de células de cáncer de páncreas (Yasuda 2006). Por otra parte, se ha reportado que células estromales de la próstata expresan c-Kit en la membrana celular y en el citoplasma; y que la estimulación de estas células con SCF incrementa significativamente su proliferación (Imura 2012). En conjunto, estos trabajos indican que la estimulación con SCF es capaz de inducir la proliferación de células cancerosas como no cancerosas que expresan a c-Kit en la membrana superficial. Sin embargo, hasta el momento el efecto del SCF en la proliferación de células epiteliales de cáncer de próstata no ha sido reportado.

En el presente trabajo se muestra por primera vez que la estimulación con SCF soluble incrementa significativamente la proliferación de células de cáncer de próstata, demostrando a su vez que el eje SCF/c-Kit es funcional en estas células. Además, se observó que este incremento en la proliferación se da en un rango amplio de concentraciones de SCF, desde concentraciones menores a la concentración sanguínea de SCF soluble (3.3 ± 1.1 ng/mL), hasta concentraciones de 10 y 50 ng/mL en células DU145 y PC3, respectivamente. El mayor incremento detectado en comparación con el control sin tratamiento fue de 50% más células DU145 al ser estimuladas con 1 ng/mL de SCF, y un incremento del 21% en células PC3 cuando fueron estimuladas con 5 ng/mL. Tomando en consideración el porcentaje de células que expresa a c-Kit en la membrana citoplasmática, es razonable que estas diferencias se hayan observado después de 6 días de incubación. Sin embargo, es sorprendente la magnitud del incremento en ambos casos, ya que esto sugiere que concentraciones fisiológicas de SCF pueden incrementar la proliferación de células de cáncer de próstata significativamente en menos de una semana.

El incremento en la proliferación de ambas líneas celulares como respuesta a la estimulación con SCF, indica que el receptor c-Kit está siendo activado y desencadenando vías de señalización que activan genes relacionados con el crecimiento y proliferación celular. Se sabe que la activación de c-Kit inducida por la unión del SCF desencadena varias vías de señalización relacionadas con la proliferación celular (Gilfillan 2006). Por ejemplo, se ha demostrado que c-Kit activa al eje JAK2/STAT5 para promover la hematopoyesis (Grebier 2008). Adicionalmente, se ha observado que el SCF induce la proliferación de células estromales prostáticas, y que esto se correlaciona con un incremento en la expresión de JAK2 y STAT1; asimismo se observó que la inhibición de la activación de c-Kit con mesilato de imatinib inhibió la proliferación de estas células junto con un

decremento de la expresión de JAK2 y STAT1, sugiriendo que en estas células la proliferación inducida por SCF podría ser mediada por la activación del eje JAK2/STAT1 (Imura 2012). Asimismo, en nuestro grupo se ha observado que el SCF induce la activación de STAT5 en células de cáncer cervical (Aguilar 2014). Además, se sabe que la activación de c-Kit por el SCF activa a JAK2 y a STAT1 en células de leucemia megacarioblástica humana (Deberry 1997), y que el SCF induce la fosforilación de la Ser727 de STAT3 induciendo su activación en estas mismas células (Duarte 2000).

No obstante, la vía de JAK/STAT no es la única vía activada por c-Kit que se ha relacionado con la proliferación celular. Por ejemplo, se ha encontrado que la proliferación y migración de melanocitos en respuesta a la estimulación del SCF es de pendiente de PI3K (Jeon 2009). Se sabe que PI3K es activada tanto directamente uniéndose al residuo de tirosina Tyr721 de c-Kit (Lev 1992; Serve 1994), así como indirectamente a través de la unión con la proteína adaptadora fosforilada en residuos de tirosina GAB2 (Nishida 2002; Yu 2006). Además se ha observado que la inhibición de mTor con rapamicina provoca la inhibición de la proliferación inducida por el SCF así como la expresión de la ciclina D3 en cultivos celulares de espermatogonia (Feng 2000). Considerando que mTor se encuentra en la vía de señalización activada por PI3K, estos resultados muestran que esta vía podría estar involucrada en la proliferación de células de cáncer de próstata inducida por el SCF.

Por otro lado, Src y proteínas de la familia de cinasas Src (Src, Yes, Fyn, Lck, Hck, Lyn, Fgr, Blk) son activadas por receptores con actividad de cinasa de tirosinas incluyendo c-Kit (Gilfillan 2006; Roskoski 2005). Estudios muestran que la activación de las cinasas Lyn (Mous 1999; O'Laughlin-Bunner 2001) y Lck (Krystal 1998), inducen la proliferación celular en respuesta a la unión de c-Kit con el SCF en células de linaje hematopoyético y en células pequeñas de cáncer pulmonar (Lennartsson 1999; Timokhina 1998). Además, la estimulación de c-Kit con SCF activa también la vía de ERK1/2, la cual es importante para la proliferación celular (Sui 1998); en nuestro grupo se ha observado que el SCF induce la activación de ERK1/2 en células de cáncer cervical (Aguilar 2014).

En conjunto, lo anterior indica que las vías de señalización que podrían estar involucradas en el incremento de la proliferación inducido por SCF en células de cáncer de próstata son la vía de JAK/STAT, la vía de PI3K/Akt, la vía de las proteínas de la familia de cinasas Src y la vía de MAPK/ERK. Para identificar las vías de señalización involucradas en este proceso, se tendría que

hacer un análisis mediante Western blot de la fosforilación de las proteínas que conforman estas vías en respuesta a la activación de c-Kit por el SCF soluble; así como inhibir proteínas de las vías activadas para constatar su importancia en la proliferación inducida por el SCF. De esta forma, las vías que se identifiquen activas deben ser inhibidas para corroborar su papel en el incremento de la proliferación inducido por el SCF en células DU145 y PC3. Si al inhibirlas el efecto en la proliferación se abate, entonces se deduce que dicha cascada de señalización es importante en el incremento de la proliferación de células de cáncer de próstata en respuesta al SCF.

Por otra parte, dado que en ambas líneas celulares se observó un incremento significativo de la proliferación celular a los 6 días de incubación con 1 ng/mL de SCF, decidimos investigar si este incremento en la proliferación se correlacionaba con un aumento en el porcentaje de células que expresa a c-Kit en la membrana. Esto considerando que previamente se había reportado que la estimulación con 100 ng/mL de SCF por 24 y 48 hrs, incrementa significativamente el porcentaje de células DU145 y PC3 que expresan a c-Kit (Ma 2012). Contrario a lo reportado por Ma *et al* en el 2012, nosotros observamos que el SCF no incrementó el porcentaje de células que expresan c-Kit en la superficie celular, sino que el porcentaje disminuyó. No obstante, en el reporte de Ma y colaboradores no se especifica si el c-Kit detectado es membranal o citoplásmico. Además las diferencias observadas entre ambos trabajos podrían deberse a que la concentración de SCF con que nosotros estimulamos a las células fue cien veces menor e incubamos por más días que en el trabajo de Ma y colaboradores reportado en el 2012.

Sin embargo, hay que destacar que c-Kit ha sido asociado con la troncalidad celular, ya que se ha detectado en células troncales hematopoyéticas (Okada 1991), células troncales mesenquimales (Suphanantachat 2014) y en células troncales epiteliales de la próstata (Leong 2008). Durante la hematopoyesis, la expresión de c-Kit se va perdiendo conforme la diferenciación celular (Lennartsson 2012) lo cual también parece suceder en la próstata (Imura 2012; Simak 2000). En el cáncer, a las células cancerosas con características fenotípicas y funcionales de célula troncal se les han denominado “células troncales tumorales”, las cuales representan una proporción muy pequeña de la masa tumoral (Kong 2010). En ese sentido, diversos trabajos han propuesto que las células de cáncer de próstata que expresan c-Kit, podrían ser células troncales tumorales (Ceder 2008; Li 2008; Ma 2012). Si esto es así, se podría explicar por qué al estimular a células de cáncer de próstata con SCF la proporción de células que expresa a c-Kit en la membrana

disminuye, pues es probable que las células hijas pierdan la expresión de c-Kit mediante un proceso de división asimétrica, evento clásico de la diferenciación celular (Morrison 2006). Para probar esta hipótesis, se tendría que investigar si las células DU145 y PC3 que expresan c-Kit, efectivamente entran en ciclo celular al ser estimuladas con SCF. Para ello proponemos un el análisis por citometría de flujo de la expresión de c-Kit y de marcadores de proliferación como Ki67 y/o PCNA, de tal forma que si las células que expresan c-Kit expresan marcadores de proliferación en respuesta al SCF, entonces se podría afirmar que estas células proliferan en respuesta al SCF (Scholzen 2000). Además se tendría que corroborar que el número de células de cáncer de próstata que expresa a c-Kit no disminuye y que la proliferación se incrementa, esto en términos de porcentajes resultaría en una disminución de células que expresan c-Kit debido al incremento en el número de células que no lo expresan, demostrando que las células que expresan c-Kit proliferan y que las células hijas pierden la expresión de c-Kit.

Por otra parte, se sabe que la migración es un fenómeno fundamental en la metástasis (Hanahan 2011). En general, el SCF no es considerado un factor quimio-atrayente, sin embargo se sabe que durante el desarrollo embrionario los melanocitos migran en respuesta a la estimulación del SCF y que dicho efecto es dependiente de la activación de PI3K (Jeon 2009). Además, se ha reportado que el SCF induce la quimiotaxis de células cebadas (Sundström 2001). Asimismo, se sabe que gracias a la existencia de un gradiente de SCF y de la quimiocina SDF-1, CTHs que salen de la médula ósea y entran al torrente sanguíneo logran regresar a su nicho en la médula ósea (Méndez-Ferrer 2008; Nervi 2006). Por otra parte, en células cancerosas se ha observado que el SCF incrementa la migración y el potencial invasivo de células de cáncer de colon (Bellone 2001) y de cáncer de páncreas (Yasuda 2006). Además, nuestro grupo ha observado que el SCF induce significativamente la migración de células de cáncer cervical, y que este efecto es mediado por las vías de señalización de JAK2 y MAPK/ERK (Aguilar 2014). Por lo tanto, evaluamos el efecto del SCF en la migración de células de cáncer de próstata.

Mediante dos ensayos de migración distintos observamos que el SCF no induce la quimiotaxis de células de cáncer de próstata. El primer ensayo se evaluó por colorimetría y no se observó algún incremento significativo de la migración en ninguna de las dos líneas celulares de cáncer de próstata. Sin embargo, dado que el porcentaje de células que expresa a c-Kit en la membrana es muy pequeño, realizamos un segundo ensayo de migración y la evaluación se hizo mediante el

conteo directo de las células que migraron. A pesar de que este segundo ensayo es mucho más sensible que el primero, no se detectó algún incremento significativo de la migración de células DU145 o PC3. Estos resultados difieren de los reportado por Savarese *et al* en 1998, ya que ellos observaron que las concentraciones de 4 y 40 ng/mL de SCF incrementaron significativamente ($p \leq 0.05$) la migración de células PC3, pero no la migración de células DU145. Es importante destacar que la evaluación de la migración reportada por Savarese *et al* consistió en un conteo manual de 10 campos por inserto usando un microscopio óptico y un aumento 40X. Por nuestra parte, la evaluación de la migración que hicimos en el segundo ensayo fue tiñendo los núcleos de las células con DAPI y haciendo un conteo semi-automático usando el software ImageJ de micrografías de 5 campos al azar hechas en un microscopio confocal con un aumento 10X. Tanto el uso de fluorescencia como el conteo con el software ImageJ reducen en gran medida la incidencia de error humano en la evaluación de la migración. Por otra parte, nuestras observaciones coinciden con las de Savarese y colaboradores, en que el SCF no induce la migración de células DU145. No obstante, sería útil realizar más estudios para corroborar el efecto del SCF en la migración de células de cáncer de próstata. Por ejemplo, aislar células DU145 y PC3 que expresen c-Kit en la membrana celular y probar si el SCF induce o no su quimiotaxis, contribuiría enormemente a aclarar el efecto del SCF en la migración de células de cáncer de próstata.

Además de la proliferación y la migración, la sobrevivencia de las células cancerosas es un elemento crucial para la formación de metástasis (Hanahan 2011). Cuando células cancerosas se intravasan en los vasos sanguíneos o linfáticos, éstas se enfrentan a un microambiente totalmente distinto al de su tejido de origen; en particular, la sangre es un ambiente hostil para una célula cancerosa (Joyce 2009). Por ejemplo, se ha estimado que de decenas de miles de células cancerosas que ingresan al torrente sanguíneo, menos del 0.01% de éstas logra sobrevivir y formar metástasis (Chambers 2002, Fidler 1970); por lo tanto elementos que favorezcan su sobrevivencia son de especial interés en el estudio de la metástasis. Se ha demostrado que el SCF incrementa la sobrevivencia de CTHs (Kent 2008), así como de varios progenitores hematopoyéticos en ausencia de división celular (Keller 1995). Adicionalmente se ha reportado que el SCF protege de la apoptosis a células de cáncer de colon (Bellone 2001), y nuestro grupo ha mostrado evidencia de que el SCF es un factor de sobrevivencia para células de cáncer cervical (Aguilar 2014; Caceres-Cortes 2001). En células de cáncer de próstata se ha reportado que el SCF no protege de la apoptosis a células DU145 ni a células PC3 (Savarese 1998). Sin embargo, en dicho estudio se

evaluó el efecto del SCF en la muerte celular incubando a las células de cáncer de próstata en ausencia de SFB por 5 días. Considerando que el porcentaje de células DU145 y PC3 que expresa a c-Kit en la membrana es muy pequeño y que nosotros detectamos un incremento significativo en la proliferación de ambas líneas celulares hasta los 6 días de incubación con SCF, pensamos que convendría evaluar el efecto del SCF en la sobrevivencia de células DU145 y PC3 en periodos de tiempo más largos. Extendimos la incubación de células DU145 y PC3 en ausencia de nutrientes a 12 y 6 días respectivamente. A dichos días de incubación, en el microscopio se observaban diferencias en el número de células sobrevivientes entre los grupos tratados y el control sin tratamiento; sin embargo, estos números de células ya no eran detectables por ensayos colorimétricos. Por lo tanto, recuperamos a las células sobrevivientes incubándolas en presencia de nutrientes por 12 días y comparamos el número de células que crecieron entre los grupos con SCF y el control sin tratamiento. Encontramos que el SCF protege significativamente de la muerte inducida por falta de nutrientes a células DU145, pero no a células PC3. Esto podría deberse a diferencias en los perfiles de expresión de proteínas anti-apoptóticas o a diferencias en las vías de señalización activadas por el SCF entre ambas líneas celulares.

Para conocer el mecanismo molecular mediante el cual la activación de c-Kit con el SCF protege a las células DU145 de la muerte inducida por falta de nutrientes, se tendrían que evaluar las vías de señalización activadas e inhibirlas para corroborar su papel en este fenómeno. En ese sentido la vía de señalización de PI3K/Akt podría ser importante. Se ha reportado que la protección de la apoptosis inducida por c-Kit se debe en gran medida a la señalización mediada por PI3K en células de linaje hematopoyético (Timokhina 1998). Por otra parte, se sabe que tanto el SCF como c-Kit son fuertemente expresados por el sistema nervioso central en el adulto (Hirota 1992; Morii 1992), y que el SCF protege de la muerte a neuronas de la corteza cerebral mediante la activación de Akt y NF- κ B (Dhandapani 2005). Lo anterior es especialmente interesante considerando que las células DU145 son células de cáncer de próstata derivadas de una metástasis en cerebro (Stone 1978). La proteína Akt se encuentra río abajo en la cascada de señalización de PI3K, e induce la sobrevivencia celular interfiriendo con el inicio de la apoptosis (Datta 1997). Se sabe además que la activación completa de Akt requiere una fosforilación en el residuo Ser473 del dominio regulador en el COOH-terminal, y que dicha fosforilación es mediada por el complejo 2 mTor (Sarbasov 2005). Por otra parte, se ha reportado que la activación de Akt induce la sobrevivencia celular mediante la fosforilación de Bad (Blume-Jensen 1998), Foxo (Brunet 1999), y la activación

de NF- κ B (Dhandapani 2005). Por lo tanto el análisis de la fosforilación de PI3K/Akt y de las proteínas mTor, Bad, Foxo y NF- κ B, sería útil en la búsqueda de los mecanismos moleculares activados por la estimulación de c-Kit con el SCF y su efecto en la sobrevivencia de células DU145. Adicionalmente, se ha observado que la unión del SCF con c-Kit puede inducir la activación de Btk, la cual interacciona con TRAIL promoviendo posiblemente la sobrevivencia celular (Schmidt 2004). Asimismo, se ha sugerido que la activación de proteínas de la familia de cinasas Src mediada por la unión del SCF con c-Kit, también contribuye con la sobrevivencia celular (Nishio 2001; Timokhina 1998).

Se sabe que los tumores se componen de una población altamente heterogénea de células (Gerlinger 2012; Nevins 2007). En consecuencia, las células cancerosas en cultivo exhiben una heterogeneidad fenotípica sustancial en varios aspectos, como en la sensibilidad a fármacos o en la capacidad de crecer en diversas condiciones (Mori 2009). Entre éstas, la capacidad de crecer de manera independiente al anclaje (capacidad de formar colonias en medio semi-sólido), es fundamental en el cáncer ya que se ha vinculado con la agresividad cancerosa de las células *in vivo*, es decir con su capacidad de formar tumores *de novo* y su potencial de formar metástasis (Cifone 1980; Weinberg 2007). Por ejemplo, se ha observado que las células cancerosas que muestran una mayor capacidad de formar colonias tienen un potencial metastásico mayor en modelos animales (Cifone 1980; Price 1986). Por otra parte, se ha reportado que células cancerosas humanas obtenidas de lesiones metastásicas tienen mayor capacidad de crecer de manera independiente al anclaje en cultivos primarios (Johns 1983; Mattox 1980; Nomura 1989; Sutherland 1983).

En ese sentido la presencia de factores que favorezcan el crecimiento clonogénico e independiente de anclaje de células cancerosas puede ser un elemento limitante en la formación de metástasis. Estudios previos han demostrado que el SCF es capaz de incrementar el potencial de formar colonias de células de cáncer de colon (Bellone 1997). Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo ha reportado que el SCF incrementa el número de colonias de células de cáncer cervical formadas en agar suave (Aguilar 2014). En células de cáncer de próstata, nuestros resultados sugieren que el SCF es capaz de incrementar significativamente el crecimiento independiente de anclaje de células PC3, pero no se observó algún incremento significativo en células DU145 después de 8 días de incubación. Por otra parte, Savarese *et al* reportaron en 1998 que un amplio

rango de concentraciones de SCF estimuló significativamente el crecimiento clonogénico en agar suave de células DU145, pero no de células PC3 ni LnCAP después de 21 días de incubación. Por el contrario, Ma y colaboradores publicaron en el 2012 que una concentración de 100 ng/mL de SCF incrementa significativamente la formación de colonias en placas y la formación de esferas de células DU145 y PC3 después de 10 días de incubación, siendo controversiales los resultados de crecimiento independiente de anclaje en respuesta al SCF de estas dos investigaciones, principalmente en las células PC3. No obstante, en ambos trabajos la evaluación del número de colonias formadas en placa o de manera independiente al anclaje fue hecha mediante un conteo manual usando un microscopio óptico, lo que implica un mayor grado de subjetividad y una mayor probabilidad de incidencia de error humano al momento de evaluar los ensayos. Por nuestra parte, la evaluación del crecimiento independiente de anclaje se realizó mediante un ensayo colorimétrico. Consideramos que es probable que nosotros no hayamos observado diferencias significativas en el número de células DU145 que crecieron en agar suave, debido a que éstas tienen una tasa de crecimiento intrínseco mucho menor a la de las células PC3. Por lo tanto, sería importante realizar cinéticas de crecimiento en agar suave por tiempos más prolongados para definir con mayor precisión si efectivamente el efecto del SCF en el crecimiento independiente de anclaje se observa sólo en las células PC3 o también en células DU145.

Adicionalmente observamos que las células DU145 y PC3 capaces de formar colonias en agar suave son células que expresan c-Kit y que dicha expresión en condiciones de crecimiento independiente al anclaje no depende de la presencia o ausencia del SCF en el espacio extracelular. Este resultado fue muy sorprendente y es muy importante, pues sugiere que a pesar de que la proporción de células de cáncer de próstata que expresan c-Kit *in vitro* representa una minoría, éstas podrían ser las células capaces de formar una metástasis *de novo*. Por lo tanto, si la capacidad de crecer de manera independiente al anclaje se asocia positivamente con la expresión de c-Kit, entonces la presencia de SCF en el microambiente resultaría favorable para el inicio y consolidación de la metástasis de cáncer de próstata. Para investigar esto sería interesante separar a las células DU145 y PC3 que no expresan a c-Kit en los cultivos *in vitro*, sembrarlas en agar suave y evaluar si forman o no colonias. Finalmente, sería crucial recuperar a las células que crecen en agar suave y que expresan c-Kit para hacer xenotrasplantes en modelos murinos, posteriormente evaluar su potencial tumorigénico y metastásico *in vivo* en comparación con las

células DU145 y PC3 que no fueron sometidas al crecimiento independiente de anclaje y con las que no expresan c-Kit.

Estos ensayos serían muy importantes en el estudio de c-Kit y del SCF en la metástasis de cáncer de próstata ya que se ha reportado que el SCF es capaz de incrementar el porcentaje de células DU145 y PC3 que expresan a las proteínas de superficie c-Kit, ABCG2 y CD44, así como a los factores de transcripción Oct3/4 y Nanog (Ma 2012). Estas proteínas han sido asociadas con la troncalidad de una célula, por ejemplo c-Kit ha sido detectado en células troncales hematopoyéticas (Okada 1991), troncales mesenquimales (Suphanantachat 2014) y troncales epiteliales prostáticas (Leong 2008). ABCG2 ha sido postulado como un marcador de troncalidad universal (Zhou 2001), pues se ha demostrado su expresión en distintos tipos de células troncales como hematopoyéticas (Goodell 1997), epiteliales prostáticas (Pascal 2007), cardíacas (Martin 2004) y hepáticas (Shimano 2003). CD44 se expresa en la mayoría de las células basales de la próstata y se ha observado que las células de cáncer de próstata que lo expresan, tienen un potencial tumorigénico y metastásico intrínseco mayor que las que no lo expresan (Patrawala 2006). Por su parte, los factores de transcripción Oct3/4 y Nanog son factores críticamente involucrados en la auto-renovación y mantenimiento de la troncalidad de células troncales embrionarias (Chambers 2003; Niwa 2000). Con base en lo anterior, Ma y colaboradores sugieren que el SCF puede aumentar la expresión de marcadores de células troncales. Además proponen que el SCF es un factor dentro de la médula ósea que puede, junto con otros factores, incrementar las propiedades troncales de células de cáncer de próstata (Ma 2012).

Considerando estas observaciones y que nuestros resultados muestran que la mayoría de las células que crecen en agar suave expresan a c-Kit, sería crucial investigar el potencial metastásico *in vivo* de estas células. De hecho, se ha propuesto que las células de cáncer de próstata que expresan c-Kit, podrían ser células troncales tumorales (Ceder 2008; Li 2008; Ma 2012). Además, células de cáncer de próstata que expresan c-Kit ya han sido detectadas en lesiones metastásicas de pacientes (Kleeberger 2007). Esto es importante pues se considera que las células cancerosas con características de célula troncal son capaces de generar tumores *de novo*, por lo que han sido estrechamente vinculadas con los procesos de recaída y metástasis en el cáncer (La Porta 2012). Adicionalmente, se ha observado que células con estas características presentan una resistencia

incrementada a la terapia convencional del cáncer, comparada con la que presentan células tumorales diferenciadas que componen la mayor parte de la masa tumoral (Pascal 2007).

Por otra parte, observamos que las células que expresan c-Kit son aquellas que se encuentran adheridas unas a otras en las colonias que crecieron en medio semi-sólido. Estas células permanecieron adheridas entre si a pesar de que la suspensión celular fue disgregada mecánicamente en repetidas ocasiones. Considerando que la expresión de c-Kit en las colonias que crecieron en agar suave no depende de la presencia de SCF soluble en el medio extracelular, sería importante evaluar la expresión de SCF membranal en estas células, ya que se sabe que éste también activa a c-Kit (Anderson 1990), y que la estimulación de c-Kit con el SCF soluble o membranal no es redundante (Gommerman 2000). De hecho, estudios previos indican que el SCFm protege de la muerte a células hematopoyéticas multipotenciales con mayor eficiencia que el SCF soluble (Williams 1992). Además, nuestro grupo ha reportado que células de cáncer cervical expresan SCFm, siendo la co-expresión del SCFm y c-Kit un elemento determinante en la sobrevivencia celular y la interacción célula-célula de carcinomas cervicales. En consecuencia, se ha propuesto que la estimulación yuxtácrina mediante factores de crecimiento membranales, podría ser un elemento fundamental en la interacción célula-célula en el progreso tumoral (Caceres-Cortes 2001).

Wiesner y colaboradores, reportaron que células DU145 y PC3 expresan SCFm. Además, en concordancia con estudios previos demostraron que la vida media del SCFm es 10 o más veces mayor que la vida media del SCF soluble (Flanagan 1991; Huang 1992; Wiesner 2008). Por lo tanto, Wiesner *et al* proponen que es probable la interacción yuxtácrina entre el SCFm y c-Kit de células de cáncer de próstata adyacentes. Además, en ese trabajo desarrollaron un modelo *in vivo* en el que xenotrasplantaron médula ósea de humano en ratones C.B-17 *scid/scid*, posteriormente colocaron células PC3 en la médula y analizaron la expresión de c-Kit en éstas 4 semanas después de sembrarlas. Encontraron que la expresión de c-Kit en las células PC3 que fueron colocadas en la médula ósea aumentó significativamente a diferencia de los tumores subcutáneos de células PC3. Posteriormente, para investigar si lo anterior es consecuencia de la interacción de las células PC3 con células del microambiente de la médula ósea, co-cultivaron células PC3 con células estromales de la médula ósea. Después de 24 hrs aislaron a las células PC3 y analizaron la expresión de c-Kit en estas. Interesantemente no detectaron diferencias en la expresión de c-Kit entre las células PC3

co-cultivadas con células estromales de médula ósea y células PC3 solas. Wiesner y colaboradores atribuyen esto a que las condiciones *in vivo* no son completamente replicadas por el co-cultivo con células estromales de médula ósea. No obstante, nuestros resultados sugieren que someter a las células de cáncer de próstata al crecimiento independiente de anclaje induce la expresión de c-Kit en estas células o selecciona a las que ya expresan a c-Kit, incrementando la frecuencia de expresión de c-Kit en estas células. Si consideramos que la médula ósea es un tejido en constante recambio celular, es probable que represente un ambiente en el que las células de cáncer de próstata no logren adherirse y entonces deban crecer de manera independiente al anclaje como en el agar suave. En ese sentido, la presencia de SCF soluble y membranal, tanto en células cancerosas como del microambiente representaría un elemento favorable para el inicio, progresión y consolidación de la metástasis de cáncer de próstata en la médula ósea. Asimismo, al haber detectado cantidades importantes de c-Kit en el citoplasma de células DU145 y PC3 después de haber sido cultivadas en agar suave, es importante evaluar la posibilidad de que el SCF interactúe con c-Kit y señalice de manera intracelular, como ha sido detectado previamente en células neoplásicas (Browder 1989).

En conjunto estos resultados sugieren fuertemente que c-Kit podría ser un elemento importante tanto en la metástasis ósea de cáncer de próstata como en la metástasis en otros órganos, ya que el SCF incrementó el potencial metastásico de células de cáncer de próstata sin que su origen metastásico fuera un elemento determinante. Además mostramos evidencia de que la mayoría de células DU145 y PC3 capaces de crecer de manera independiente al anclaje expresan a c-Kit. Esto es importante porque el eje c-Kit/SCF podría ser un elemento crucial de la metástasis de cáncer de próstata de manera más general, a diferencia del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y su ligando, los cuales se ha mostrado que tienen efecto sólo en células PC3 y no en células DU145 ni LnCAP (Doloff 2005). Estos resultados son un precedente para investigaciones futuras que indaguen mediante modelos *in vivo* la presunta importancia de c-Kit y del SCF en la metástasis de cáncer de próstata.

Finalmente, de ser corroboradas nuestras observaciones *in vivo*, se podría proponer que la expresión y activación de c-Kit en células de cáncer de próstata podría alterar directamente el comportamiento del tumor y, por lo tanto, representar un blanco terapéutico potencial y/o un marcador de la metástasis del cáncer de próstata.

7.- Conclusiones

- Las células de cáncer de próstata DU145 y PC3 expresan al receptor c-Kit.
- El porcentaje de células que expresa a c-Kit en la membrana corresponde al 3.88% y 0.88% de células DU145 y PC3, respectivamente.
- La estimulación con SCF soluble incrementa significativamente la proliferación de células DU145 y PC3.
- El porcentaje de células DU145 y PC3 que expresan c-Kit disminuye al ser estimuladas con SCF.
- El SCF no ejerce un efecto quimioatrayente en células DU145 ni PC3.
- La estimulación con SCF protege significativamente de la muerte inducida por falta de nutrientes a células DU145, pero no a células PC3.
- El SCF incrementa significativamente la capacidad de células PC3, de crecer de manera independiente al anclaje.
- La mayoría de células DU145 y PC3 que tienen la capacidad intrínseca de crecer de manera independiente al anclaje, expresan c-Kit.

8.- Perspectivas

Corroborar la participación del eje SCF/c-Kit en la proliferación, protección contra la muerte y crecimiento independiente de anclaje. Para ello propongo estimular a las células con SCF posterior a la interrupción de la expresión de c-Kit mediante ARN interferente, inhibición de su activación mediante la adición de inhibidores químicos y/o la neutralización del SCF añadido usando un anticuerpo neutralizante.

Estudiar las vías de señalización activadas por la unión del SCF con c-Kit, y determinar cuales son las involucradas en el incremento de la proliferación, la protección contra la apoptosis y el aumento en el crecimiento independiente de anclaje de células de cáncer de próstata. Este estudio podría realizarse haciendo Western blot e inhibiendo químicamente las vías activadas para conocer su papel en los fenómenos antes mencionados.

Investigar el potencial metastásico *in vivo* de las células capaces de crecer de manera independiente al anclaje y que expresan c-Kit. Con esa finalidad, estas células podrían recuperarse del agar e inyectarse en un modelo murino para evaluar su capacidad de crecimiento y formación de metástasis.

Analizar la expresión del SCF membranal en las células de cáncer de próstata capaces de crecer en agar suave mediante microscopía de fluorescencia. Para ello propongo hacer una doble tinción

contra el SCF y c-Kit, y determinar si el SCF es expresado por estas células en la membrana y si este interacciona con el receptor c-Kit en células adyacentes.

Estudiar si existe una correlación entre la expresión de c-Kit y la expresión de presuntos marcadores de células troncales de cáncer de próstata como CD44⁺/α₂β₁^{hi}/CD133⁺ (Collins 2005), así como ABCG2⁺ (Ma 2012) en células DU145 y PC3 mediante citometría de flujo. Asimismo analizar la expresión estas proteínas en las células capaces de crecer en agar suave mediante PCR cuantitativo y microscopía de fluorescencia.

Determinar mediante el crecimiento en agar suave de células DU145 y PC3 que no expresan c-Kit, si el alto porcentaje de células que expresa a c-Kit con la capacidad de crecer de manera independiente al anclaje es un proceso de selección natural o de inducción de expresión mediada por el microambiente.

9.- Referencias

1. Aguilar C, Aguilar C, Lopez-Marure R, Jiménez-Sánchez A, Rocha-Zavaleta L. **Co-stimulation with stem cell factor and erythropoietin enhances migration of c-Kit expressing cervical cancer cells through the sustained activation of ERK1/2.** Mol Med Rep; En prensa. (2014)
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell.** 4th edition. Garland Science; New York, USA. (2002)
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell.** 5th edition. Reference edition. Garland Science; New York, USA. (2008)
4. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. **DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation.** FEBS Lett; 580: 2294-2300. (2006)
5. American Cancer Society. **Global cancer facts & figures.** 2nd edition. American Cancer Society; Atlanta, USA. (2011)
6. Amory JK, Anawalt BD, Matsumoto AM, Page ST, Bremner WJ, Wang C, Swerdloff RS, Clark RV. **The effect of 5α-Reductase inhibition with Dutasteride and Finasteride on bone mineral density, serum lipoproteins, hemoglobin, Prostate Specific Antigen and sexual function in healthy young men.** J Urol; 179: 2333-2338. (2008)
7. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, March CJ, Boswell HS, Gimpel SD, Cosman D, **Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms.** Cell; 63: 235-243. (1990)

8. Anderson DM, Williams DE, Tushinski R, Gimpel S, Eisenman J, Cannizzaro LA, Aronson M, Croce CM, Huebner K, Cosman D. **Alternative splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22q24.** Cell Growth Differ; 2: 373- 378. (1991)
9. Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. **K562--a human erythroleukemic cell line.** Int J Cancer; 23: 143-147. (1979)
10. Antonescu CR. **The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers.** J Pathol; 223: 251-261. (2011)
11. Arakawa T, Yphantis DA, Lary JW, Narhi LO, Lu HS, Prestrelski SJ, Clogson CL, Zsebo KM, Mendiaz EA, Wypych J. **Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure.** J Biol Chem; 266: 18942-18948. (1991)
12. Ashman LK. **The biology of stem cell factor and its receptor C-kit.** Int J Biochem Cell Biol; 31: 1037-1051. (1999)
13. Ashman LK, Ferrao P, Cole SR, Cambareri AC. **Effects of mutant c-kit in early myeloid cells.** Leuk Lymphoma; 37: 233-243. (2000)
14. Balk SP, Ko YJ, Bublely GJ. **Biology of prostate-specific antigen.** J Clin Oncol; 21: 383-391. (2003)
15. Batson OV. **The function of the vertebral veins and their role in the spread of metastases.** Clin Orthop Relat Res; 312: 4-9. (1995)
16. Bedell MA, Copeland NG, Jenkins NA. **Multiple pathways for Steel regulation suggested by genomic and sequence analysis of the murine Steel gene.** Genetics; 142: 927-934. (1996)
17. Bellone G, Carbone A, Sibona N, Bosco O, Tibaudi D, Smirne C, Martone T, Gramigni C, Camandona M, Emanuelli G, Rodeck U. **Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential.** Cancer Res; 61: 2200-2206. (2001)
18. Bellone G, Silvestri S, Artusio E, Tibaudi D, Turletti A, Geuna M, Giachino C, Valente G, Emanuelli G, Rodeck U. **Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF-beta 1.** J Cell Physiol; 172: 1-11. (1997)

19. Bernex F, De Sepulveda P, Kress C, Elbaz C, Delouis C, Panthier JJ. **Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in WlacZ/+ and WlacZ/WlacZ mouse embryos.** *Development*; 122: 3023-3033. (1996)
20. Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF. **The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis.** *Dev Suppl*; 125-137. (1993)
21. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, Snyder HW Jr, Brodeur D, Zuckerman EE, Hardy WD. **A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family.** *Nature*; 320: 415-421. (1986)
22. Bild AH, Potti A, Nevins JR. **Linking oncogenic pathways with therapeutic opportunities.** *Nat Rev Cancer*; 6: 735-741. (2006)
23. Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. **The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136.** *Curr Biol*; 8: 779-782. (1998)
24. Blume-Jensen P, Rönstrand L, Gout I, Waterfield MD, Heldin C. **Modulation of kit/stem cell factor receptor-induced signaling by protein kinase C.** *J Biol Chem*; 269: 21793-21802. (1994)
25. Blume-Jensen P, Siegbahn A, Stabel S, Heldin C, Rönstrand L. **Increased kit/SCF receptor induced mitogenicity but abolished cell motility after inhibition of protein kinase C.** *EMBO J*; 12: 4199-4209. (1993)
26. Blume-Jensen P, Wernstedt C, Heldin CH, Rönstrand L. **Identification of the major phosphorylation sites for protein kinase C in kit/stem cell factor receptor in vitro and in intact cells.** *J Biol Chem*; 270: 14192-14200. (1995)
27. Bonekamp D, Jacobs MA, El-Khouli R, Stoianovici D, Macura KJ. **Advancements in MR imaging of the prostate: from diagnosis to interventions.** *Radiographics*; 31: 677-703. (2011)
28. Broudy V. **Stem cell factor and hematopoiesis.** *Blood*; 90: 1345-1364. (1997)
29. Broudy VC, Lin NL, Bühring HJ, Komatsu N, Kavanagh TJ. **Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer.** *Blood*; 91: 898-906. (1998)
30. Broudy VC, Smith FO, Lin N, Zsebo KM, Egrie J, Bernstein ID. **Blasts from patients with acute myelogenous leukemia express functional receptors for stem cell factor.** *Blood*; 80: 60-67. (1992)

31. Browder TM, Dunbar CE, Nienhuis AW. **Private and public autocrine loops in neoplastic cells.** *Cancer Cells* (Cold Spring Harbor); 1: 9-17. (1989)
32. Brown JM, Attardi LD. **The role of apoptosis in cancer development and treatment response.** *Nat Rev Cancer*; 5: 231-237. (2005)
33. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell*; 96: 857-868. (1999)
34. Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, Gasser TC, Mihatsch MJ. **Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients.** *Hum Pathol*; 31: 578-583. (2000)
35. Buttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J. **Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior.** *J Invest Dermatol*; 111: 1227-1231. (1998)
36. Caceres-Cortes JR, Alvarado-Moreno JA, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-Garcia A, Rocha-Zavaleta L, Urdiales-Ramos J, Weiss-Steider B, Haman A, Hugo P, Brousseau R, Hoang T. **Implication of tyrosine kinase receptor and Steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias.** *Cancer Res*; 61: 6281-6289. (2001)
37. Casaletto JB, McClatchey AI. **Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer.** *Nat Rev Cancer*; 12: 387-400. (2012)
38. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, *et al.* **Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men.** *J Urol*; 151: 1283-1290. (1994)
39. Ceder JA, Jansson L, Ehrnström RA, Rönstrand L, Abrahamsson PA. **The characterization of epithelial and stromal subsets of candidate stem/progenitor cells in the human adult prostate.** *Eur Urol*; 53: 524-531. (2008)
40. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** *Nat Rev Cancer*; 2: 563-572. (2002)

41. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. **Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.** Cell; 113: 643-655. (2003)
42. Chan PM, Ilangumaran S, La Rose J, Chakrabartty A, Rottapel R. **Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region.** Mol Cell Biol; 23: 3067-3078. (2003)
43. Chi KN, Bjartell A, Dearnaley D, Saad F, Schröder FH, Sternberg C, Tombal B, Visakorpi T. **Castration-resistant prostate cancer: from new pathophysiology to new treatment targets.** Eur Urol; 56: 594-605. (2009)
44. Cifone MA, Fidler IJ. **Correlation of patterns of anchorage-independent growth with *in vivo* behavior of cells from a murine fibroblastoma.** Proc Natl Acad Sci USA; 77: 1039-1043. (1980)
45. Coghlin C, Murray GI. **Current and emerging concepts in tumour metastasis.** J Pathol; 222: 1-15. (2010)
46. Cohen RJ, Shannon BA, Phillips M, Moorin RE, Wheeler TM, Garrett KL. **Central zone carcinoma of the prostate gland: a distinct tumor type with poor prognostic features.** J Urol; 179: 1762-1767. (2008)
47. Coleman RE. **Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity.** Clin Cancer Res; 12: 6243s-6249s. (2006)
48. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. **Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells.** Cancer Res; 65: 10946-10951.
49. Condeelis J, Segall JE. **Intravital imaging of cell movement in tumours.** Nat Rev Cancer; 3: 921-930. (2003)
50. Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. **Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology.** Nat Rev Cancer; 11: 865-878. (2011)
51. Crosier PS, Ricciardi ST, Hall LR, Vitas MR, Clark SC, Crosier KE. **Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia.** Blood; 82: 1151-1158. (1993)
52. Czyż J, Szpak K, Madeja Z. **The role of connexins in prostate cancer promotion and progression.** Nat Rev Urol; 9: 274-282. (2012)

53. d'Auriol L, Mattei MG, Andre C, Galibert F. **Localization of the human *c-kit* protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4.** Hum Genet; 78: 374-376. (1988)
54. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. **Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.** Cell; 91: 231-241. (1997)
55. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. **Inflammation in prostate carcinogenesis.** Nat Rev Cancer; 7: 256-269. (2007)
56. Deberry C, Mou S, Linnekin D. **Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor.** Biochem J; 327(Pt 1): 73-80. (1997)
57. Dhandapani KM, Wade FM, Wakade C, Mahesh VB, Brann DW. **Neuroprotection by stem cell factor in rat cortical neurons involves AKT and NFkappaB.** J Neurochem; 95: 9-19. (2005)
58. Di Lorenzo G, Autorino R, D'Armiento FP, Mignogna C, De Laurentiis M, De Sio M, D'Armiento M, Damiano R, Vecchio G, De Placido S. **Expression of proto-oncogen c-kit in high risk prostate cancer.** EJSO; 30: 987-992. (2004)
59. DiNitto JP, Deshmukh GD, Zhang Y, Jacques SL, Coli R, Worrall JW, Diehl W, English JM, Wu JC. **Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance.** J Biochem; 147: 601-609. (2010)
60. Disibio G, French SW. **Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study.** Arch Pathol Lab Med; 132: 931-939. (2008)
61. Dolloff NG, Shulby SS, Nelson AV, Stearns ME, Johannes GJ, Thomas JD, Meucci O, Fatatis A. **Bone-metastatic potential of human prostate cancer cells correlates with Akt/PKB activation by alpha platelet-derived growth factor receptor.** Oncogene; 24: 6848-6854. (2005)
62. Drube S, Heink S, Walter S, Löhn T, Grusser M, Gerbaulet A, Berod L, Schons J, Dudeck A, Freitag J, Grotha S, Reich D, Rudeschko O, Norgauer J, Hartmann K, Roers A, Kamradt T. **The receptor tyrosine kinase c-Kit controls IL-33 receptor signaling in mast cells.** Blood; 115: 3899-3906. (2010)
63. Duarte RF, Franck DA. **SCF and G-CSF lead to the synergistic induction of proliferation and gene expression through complementary signaling pathways.** Blood; 96: 3422-3430. (2000)
64. Eccles SA, Welch DR. **Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies.** Lancet; 369: 1742-1757. (2007)

65. Edling CE, Pedersen M, Carlsson L, Rönstrand L, Palmer RH, Hallberg B. **Haematopoietic progenitor cells utilise conventional PKC to suppress PKB/Akt activity in response to c-Kit stimulation.** Br J Haematol; 136: 260-268. (2007)
66. Ellis WJ, Pfitzenmaier J, Colli J, Arfman E, Lange PH, Vessella RL. **Detection and isolation of prostate cancer cells from peripheral blood and bone marrow.** Urology; 61: 277-281. (2003)
67. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL, ISUP Grading Committee. **The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma.** Am J Surg Pathol; 29: 1228-1242. (2005)
68. Farrow B, Albo D, Berger DH. **The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cells.** J Surg Res; 149: 319-328. (2008)
69. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C. **MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation.** Proc Natl Acad Sci USA; 102: 18081-18086. (2005)
70. Feng LX, Ravindranath N, Dym M. **Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia.** J Biol Chem; 275: 25572-25576. (2000)
71. Fidler IJ. **Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine.** J Natl Cancer Inst; 45: 773-782. (1970)
72. Fidler IJ. **The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.** Nat Rev Cancer; 3: 453-458. (2003)
73. Flanagan JG, Chan DC, Leder P. **Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the *Sld* mutant.** Cell; 64: 1025-1035. (1991)
74. Fusaki N, Iwamatsu A, Iwashima M, Fujisawa J. **Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling.** J Biol Chem; 272: 6214-6219. (1997)
75. Gao XN, Lin J, Gao L, Li YH, Wang LL, Yu L. **MicroRNA-193b regulates c-Kit proto-oncogene and represses cell proliferation in acute myeloid leukemia.** Leuk Res; 35: 1226-1232. (2011)
76. García JA, Rini BI. **Castration-resistant prostate cancer: many treatments, many options, many challenges ahead.** Cancer; 118: 2583-2593. (2012)

77. Gatz CE, Holtzhausen A, Kirkbride KC, Morton A, Gatz ML, Datto MB, Blobe GC. **Type III TGF- β receptor enhances colon cancer cell migration and anchorage-independent growth.** *Neoplasia*; 13: 758-770. (2011)
78. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. **Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing.** *N Engl J Med*; 366: 883-892. (2012)
79. Gilfillan AM, Tkaczyk C. **Integrated signalling pathways for mast-cell activation.** *Nat Rev Immunol*; 6: 218-230. (2006)
80. Gommerman JL, Sittaro D, Klebavz NZ, Williams DA, Berger SA. **Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential.** *Blood*; 96: 3734-3742. (2000)
81. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Jhonson RP. **Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exists in multiple species.** *Nat Med*; 3: 1337-1345. (1997)
82. Grebier F, Kerenyi MA, Kovacic B, Kolbe T, Becker V, Dolznig H, Pfeffer K, Klingmüller U, Müller M, Beug H, Müllner EW, Moriggl R. **Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2.** *Blood*; 111: 4511-4522. (2008)
83. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. **The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy.** *Nat Rev Cancer*; 4: 361-370. (2004)
84. Guise T. **Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment.** *Semin Oncol*; 2: S2-14. (2010)
85. Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I. **Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation.** *Nat Cell Biol*; 5: 461-466. (2003)
86. Hamburger AW, Lurie KA, Condon ME. **Stimulation of anchorage-independent growth of human tumor cells by Interleukin 1.** *Cancer Res*; 47: 5612-5615. (1987)

87. Han ZB, Ren H, Zhao H, Chi Y, Chen K, Zhou B, Liu YJ, Zhang L, Xu B, Liu B, Yang R, Han ZC. **Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF).** *Carcinogenesis*; 29: 1853-1861. (2008)
88. Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell*; 100: 57-70. (2000)
89. Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*; 144: 646-674. (2011)
90. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. **Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies.** *J Clin Oncol*; 20: 1692-1703. (2002)
91. Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ. **Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations.** *Urology*; 50: 239-243. (1997)
92. Hess KR, Varadhachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R, Abbruzzese JL. **Metastatic patterns in adenocarcinoma.** *Cancer*; 106: 1624-1633. (2006)
93. Hibi K, Takahashi T, Sekido Y, Ueda R, Hida T, Ariyoshi Y, Takagi H, Takahashi T. **Coexpression of the stem cell factor and the c-kit genes in small-cell lung cancer.** *Oncogene*; 6: 2291-2296. (1991)
94. Hida T, Ueda R, Sekido Y, Hibi K, Matsuda R, Ariyoshi Y, Sugiura T, Takahashi T, Takahashi T. **Ectopic expression of c-kit in small-cell lung cancer.** *Int J Cancer Suppl*; 8: 108-109. (1994)
95. Hirota S, Ito A, Morii E, Wanaka A, Tohyama M, Kitamura Y, Nomura S. **Localization of mRNA for c-kit receptor and its ligand in the brain of adult rats: an analysis using *in situ* hybridization histochemistry.** *Brain Res Mol Brain Res*; 15: 47-54. (1992)
96. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. **Cancer drug resistance: an evolving paradigm.** *Nat Rev Cancer*; 13: 714-726. (2013)
97. Hongyo T, Li T, Syaifundin M, Baskar R, Ikeda H, Kanakura Y, Aozasa K, Nomura T. **Specific c-kit mutations in sinonasal natural killer/T-cell lymphoma in China and Japan.** *Cancer Res*; 60: 2345-2347. (2000)
98. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. **LNCaP model of human prostatic carcinoma.** *Cancer Res*; 43: 1809-1818. (1983)

99. Hsing AW, Chokkalingam AP. **Prostate cancer epidemiology.** Front Biosci; 11: 1388-1413. (2006)
100. Hsu YR, Wu GM, Mendiaz EA, Syed R, Wypych J, Toso R, Mann MB, Boone TC, Narhi LO, Lu HS, Langley KE. **The majority of stem cell factor exists as monomer under physiological conditions. Implications for dimerization mediating biological activity.** J Biol Chem; 272: 6406-6415. (1997)
101. Huang EJ, Nocka KH, Buck J, Besmer P. **Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2.** Mol Biol Cell; 3: 349-362. (1992)
102. Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA, Bar-Eli M. **Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis.** EMBO J; 17: 4358-4369. (1998)
103. Hubbard SR. **Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases.** Nature Rev Mol Cell Biol; 5: 464-471. (2004)
104. Hubbard SR, Till JH. **Protein tyrosine kinase structure and function.** Annu Rev Biochem; 69: 373-398. (2000)
105. Huggins C, Scott WW, Heinen JH. **Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles.** Am J Physiol; 136: 467-473. (1942)
106. Huo L, Sugimura J, Tretiakova MS, Patton KT, Gupta R, Popov B, Laskin WB, Yeldandi A, Teh BT, Yang XJ. **C-kit expression in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas.** Hum Pathol; 36: 262-268. (2005)
107. Igney FH, Krammer PH. **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.** Nat Rev Cancer; 2: 277-288. (2002)
108. Igoucheva O, Alexeev V. **MicroRNA-dependent regulation of cKit in cutaneous melanoma.** Biochem Biophys Res Commun; 379: 790-794. (2009)
109. Ikeda H, Kanakura Y, Furitsu T, Kitayama H, Sugahara H, Nishiura T, Karasuno T, Tomiyama Y, Yamatodani A, Kanayama Y. **Changes in phenotype and proliferative potential of human acute myeloblastic leukemia cells in culture with stem cell factor.** Exp Hematol; 21: 1686-1694. (1993)

110. Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tarui S, Griffin JD. **Expression and functional role of the proto-oncogene c-Kit in acute myeloblastic leukemia cells.** *Blood*; 78: 2962-2968. (1991)
111. Imura M, Kojima Y, Kubota Y, Hamakawa T, Yasui T, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. **Regulation of cell proliferation through a KIT-mediated mechanism in benign prostatic hyperplasia.** *Prostate*; 72: 1506-1513. (2012)
112. Instituto Nacional del Cáncer. **Lo que usted necesita saber sobre™ el cáncer de próstata: La próstata.** <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/necesita-saber/prostata/page2> (Revisado 19/11/2013). (2007)
113. Instituto Nacional del Cáncer. **Terapias dirigidas contra el cáncer.** <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tratamiento/terapias-dirigidas> (Revisado 19/11/2013). (2012)
114. Instituto Nacional del Cáncer. **Cáncer de próstata: Tratamiento (PDQ®): Estadios del cáncer de próstata.** <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/prostata/Patient/page2> (Revisado 19/11/2013). (2013)
115. International Agency for Research on Cancer. **GLOBOCAN 2008 Section of Cancer Information.** <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> (Revisado 13/11/2013). (2008)
116. Jahn T, Sindhu S, Gooch S, Seipel P, Lavori P, Leifheit E, Weinberg K. **Direct interaction between Kit and the interleukin-7 receptor.** *Blood*; 110: 1840-1847. (2007)
117. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin*; 61: 69-90. (2011)
118. Jeon S, Kim NH, Kim JY, Lee AY. **Stem cell factor induces ERM proteins phosphorylation through PI3K activation to mediate melanocyte proliferation and migration.** *Pigment Cell Melanoma Res*; 22: 77-85. (2009)
119. Johns ME, Mills SE. **Cloning efficiency. A possible prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Cancer*; 52: 1401-1404. (1983)
120. Jiang X, Gurel O, Mendiaz EA, Stearns GW, Clogston CL, Lu HS, Osslund TD, Syed RS, Langley KE, Hendrickson WA. **Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit.** *EMBO J*; 19: 3192-3203. (2000)

121. Jones DS, Podolsky SH, Greene JA. **The burden of disease and the changing task of medicine.** N Engl J Med; 366: 2333-2338. (2012)
122. Joyce JA, Pollard JW. **Microenvironmental regulation of metastasis.** Nat Rev Cancer; 9: 239-252. (2009)
123. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. **Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).** Invest Urol; 17: 16-23. (1979)
124. Kanakura Y, Ikeda H, Kitayama H, Sugahara H, Furitsu T. **Expression, function and activation of the proto-oncogene c-kit product in human leukemia cells.** Leuk Lymphoma; 10: 35-41. (1993)
125. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. **VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche.** Nature; 438: 821-827. (2005)
126. Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. **Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond.** Cancer Metast Rev; 25: 521-529. (2006a)
127. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. **Preparing the 'soil': the premetastatic niche.** Cancer Res; 66: 11089-11093. (2006b)
128. Kapur R, Majumdar M, Xiao X, McAndrews-Hill M, Schindler K, Williams DA. **Signaling through the interaction of membrane-restricted stem cell factor and c-kit receptor tyrosine kinase: genetic evidence for a differential role in erythropoiesis.** Blood; 91: 879-889. (1998)
129. Keller JR, Ortiz M, Ruscetti FW. **Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division.** Blood; 86: 1757-1764. (1995)
130. Kent D, Copley M, Benz C, Dykstra B, Bowie M, Eaves C. **Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signalling pathway.** Clin Cancer Res; 14: 1926-1930. (2008)
131. Keshet E, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF. **Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development.** EMBO J; 10: 2425-2435. (1991)
132. Kiel MJ, Morrison SJ. **Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells.** Nat Rev Immunol; 8: 290-301. (2008)

133. Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Oritani K, Ikeda H, Sugahara H, Mitsui H, Kanayama Y, Kitamura Y, Matsuzawa Y. **Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-dependent hematopoietic cell lines.** *Blood*; 85: 790-798. (1995)
134. Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME, Herawi M, Chuang AY, Epstein JI, Berman DM. **Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis.** *Cancer Res*; 67: 9199-9206. (2007)
135. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A, Vánky F. **Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia.** *Int J Cancer*; 18: 421-431. (1976)
136. Klein S, McCormick F, Levitzki A. **Killing time for cancer cells.** *Nat Rev Cancer*; 5: 573-580. (2005)
137. Koelz M, Lense J, Wrba F, Scheffler M, Dienes HP, Odenthal M. **Down-regulation of miR-221 and miR-222 correlates with pronounced Kit expression in gastrointestinal stromal tumors.** *Int J Oncol*; 38: 503-511. (2011)
138. Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Wang Z, Sethi S, Sarkar FH. **Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells.** *PLoS One*; 5: e12445. (2010)
139. Korc M. **Growth factors and pancreatic cancer.** *Int J Pancreatol*; 9: 87-91. (1991)
140. Kozlowski M, Larose L, Lee F, Le DM, Rottapel R, Siminovitch KA. **SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain.** *Mol Cell Biol*; 18: 2089-2099. (1998)
141. Krammer PH, Galle PR, Moller P, Debatin KM. **CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis in normal and malignant liver, colon, and hematopoietic cells.** *Adv Cancer Res*; 75: 251-273. (1998)
142. Krasagakis K, Fragiadaki I, Metaxari M, Krüger-Krasagakis S, Tzanakakis GN, Stathopoulos EN, Eberle J, Tavernarakis N, Tosca AD. **KIT receptor activation by autocrine and paracrine stem cell factor stimulates growth of merkel cell carcinoma in vitro.** *J Cell Physiol*; 226: 1099-1109. (2011)
143. Krystal GW, DeBerry CS, Linnekin D, Litz J. **Lck associates with and is activated by Kit in small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1.** *Cancer Res*; 58: 4660-4666. (1998)

144. Krystal GW, Hines SJ, Organ CP. **Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor.** *Cancer Res*; 56: 370-376. (1996)
145. Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C. **Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues.** *J Histochem Cytochem*; 42: 1417-1425. (1994)
146. Langley KE, Bennett LG, Wypych J, Yancik SA, Liu XD, Westcott KR, Chang DG, Smith KA, Zsebo KM. (1993) **Soluble Stem Cell Factor in human serum.** *Blood*; 81: 656-660. (1993)
147. La Porta CA. **Thoughts about cancer stem cells in solid tumors.** *World J Stem Cells*; 4: 17-20. (2012)
148. LeaderLine Studios Inc. **The prostate centre: Gleason grades & Gleason Scores.** <http://leaderlinestudios.com/project/prostatecentre/> (Revisado 19/11/2013). (2013)
149. Leissner KH, Tisell LE. **The weight of the human prostate.** *Scand J Urol Nephrol*; 13:137-142. (1979)
150. Lemmon MA, Pinchasi D, Zhou M, Lax I, Schlessinger J. **Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor.** *J Biol Chem*; 272: 6311-6317. (1997)
151. Lemmon MA, Schlessinger J. **Cell signaling by receptor tyrosine kinases.** *Cell*; 141: 1117-1134. (2010)
152. Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Pontén E, Carlberg M, Rönstrand L. **Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction.** *Oncogene*; 18: 5546-5553. (1999)
153. Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. **Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit.** *Stem Cells*; 23: 16-43. (2005)
154. Lennartsson J, Rönstrand L. **Stem Cell Factor receptor/ c-Kit: from basic science to clinical implications.** *Physiol Rev*; 92: 1619-1649. (2012)
155. Lennartsson J, Rönstrand L. **The stem cell factor receptor/c-Kit as a drug target in cancer.** *Curr Cancer Drug Targets*; 6: 65-75. (2006)
156. Lennartsson J, Shivakrupa R, Linnekin D. **Synergistic growth of stem cell factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor involves kinase-dependent and -independent contributions from c-Kit.** *J Biol Chem*; 279: 44544-44553. (2004)

157. Leong KG, Wang BE, Johnson L, Gao WQ. **Generation of a prostate from a single adult stem cell.** *Nature*; 456: 804-808. (2008)
158. Lev S, Givol D, Yarden Y. **Interkinase domain of kit contains the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 678-682. (1992)
159. Li H, Chen X, Calhoun-Davis T, Claypool K, Tang DG. **PC3 human carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells.** *Cancer Res*; 68: 1820-1825. (2008)
160. Liu K, Li L, Nisson PE, Gruber C, Jessee J, Cohen SN. **Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with sam68 protein deficiency in cultured murine fibroblast.** *J Biol Chem*; 275: 40195-40201. (2000)
161. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, Duffy T, Jacobs P, Tang LH, Modlin I. **Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm.** *Nat Genet*; 12: 312-314. (1996)
162. Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG, Feliu AS. **A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin.** *Proc Soc Exp Biol Med*; 166: 546-550. (1981)
163. Lozzio CB, Lozzio BB. **Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.** *Blood*; 45: 321-334. (1975)
164. Lyman SD, Jacobsen SEW. **c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities.** *Blood*; 91: 1101-1134. (1998)
165. Ma Y, Liang D, Liu J, Axcrone K, Kvalheim G, Giercksky KE, Nesland JM, Suo Z. **Synergistic effect of SCF and G-CSF on stem-like properties in prostate cancer cell lines.** *Tumour Biol*; 33: 967-978. (2012)
166. Maharbiz MM. **Synthetic multicellularity.** *Trends Cell Biol*; 22: 617-623. (2012)
167. Makin G, Hickman JA. **Apoptosis and cancer chemotherapy.** *Cell Tissue Res*; 301: 143-152. (2000)
168. Malhotra V, Perry MC. **Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window.** *Cancer Biol Ther*; 2: S2-S4. (2003)

169. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ. **Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart.** *Dev Biol*; 265: 262-275. (2004)
170. Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA. **Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs.** *Cell*; 63: 203-211. (1990)
171. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. **Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?** *Nat Rev Cancer*; 12: 323-334. (2012)
172. Masson K, Heiss E, Band H, Rönnstrand L. **Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation.** *Biochem J*; 399: 59-67. (2006)
173. Mathers CD, Loncar D. **Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030.** *PLoS Med*; 3: e442. (2006)
174. Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BL. **Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit.** *Nature*; 347: 667-669. (1990)
175. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. **A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 9026-9030. (1991)
176. Mattox DE, Von Hoff DD. **In vitro stem cell assay in head and neck squamous carcinoma.** *Am J Surg*; 140: 527-530. (1980)
177. McNeilly F, Allan GM, Moffett DA, McNulty MS. **Detection of chicken anaemia agent in chickens by immunofluorescence and immunoperoxidase staining.** *Avian Pathol*; 20: 125-132. (1991)
178. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. **Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread.** *Am J Surg Pathol*; 12: 897-906. (1988)
179. McSherry EA, Donatello S, Hopkins AM, McDonnell S. **Molecular basis of invasion in breast cancer.** *Cell Mol Life Sci*; 64: 3201-3218. (2007)
180. Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. **Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations.** *Nature*; 452: 442-447. (2008)

181. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. **Mast cells**. *Physiol Rev*; 77: 1033-1079. (1997)
182. Mickey DD, Stone KR, Wunderli H, Mickey GH, Vollmer RT, Paulson DF. **Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice**. *Cancer Res*; 37: 4049-4058. (1977)
183. Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. **Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation**. *EMBO J*; 19: 5406-5417. (2000)
184. Miyazawa K, Toyama K, Gotoh A, Hendrie PC, Mantel C, Broxmeyer HE. **Ligand-dependent polyubiquitination of c-Kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells**. *Blood*; 83: 137-145. (1994)
185. Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN, Snell GP, Zou H, Sang BC, Wilson KP. **Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase**. *J Biol Chem*; 279: 31655-31663. (2004)
186. Mol CD, Lim KB, Sridhar V, Zou H, Chien EY, Sang BC, Nowakowski J, Kassel DB, Cronin CN, McRee DE. **Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation**. *J Biol Chem*; 278: 31461-31464. (2003)
187. Morgan TM, Lange PH, Vessella RL. **Detection and characterization of circulating and disseminated prostate cancer cells**. *Front Biosci*; 12: 3000-3009. (2007)
188. Mori S, Chang JT, Andrechek ER, Matsumura N, Baba T, Yao G, Kim JW, Gatz M, Murphy S, Nevins JR. **Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential**. *Oncogene*; 28: 2796-2805. (2009)
189. Moriyama Y, Tsujimura T, Hashimoto K, Morimoto M, Kitayama H, Matsuzawa, Kitamura Y, Kanakura Y. **Role of aspartic acid 814 in the function and expression of c-kit receptor tyrosine kinase**. *J Biol Chem*; 271: 3347-3350. (1996)
190. Morii E, Hirota S, Kim HM, Mikoshiba K, Nishimune Y, Kitamura Y, Nomura S. **Spatial expression of genes encoding c-kit receptors and their ligands in mouse cerebellum as revealed by *in situ* hybridization**. *Brain Res Dev Brain Res*; 65: 123-126. (1992)
191. Morrison SJ, Kimble J. **Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer**. *Nature*; 441: 1068-1074. (2006)

192. Mosesson Y, Yarden Y. **Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy.** *Semin Cancer Biol*; 14: 262-270. (2004)
193. Mous A, Linnekin D. **Lyn is activated during late G₁ of stem-cell-factor-induced cell cycle progression in haematopoietic cells.** *Biochem J*; 342: 163-170. (1999)
194. Muir CS, Waterhouse J, Mack T, Powell J, Whelan SL, eds. **Cancer incidence in five continents.** IARC Scientific Publications; Lyon, France. (1987)
195. Myers RP. **Structure from the adult prostate from a clinician's stand point.** *Clin Anat*; 13: 214-215. (2000)
196. Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. **Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels.** *J Urol*; 154: 407-413. (1995)
197. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD. **Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 10560-10564. (1995)
198. Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kobayashi I, Gomei Y, Matsumoto Y, Yoshihara H, Suda T. **Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells.** *Blood*; 116: 1422-1432. (2010)
199. National Cancer Institute. **Tumor grade test with prostate tissue.** Disponible en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/prostate/page4> (Revisado 16/11/2013). (2012)
200. Nervi B, Link DC, DiPersio JF. **Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization.** *J Cell Biochem*; 99: 690-705. (2006)
201. Nevins JR, Potti A. **Mining gene expression profiles: expression signatures as cancer phenotypes.** *Nat Rev Genet*; 8: 601-609. (2007)
202. Nishida K, Wang L, Morii E, Park SJ, Narimatsu M, Itoh S, Yamasaki S, Fujishima M, Ishihara K, Hibi M, Kitamura Y, Hirano T. **Requirement of Gab2 for mast cell development and KitL/c-Kit signaling.** *Blood*; 99: 1866-1869. (2002)
203. Nishio M, Oda A, Koizumi K, Satoh I, Sato Y, Endoh T, Tsutsumi A, Fujihara M, Ishihara K, Ikeda H, Koike T, Sawada KI. **Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency.** *Exp Hematol*; 29: 19-29. (2001)

204. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. **Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.** Nat Genet; 24: 372-376. (2000)
205. Nomura Y, Tashiro H, Hisamatsu K. **In vitro clonogenic growth and metastatic potential of human operable breast cancer.** Cancer Res; 49: 5288-5293. (1989)
206. O'Laughlin-Bunner B, Radosevic N, Taylor ML, Shivakrupa, DeBerry C, Metcalfe DD, Zhou M, Lowell C, Linnekin D. **Lyn is required for normal stem cell factor-induced proliferation and chemotaxis of primary hematopoietic cells.** Blood; 98: 343-350. (2001)
207. Ogawa K, Tashima M, Toi T, Sawai H, Sawada H, Fujita J, Maruyama Y, Okuma M. **Inhibition of erythroid differentiation by Stem Cell Factor in K562 cells expressing the c-Kit gene.** Exp Hematol; 22: 45-51. (1994)
208. Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, Kina T, Nakauchi H, Nishikawa S. **Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells.** J Exp Med; 174: 63-71. (1991)
209. Oh WK, Kantoff PW. **Management of hormone refractory prostate cancer: current standards and future prospects.** J Urol; 160: 1220-1229. (1998)
210. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. **Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule.** Blood; 78: 1706-1712. (1991)
211. Organización Panamericana de la Salud. **Salud en las Américas 2007.** Disponible en: <http://www.paho.org/spanish/dd/ais/coredata.htm> (Revisado 13/11/2013). (2007)
212. Orr-Urtreger A, Avivi A, Zimmer Y, Givol D, Yarden Y, Lonai P. **Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus.** Development; 109: 911-923. (1990)
213. Paget S. **The distribution of secondary growths in cancer of the breast.** Lancet; 133: 571-573. (1889)
214. Park GH, Plummer HK 3rd, Krystal GW. **Selective Sp 1 binding is critical for maximal activity of the human c-kit promoter.** Blood; 4138-4149. (1998)
215. Paronetto MP, Farini D, Sammarco I, Maturo G, Vespasiani G, Geremia R, Rossi P, Sette C. **Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer.** Am J Pathol; 164: 1243-1251. (2004)

216. Paronetto MP, Venables JP, Elliot DJ, Geremia R, Rossi P, Sette C. **Tr-kit promotes the formation of a multimolecular complex composed by Fyn, PLCgamma I and Sam68.** *Oncogene*; 22: 8707-8715. (2003)
217. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L, Tang DG. **Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells.** *Oncogene*; 25: 1696-1708. (2006)
218. Pascal LE, Oudes AJ, Petersen TW, Goo YA, Walashek LS, True LD, Liu AY. **Molecular and cellular characterization of ABCG2 in the prostate.** *BMC Urol*; 7: 6. (2007)
219. Pauls K, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Buttner R, Zhou H. **c-KIT codon 816 mutation in a recurrent and metastatic dysgerminoma of a 14-year-old girl: case study.** *Virchows Arch*; 445: 651-654. (2004)
220. Paulson RF, Vesely S, Siminovitch KA, Bernstein A. **Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp 1.** *Nat Genet*; 13: 309-315. (1996)
221. Pedersen EA, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. **The prostate cancer bone marrow niche: more than just 'fertile soil'.** *Asian J Androl*; 14: 423-427. (2012)
222. Pedersen M, Löfstedt T, Sun J, Holmquist-Mengelbier L, Pålman S, Rönstrand L. **Stem cell factor induces HIF-1alpha at normoxia in hematopoietic cells.** *Biochem Biophys Res Commun*; 377: 98-103. (2008)
223. Pietsch T, Kvas U, Steffens U, Yakisan E, Hadam MR, Ludwig WD, Zsebo K, Welte K. **Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors.** *Blood*; 80: 1199-1206. (1992)
224. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. **Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy.** *JAMA*; 281: 1591-1597. (1999)
225. Price JE. **Clonogenicity and experimental metastatic potential of spontaneous mouse mammary neoplasms.** *J Natl Cancer Inst*; 77: 529-535. (1986)
226. Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, Rao JS. **RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator**

- receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo.** *J Biol Chem*; 280: 36529-36540. (2005)
227. Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P. **Primary structure of c-kit: relationship with CSF-1/PDGF receptor kinase family-oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus.** *EMBO J*; 7: 1003-1011. (1988)
228. Ratajczak MZ, Perrotti D, Melotti P, Powzaniuk M, Calabretta B, Onodera K, Kregenow DA, Machalinski B, Gewirtz AM. **Myb and ets proteins are candidate regulators of c-kit expression in human hematopoietic cells.** *Blood*; 91: 1934-1946. (1998)
229. Ray P, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Ray A. **Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity.** *Ann NY Acad Sci*; 1183: 104-122. (2010)
230. Raychaudhuri B, Cahill D. **Pelvic fasciae in urology.** *Ann R Coll Surg Engl*; 90: 633-637. (2008)
231. Roberts WB, Han M. **Clinical significance and treatment of biochemical recurrence after definitive therapy for localized prostate cancer.** *Surg Oncol*; 18: 268-274. (2009)
232. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. **The protein tyrosine kinase family of the human gene.** *Oncogene*; 19: 5548-5557. (2000)
233. Ropers HH, Craig IW. **Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 12 and 13.** *Cytogenet Cell Genet*; 51: 259-279. (1989)
234. Rossi P, Marziali G, Albanesi C, Charlesworth A, Geremia R, Sorrentino V. **A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids.** *Dev Biol*; 152: 203-207. (1992)
235. Roskoski RJr. **Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor.** *Biochem Biophys Res Commun*; 337: 1-13. (2005)
236. Roussos ET, Balsamo M, Alford SK, Wyckoff JB, Gligorijevic B, Wang Y, Pozzuto M, Stobezki R, Goswami S, Segall JE, Lauffenburger DA, Bresnick AR, Gertler FB, Condeelis JS. **Mena invasive (MenaINV) promotes multicellular streaming motility and transendothelial migration in a mouse model of breast cancer.** *J Cell Sci*; 124: 2120-2131. (2011a)
237. Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A. **Chemotaxis in cancer.** *Nat Rev Cancer*; 11: 573-587. (2011b)
238. Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Satoh M, Hironaka M, Saito K. **c-kit gene mutations in intracranial germinomas.** *Cancer Sci*; 95: 716-720. (2004)

- 239.Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. **Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.** Science; 307: 1098-1101. (2005)
- 240.Savarese DM, Valinski H, Quesenberry P, Savarese T. **Expression and function of colony-stimulating factors and their receptors in human prostate carcinoma cell lines.** Prostate; 34: 80-91. (1998)
- 241.Sawyers CL. **Making progress through molecular attacks on cancer.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol; 70: 479-482. (2005)
- 242.Schmidt U, van den Akker E, Parren-van Amelsvoort M, Litos G, de Bruijn M, Gutierrez L, Hendriks RW, Ellmeier W, Löwenberg B, Beug H, von Lindern M. **Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors.** J Exp Med; 199: 785-795. (2004)
- 243.Scholzen T, Gerdes J. **The Ki-67 protein: from the known and the unknown.** J Cell Physiol; 182: 311-322. (2000)
- 244.Sekido Y, Obata Y, Ueda R, Hida T, Suyama M, Shimokata K, Aroyoshi Y, Takahashi T. **Preferential expression of c-kit protooncogene transcripts in small cell lung cancer.** Cancer Res; 51: 2416-2419. (1991)
- 245.Semenas J, Allegrucci C, Boorjian SA, Mongan NP, Persson JL. **Overcoming drug resistance and treating advanced prostate cancer.** Curr Drug Targets; 13: 1308-1323. (2012)
- 246.Serve H, Hsu Y, Besmer P. **Tyrosine residue 719 of the c-kit receptor is essential for binding of the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for c-kit associated PI 3-kinase activity in cos-1 cells.** J Biol Chem; 269: 6026-6030. (1994)
- 247.Sette C, Paronetto MP, Barchi M, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P. **Tr-kit-induced resumption of the cell cycle in mouse eggs requires activation of a Src-like kinase.** EMBO J; 21: 5386-5395. (2002)
- 248.Shafik A, Shafik I, el-Sibai O. **Identification of c-kit-positive cells in the human prostate: the interstitial cells of Cajal.** Arch Androl; 51: 345-351. (2005)
- 249.Sherwood L. **Human physiology: from cells to systems.** 7th edition. California, USA. (2007)

250. Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Sakagami M, Tereda N, Tsujimura T. **Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1.** *Am J Pathol*; 163: 3-9. (2003)
251. Shimizu Y, Ashman LK, Du Z, Schwartz LB. **Internalization of Kit together with stem cell factor on human fetal liver-derived mast cells: new protein and RNA synthesis are required for reappearance of Kit.** *J Immunol*; 156: 3443-3449. (1996)
252. Shiozawa Y, Havens AM, Jung Y, Ziegler AM, Pedersen EA, Wang J, Wang J, Lu G, Roodman GD, Loberg RD, Pienta KJ, Taichman RS. **Annexin II/annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer.** *J Cell Biochem*; 105: 370-380. (2008a)
253. Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, Taichman RS. **The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites.** *Leukemia*; 22: 941-950. (2008b)
254. Simak R, Capodieci P, Cohen DW, Fair WR, Scher H, Melamed J, Drobnjak M, Heston WD, Stix U, Steiner G, Cordon-Cardo C. **Expression of c-Kit and Kit-ligand in benign and malignant prostatic tissues.** *Histol Histopathol*; 15: 365-374. (2000)
255. Slack JK, Adams RB, Rovin JD, Bissonette EA, Stoker CE, Parsons JT. **Alteration in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells.** *Oncogene*; 20: 4212-4220. (2001)
256. So-Rosillo R, Small EJ. **Sipuleucel-T (APC8015) for prostate cancer.** *Expert Rev Anticancer Ther*; 6: 1163-1167. (2006)
257. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. **Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145).** *Int J Cancer*; 21: 274-281. (1978)
258. Sui X, Krantz SB, You M, Zhao Z. **Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis.** *Blood*; 92: 1142-1149. (1998)
259. Sun J, Pedersen M, Bengtsson S, Rönstrand L. **Grb2 mediates negative regulation of stem cell factor receptor/c-Kit signaling by recruitment of Cbl.** *Exp Cell Res*; 313: 3935-3942. (2007)
260. Sundström M, Alfredsson J, Olsson N, Nilsson G. **Stem cell factor-induced migration of mast cells requires p38 mitogen-activated protein kinase activity.** *Exp Cell Res*; 267: 144-151. (2001)

261. Suphanantachat S, Iwata T, Ishihara J, Yamato M, Okano T, Izumi Y. **A role for c-Kit in the maintenance of undifferentiated human mesenchymal stromal cells.** *Biomaterials*; 35: 3618-3626. (2014)
262. Sutherland CM, Mather FJ, Carter RD, Cerise EJ, Krementz ET. **Breast cancer as analyzed by the human tumor stem cell assay.** *Surgery*; 94: 370-375. (1983)
263. Taichman RS. **Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche.** *Blood*; 105: 2631-2639. (2005)
264. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. **Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone.** *Cancer Res*; 62: 1832-1837. (2002)
265. Takaoka A, Toyota M, Hinoda H, Itoh F, Mita H, Kakiuchi H, Adachi M, Imai K. **Expression and identification of aberrant c-kit transcripts in human cancer cells.** *Cancer Lett*; 115: 257-261. (1997)
266. Talmadge JE, Fidler IJ. **AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective.** *Cancer Res*; 70: 5649-5669. (2010)
267. Theou-Anton N, Tabone S, Brouty-Boye D, Saffroy R, Rönnstrand L, Lemoine A, Emile JF. **Coexpression of SCF and KIT in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) suggests an autocrine/paracrine mechanism.** *Br J Cancer*; 94: 1180-1185. (2006)
268. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. **Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter.** *N Engl J Med*; 27: 2239-2246. (2004)
269. Tian Q, Frierson HF Jr, Krystal GW, Moskaluk CA. **Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors.** *Am J Pathol*; 154: 1643-1647. (1999)
270. Timokhina I, Kissel H, Stella G, Besmer P. **Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac 1 and JNK activation in mast cell proliferation.** *EMBO J*; 17: 6250-6262 (1998)
271. Toffalini F, Demoulin JB. **New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases.** *Blood*; 116: 2429-2437. (2010)

272. Tohda S, Yang GS, Ashman LK, McCulloch EA, Minden MD. **Relationship between c-Kit expression and proliferation in acute myeloblastic leukemia cell lines.** *J Cell Physiol*; 154: 410-408. (1993)
273. Toyota M, Hinoda Y, Itoh F, Takaoka A, Imai K, Yachi A. **Complementary DNA cloning of truncated form of c-kit in human colon carcinoma cells.** *Cancer Res*; 54: 272-275. (1994)
274. Ulivi P, Zoli W, Medri L, Amadori D, Saragoni L, Barbanti F, Calistri D, Silvestrini R. **c-Kit and SCF expression in normal and tumor breast tissue.** *Breast Cancer Res Treat*; 83: 33-42. (2004)
275. Van der Aa F, Roskams T, Blyweert W, De Ridder D. **Interstitial cells in the human prostate: a new therapeutic target?** *Prostate*; 56: 250-255. (2003)
276. Verstraete K, Savvides SN. **Extracellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases.** *Nat Rev Cancer*; 12: 753-766. (2012)
277. Visvader JE, Lindeman GJ. **Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions.** *Nat Rev Cancer*; 8: 755-768. (2008)
278. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. **Cancer to bone: a fatal attraction.** *Nat Rev Cancer*; 11: 411-425. (2011)
279. Weinberg RA. **The biology of cancer.** Garland Science; New York, USA. (2007)
280. Wiesner C, Nabha SM, Dos Santos EB, Yamamoto H, Meng H, Melchior SW, Bittinger F, Thüroff JW, Vessella RL, Cher ML, Bonfil RD. **c-Kit and its ligand Stem Cell Factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis.** *Neoplasia*; 10: 996-1003. (2008)
281. Williams DE, de Vries P, Namen AE, Widmer MB, Lyman SD. **The Steel factor.** *Dev Biol*; 151: 368-376. (1992)
282. Workman P. **New cancer drugs on the horizon.** *Future Oncol*; 1: 315-318. (2005)
283. Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish HF. **Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors.** *Nature*; 377: 242-246. (1995)
284. Wypych J, Bennett LG, Schwartz MG, Clogston CL, Lu HS, Broudy VC, Bartley TD, Parker VP, Langley KE. **Soluble kit receptor in human serum.** *Blood*; 85: 66-73. (1995)
285. Yamamoto K, Tojo A, Aoki N, Shibuya M. **Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene.** *Jpn J Cancer Res*; 84: 1136-1144. (1993)

286. Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U, Fried VA, Ullrich A, Williams LT. **Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors.** *Nature*; 323: 226-232. (1986)
287. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. **Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand.** *EMBO J*; 6: 3341-3351. (1987)
288. Yasuda A, Sawai H, Takahashi H, Ochi N, Matsuo Y, Funahashi H, Sato M, Okada Y, Takeyama H, Manabe T. **The stem cell factor/*c-kit* receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells.** *Mol Cancer*; 5: 46. (2006)
289. Yasuda H, Galli SJ, Geissler EN. **Cloning and functional analysis of the mouse *c-kit* promoter.** *Biochem Biophys Res Commun*; 191: 893-901. (1993)
290. Ye L, Kynaston HG, Jiang WG. **Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms (review).** *Int J Mol Med*; 20: 103-111. (2007)
291. Yee NS, Hsiao CW, Serve H, Vosseller K, Besmer P. **Mechanism of down-regulation of *c-kit* receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C.** *J Biol Chem*; 269: 31991-31998. (1994)
292. Yin T, Li L. **The stem cell niches in bone.** *J Clin Invest*; 116: 1195-1201. (2006)
293. Yu M, Luo J, Yang W, Wang Y, Mizuki M, Kanakura Y, Besmer P, Neel BG, Gu H. **The scaffolding adapter *Gab2*, via *Shp-2*, regulates *kit*-evoked mast cell proliferation by activating the *Rac/JNK* pathway.** *J Biol Chem*; 281: 28615-28626. (2006)
294. Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J. **Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase *KIT* by stem cell factor.** *Cell*; 130: 323-334. (2007)
295. Zeng S, Xu Z, Lipkowitz S, Longley JB. **Regulation of stem cell factor receptor signalling by *Cbl* family proteins (*Cbl-b/c-Cbl*).** *Blood*; 105: 226-232. (2004)
296. Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. **Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 7732-7737. (2000)

297. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. **The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype.** Nat Med; 7: 1028-1034. (2001)
298. Zhu WM, Dong WF, Minden M. **Alternate splicing creates two forms of the human kit protein.** Leuk Lymphoma; 12: 441-447. (1994)