



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de Stem Cell Factor y c-kit en la capacidad invasiva y la resistencia a Cisplatino en una línea celular de cáncer de próstata.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Daniela Tenorio Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Lourdes Massieu Trigo

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

[Facultad de Química](#)

Ciudad de México, Marzo

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Tenorio Hernández Daniela
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 11 de noviembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Efecto de Stem Cell Factor y c-kit en la capacidad invasiva y la resistencia a Cisplatino en una línea celular de cáncer de próstata**", dirigida por el/la Dr(a). **Rocha Zavaleta Leticia**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

| | |
|------------|---------------------------------|
| PRESIDENTE | Cerbón Cervantes Marco Antonio |
| VOCAL | Rodríguez Dorantes Mauricio |
| VOCAL | Chávez González María Antonieta |
| VOCAL | Ibarra Rubio María Elena |
| SECRETARIO | Lizano Soberón Marcela |

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de noviembre de 2019.



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
COORDINADORA

Agradecimientos técnicos.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta en el laboratorio C-212 perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El presente proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave IN204419) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Agradezco a la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarias por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco a mi comité tutorial la Dra. Lourdes Massieu Trigo y el Dr. Ignacio Camacho Arroyo por la asesoría y apoyo a este proyecto.

Agradecimientos Personales

A mi pequeña familia, que siempre me ha dado su amor y apoyo incondicional. Por ser las principales promotoras de mis sueños, gracias por confiar en mí y en mis expectativas, gracias por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida.

A mi Tutora la Dra. Leticia Rocha, gracias por su guía y consejo tanto en lo profesional como en lo personal. A mis compañeros de lab por hacer siempre un ambiente ameno y cooperativo de trabajo.

A mis amigos de facultad, ahora que compartimos esta experiencia llamada maestría, por ser y continuar siendo un gran apoyo y motivación entre nosotros.

A mis amigos de mi antiguo laboratorio donde descubrí mi gusto por la ciencia, por nunca dejar que tirara la toalla y por seguir siendo malas influencias.

A mi querido Fer, por amarme y estar a mi lado hasta en las situaciones más tormentosas, tú también has sido parte de este proceso que no ha sido sencillo, ya que sin ti seguramente no culminaría esta etapa con éxito.

A todas esas personas que conocí en este tiempo, que me hicieron aprender y ampliar mi perspectivas de la vida para bien y para mal, por todo ese aprendizaje que dejaron y por enseñarme a no perder mi esencia y nunca olvidar quien soy, gracias.

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 1 |
| Resumen..... | 1 |
| Antecedentes | 2 |
| Cáncer de próstata..... | 2 |
| Metástasis y resistencia a quimiofármacos..... | 6 |
| c-kit y Stem Cell Factor (SCF) | 9 |
| Vías de señalización activadas por c-kit y SCF | 14 |
| Vía JAK / STAT | 15 |
| Vía de Ras/MAP cinasas | 16 |
| Vía PI3K/Akt | 16 |
| Vía de la SRC | 16 |
| Vía PLC γ | 17 |
| c-kit en la regulación de la progresión del cáncer | 17 |
| c-kit en CaP | 19 |
| Inhibidores de RTK's | 20 |
| Justificación | 23 |
| Hipótesis..... | 24 |
| Objetivos | 24 |
| Objetivo general | 24 |
| Materiales y métodos | 25 |
| Líneas celulares y cultivo..... | 25 |
| Cultivo celular en 3D | 25 |
| Efecto de SCF en la formación de esferoides. | 26 |
| Extracción y cuantificación de proteínas..... | 26 |
| Análisis de expresión y activación de distintas proteínas por <i>western-blot</i> | 26 |
| Modelo de invasividad de cámara de Boyden..... | 27 |
| Determinación de la DL ₅₀ de Cisplatino..... | 28 |
| Efecto de SCF sobre la citotoxicidad de cisplatino..... | 28 |
| Efecto del Imatinib y SCF sobre la citotoxicidad del Cisplatino | 29 |

| | |
|--|----|
| Ensayo de viabilidad celular por MTT | 29 |
| Análisis estadístico | 29 |
| Resultados | 30 |
| Expresión de c-kit..... | 30 |
| Efecto de SCF en cultivo 3D. | 30 |
| Efecto de SCF en la capacidad invasiva de las células in vitro. | 32 |
| Determinación de la dosis letal 50 de Cisplatino..... | 33 |
| Efecto del SCF y cisplatino | 34 |
| Inhibición de c-kit con Imatinib. | 35 |
| Estudio de la activación de c-kit y señalización | 36 |
| Discusión | 38 |
| Conclusiones..... | 47 |
| Perspectivas..... | 47 |
| Referencias..... | 48 |

Listado de abreviaturas

| | |
|----------------------------------|--|
| 5-FU | 5-Flurouracilo |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico. |
| Akt/PKB | Proteína cinasa B. |
| BAD | Proteína miembro de la familia pro-apoptótica de Bcl-2. |
| Bcl-2 | Proteína responsable del linfoma folicular humano de células B. |
| BH3 | Dominio homólogo de la familia Bcl-2. |
| CaP | Cáncer de próstata |
| CaPRC | Cáncer de próstata resistente a castración |
| CDDP | Cisplatino |
| Cdk | Cinasa dependiente de ciclina. |
| EGF-R | Receptor de factor de crecimiento epidermal. |
| ETR | Ecografía Trans-rectal |
| FGF-R | Receptor de factor de crecimiento a fibroblastos |
| FKHR | Forkhead box protein O1A. |
| FOXO | Familia de proteínas “Caja de la cabeza de tenedor” (Forhead box other). |
| GSK-3β | Cinasa 3 beta de la glucógeno sintasa. |
| HBP | Hiperplasia prostática benigna |
| HIF | Factor inducible por hipoxia. |
| IKK | Cinasa de I κ B. |
| MAPKs | Proteínas cinasas activadas por mitógeno. |
| MEC | Matriz Extracelular |
| mTOR | Proteína blanco de Rapamicina en mamíferos. |
| mTORC1 | Complejo 1 de la proteína blanco de Rapamicina en mamíferos. |
| mTORC2 | Complejo 2 de la proteína blanco de Rapamicina en mamíferos. |
| NF-κB | Factor nuclear kappa B. |
| p-Akt | Akt foforilada en Ser 473. |
| PBS | Amortiguador salino de fosfatos. |
| p-GSK-3β | Fosfatidilinositol 3-cinasa. |

| | |
|--------------------------------|---|
| PI3K | Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. |
| PIP2 | Fosfatidil 3, 4, 5-trifosfato. |
| PIP3 | Cinasa 3 beta de la glucógeno sintasa fosforilada en Ser 9. |
| PKA | Proteína cinasa A. |
| PSA | Antígeno próstatico específico |
| RTKs | Receptores con actividad de cinasa de tirosina |
| SCF | “Stem Cell Factor” |
| Ser | Serina |
| TA | Temperatura ambiente |
| TCF/LEF | Factor de transcripción específico de células T/ factor de unión-incremento linfoide. |
| Thr | Treonina. |
| TKI | Inhibidor de RTKs |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral alfa. |

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es una patología importante en la salud pública y tiene alto impacto a nivel mundial. Este tipo de cáncer tiene alta tasa de mortalidad principalmente por la formación de metástasis y la resistencia a quimiofármacos, sin embargo los mecanismos moléculares por los cuales se dan dichos procesos han sido poco caracterizados.

Uno de los principales sitios de metastasis del CaP es el hueso, en este sitio se expresa el receptor c-kit y su ligando el Stem Cell Factor (SCF), los cuales promueven la supervivencia, proliferación y migración de las células. Dichas moléculas cobran relevancia ya que se ha observado su presencia en distintos tipos tumorales y se ha demostrado su participación en la formación, crecimiento, invasión a otros tejidos y resistencia a quimiofármacos como el Cisplatino. En el CaP hay evidencia de niveles elevados del receptor y su ligando en etapas avanzadas, aunque su participación en la progresión del cáncer sigue siendo controversial. En nuestro laboratorio, previamente se observó que SCF/c-kit se expresan en las líneas células de metástasis de cáncer de próstata PC3 (metástasis osea) y DU145 (metástasis cerebral), promueven la proliferación y tiene un efecto protector contra la muerte inducida por la falta de nutrientes.

En este trabajo, el objetivo principal fue profundizar en las observaciones ya realizadas del SCF/c-kit en células DU145, para esto se corroboró la expresión de c-kit por Western-blot, se evaluó la capacidad proliferativa y de formación de colonias a través de cultivos en 3D; la capacidad invasiva se determinó mediante un modelo *in vitro* de cámara de Boyden recubierta con Matriz extracelular, usando al SCF como quimioatrayente. También se evaluó el efecto del SCF ante la administración de Cisplatino, posteriormente se usó Imatinib (inhibidor del receptor c-kit) en conjunto con el Cisplatino. Por último para elucidar un posible mecanismo de señalización se realizó la estimulación de las células con SCF a distintos tiempos y por medio de Western-blot se observó los niveles de expresión de moléculas clave de las vías activadas después de la unión de SCF/c-kit.

Como resultados obtuvimos el aumento de la formación de colonias al ser estimuladas con SCF y no se observó un efecto significativo en la capacidad invasiva. También se demostró que el SCF tiene un efecto protector ante la citotoxicidad por cisplatino, mientras que la administración conjunta de Cisplatino con Imatinib no tiene un efecto sinérgico. Por último, se observó que la SCF/c-kit induce la activación de la vía que promueve la sobrevivencia, proliferación y resistencia a Cisplatino.

Los resultados obtenidos sugieren que SCF/c-kit probablemente no tienen participación en la capacidad invasiva y por consiguiente en la formación de metástasis pero si tiene efecto en la resistencia a Cisplatino.

Antecedentes

Cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CaP) es un tumor maligno en la glándula prostática, en sus etapas iniciales no presenta síntomas específicos. Es la segunda neoplasia maligna más común y la cuarta causa de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial. Más del 65% de todos los casos de CaP se diagnostican en hombres mayores de 65 años. La incidencia difiere entre países debido a la cobertura de la detección del antígeno prostático específico (PSA). Con y sin la prueba de PSA el cáncer de próstata es la causa de 1-2% de las muertes de los hombres (Cancer Research UK, 2011; GLOBOCAN 2018, Figura 1).

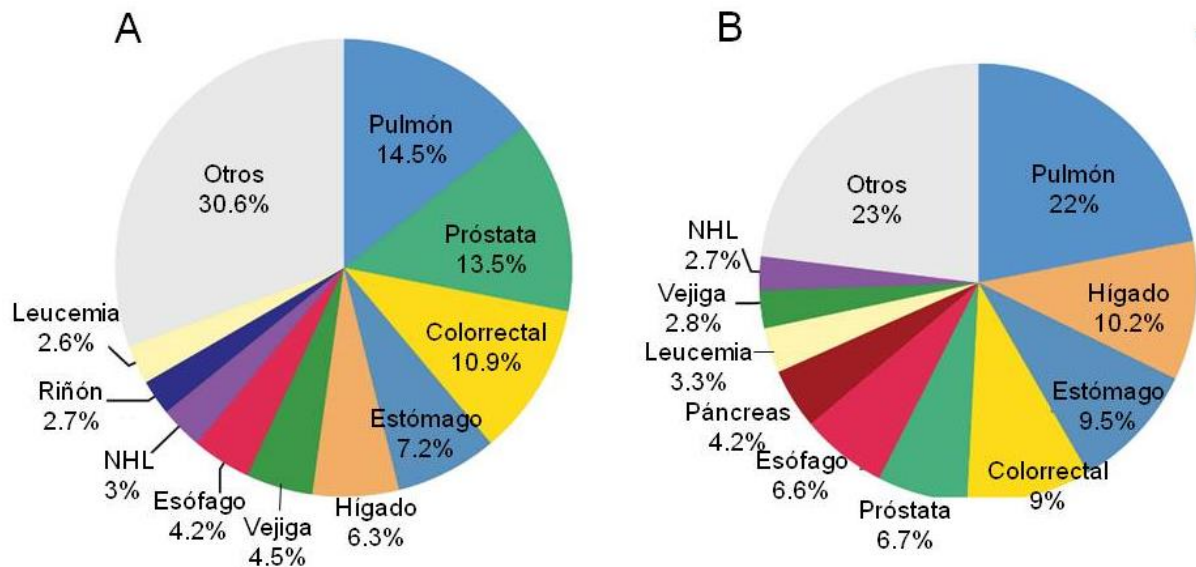


Figura 1. A) Estadística de incidencia de los 10 principales tipos de cáncer en hombres a nivel mundial. B) Gráfica de mortalidad de cáncer en varones en el mundo, el cáncer de próstata ocupa el segundo lugar en incidencia a nivel mundial mientras que el quinto en mortalidad. (NHL "Non-Hodgking lymphoma)(GLOBOCAN 2018).

En México, el CaP es la segunda causa de muerte por cáncer de órganos genitales masculinos, se le atribuye entre el 12.0 y 12.5 % de muertes en el periodo 2011-2016. El CaP, como parte del cáncer de órganos genitales en hombres, es una de las neoplasias malignas más comunes en varones de edad avanzada y es raramente diagnosticada en hombres con menos de 40 años (INEGI, 2018).

Aunque, se desconocen mucho de los factores de riesgo de CaP, se han identificado algunos, tales como aumento de la edad, origen étnico y hereditario. De hecho, este último duplica el riesgo de desarrollar CaP, si dos o más familiares de primer grado se encuentran afectados, el riesgo aumenta entre 5 y 11 veces (Steinberg *et al.* 1990; Gronberg *et al.*, 1996). Una pequeña subpoblación de pacientes con CaP (aproximadamente el 9 %) presenta un auténtico CaP hereditario. Éste se define cuando tres o más familiares afectados o al menos dos familiares con enfermedad de comienzo precoz, es decir, antes de los 55 años (Carter *et al.*, 1992). Los pacientes con CaP hereditario suelen tener un comienzo 6-7 años antes que los casos espontáneos, pero no difieren en otros sentidos (Bratt, 2002; Quinn y Babb, 2002).

Los principales instrumentos de diagnóstico para obtener indicios de CaP son el tacto rectal (TR), la concentración sérica de PSA y la ecografía transrectal (ETR). El diagnóstico definitivo se basa en la presencia de adenocarcinoma en muestras de biopsia de próstata o piezas quirúrgicas. El examen histopatológico también permite la gradación y determinación de la extensión del tumor. La determinación de la concentración de PSA ha revolucionado el diagnóstico del CaP (Thompson *et al.*, 2004). El PSA es una proteasa de residuos de serina afín a la calicreína que producen casi exclusivamente las células epiteliales de la próstata. A efectos prácticos, tiene especificidad de órgano, pero no es un indicador de cáncer. Por tanto, las concentraciones séricas pueden aumentar en presencia de hipertrofia benigna de próstata (HBP), prostatitis y otras enfermedades no malignas. El valor de PSA como variable independiente es un mejor factor predictivo de cáncer que los hallazgos sospechosos en el TR o la ETR (Catalona *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 2004).

Para la clasificación del grado de avance del CaP, el Comité Mixto Americano sobre el Cáncer (AJCC por sus siglas en inglés, *American Joint Committee on Cancer*) y la Unión Internacional Contra el Cáncer adoptaron un sistema basado en el tamaño de tumor (T), diseminación a los nódulos linfáticos (N) y formación de metástasis (M), TMN. La clasificación T, tiene subcategorías que se incluyen a la prueba de PSA para complementar el diagnóstico y el pronóstico del paciente con CaP. En 2010, el AJCC ha actualizado la clasificación TNM para el cáncer de próstata.

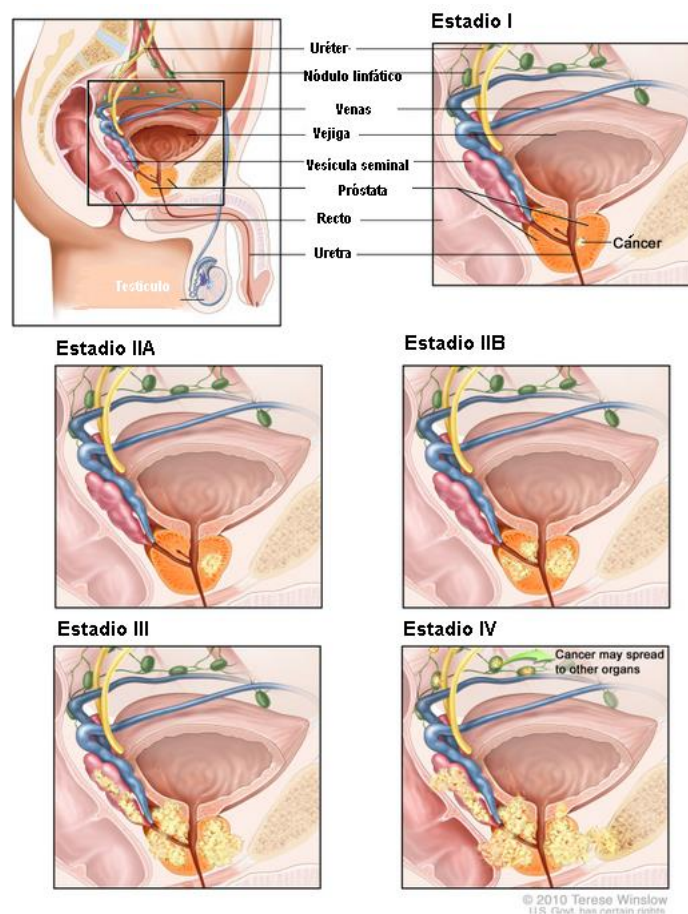


Figura 2. Esquema de los estadios de avance del CaP. Se observa como a medida que la etapa avanza, las células tumorales abandonan su sitio de origen para invadir tejidos adyacentes y finalmente el cáncer se establece en órganos lejanos a la próstata (*Modificado de Edge et al., 2010*).

En los estadios I, II y III el cáncer está presente pero no se ha extendido a otros órganos, el tamaño del tumor correlaciona directamente con el valor numérico del estadio y valores altos indican que es posible que se haya extendido a tejidos cercanos. En el estadio IV el cáncer se ha diseminado

a partes distantes del cuerpo, es decir, ya hay formación de metástasis (Edge *et al.*, 2010) (Figura 2).

En la tabla 1, se describe de manera breve el tratamiento del CaP dependiendo de su estadio.

Tabla 1. Esquema terapéutico para CaP.

| Estadio TMN | Opciones de tratamiento |
|-----------------------|--|
| Estadio I | Observación o vigilancia activa |
| | Prostectomía radical |
| | Radioterapia de haz externo (ERBT) |
| | Implantación intersticial de radioisótopos |
| Estadio II | Prostectomía radical |
| | ERBT con o sin hormonaterapia |
| | Implantación intersticial de radioisótopos |
| Estadio III | Homonaterapia: Orquiectomía o agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) |
| | ERBT con o sin hormonaterapia |
| | Observación o vigilancia activa |
| Estadio IV | Homonaterapia |
| | Biofosfonatos |
| | ERBT con o sin hormonaterapia |
| | Radioterapia paliativa |
| | Cirugía paliativa con la resección transuretral de la próstata |
| | Observación o vigilancia activa |
| CaP recurrente | Homonaterapia |
| | Quimioterapia para CaP resistente a hormonaterapia |
| | Inmunoterapia |
| | Radiofármacos/ emisión de radiación alfa |

El tratamiento está basado en una serie de estadios clínicos. Estos estadios comienzan con la enfermedad localizada, seguida del aumento en los niveles de PSA y un estado metastásico. Finalmente los estadios resistentes a la castración (CaPRC) son los más letales.

Las principales opciones para su tratamiento en etapas tempranas son la radioterapia localizada (ERBT), prostectomía radical, posteriormente se da una terapia anti-androgénica. La hormonaterapia está indicada en el CaP avanzado con fines paliativos. El objetivo es bloquear la síntesis de andrógenos a nivel testicular mediante la castración quirúrgica (orquiectomía) o farmacológica con análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (LHRH). No existen

diferencias en la efectividad de ambos métodos, ni entre los 4 análogos de la LHRH comercializados (goserelina, triptorelina, buserelina y leuprorelina).

Sin embargo en etapas avanzadas es frecuente que haya resistencia a la terapia hormonal por lo tanto se opta por la quimioterapia. Los quimiofármacos por elección son cisplatino (o carboplatino), Docetaxol, 5-Fluorouracilo, Mitomicina C y Mitoxantrona con una respuesta limitada que oscila entre el 10-20% (Heidenreich, *et al.*, 2010).

Metástasis y resistencia a quimiofármacos.

Mientras que la cirugía y la terapia adyuvante pueden curar y confinar los tumores primarios del cáncer de próstata, la enfermedad metastásica es, en gran medida, incurable debido a su naturaleza sistémica y a la *resistencia* a las terapias existentes de las células del tumor diseminado. Esto explica por qué más del 90% de la mortalidad por cáncer se atribuye a la metástasis y no a los tumores primarios de donde surgen estas lesiones malignas (Gupta y Massagué, 2006; Steeg, 2006). En el caso de CaP, con frecuencia se disemina a los ganglios linfáticos y después al hueso (90%), aunque también puede darse a pulmón (46%), hígado (25%) y cerebro (2%) (Bubendorf *et al.*, 2000).

La metástasis representa el producto final de un proceso celular complejo, implica la difusión de células de cáncer desde su sitio de origen hacia órganos anatómicamente distantes y su posterior adaptación al microambientes del tejido extraño (Scott y Weinberg, 2011).

Los pasos de la cascada de invasión se muestran en la figura 3 y se describen a continuación:

1) Invasión local a través de la matriz extracelular (MEC) y la capa de células estromales. Algunas células se desprenden del tumor primario e invaden el tejido sano adyacente. Durante este proceso se secretan enzimas líticas que degradan la MEC y facilitan la migración.

2) Intravasación dentro del lumen de los vasos sanguíneos. La intrusión de las células cancerosas en los vasos sanguíneos y linfáticos, seguida de su unión a las células endoteliales a través de moléculas de adhesión, las células neoplásicas secretan enzimas proteolíticas que les permiten infiltrarse en los vasos sanguíneos.

3) Circulación. Las células se desplazan a través del torrente sanguíneo o linfático y tienen que resistir las condiciones presentes en la sangre. Debido a la toxicidad del medio sanguíneo, por la alta concentración de oxígeno y a la presencia de linfocitos citotóxicos, aquí se lleva a cabo una selección de células tumorales particularmente resistentes y agresivas.

4) Extravasación en el parénquima de tejidos distantes. Las células a menudo se atascan en los capilares de un órgano y salen de la corriente de la sangre al penetrar el endotelio a través de la proliferación y/o enzimas proteolíticas.

5) Colonización, proliferación y angiogénesis. Las células neoplásicas se establecen en un sitio del tejido distante y da origen a un tumor secundario. Este último prolifera e induce la neoangiogénesis con el fin de asegurar suficiente vascularización (Fidler, 2003).

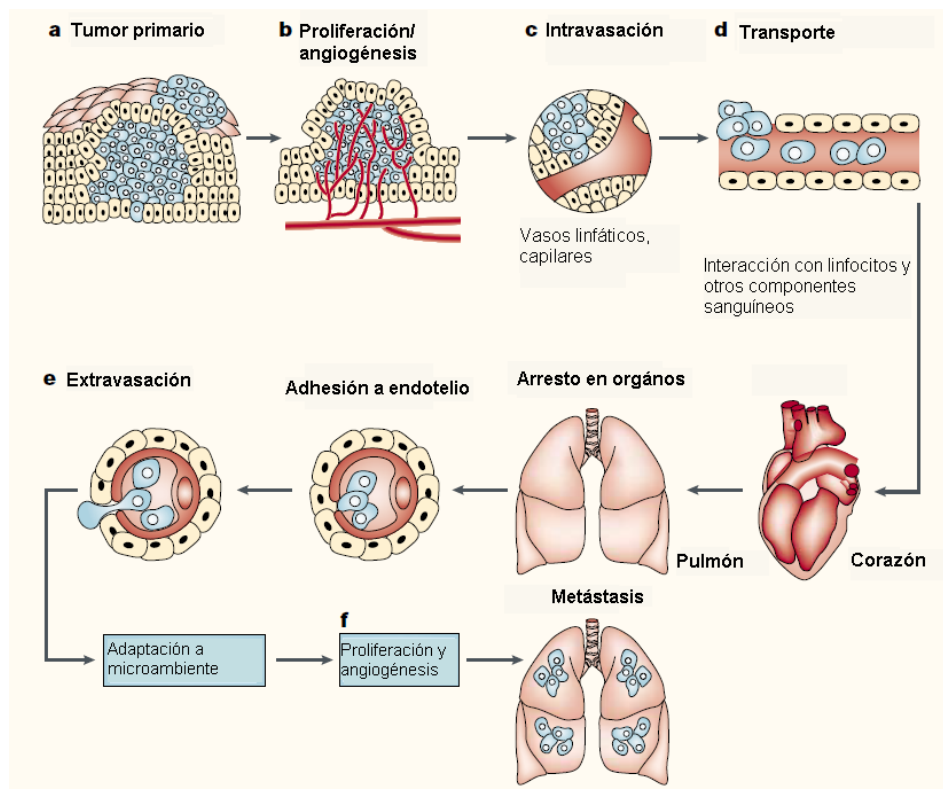


Figura 3. Principales pasos de la formación de metástasis. Durante la progresión metastásica, las células tumorales salen de sus sitios primarios de crecimiento (invasión local, intravasación), translocación sistémica (supervivencia en la circulación, , extravasación), y se adaptan para sobrevivir y prosperar en los microambientes de tejidos distantes (formación de micrometástasis, la colonización metastásica) (Modificado de Fidler, 2003).

Otro punto importante por el cual el CaP presenta una alta tasa de mortalidad la resistencia a la quimioterapia.

Como se mencionó anteriormente uno de los fármacos utilizados comúnmente para el tratamiento de CaP es el cisplatino, también conocido como cis-diaminodicloroplatino o CDDP, es un fármaco a base de platino. Tiene numerosas propiedades, que incluyen actividad anticancerígena de amplio espectro y efectos curativos, que lo hacen útil para el tratamiento clínico de diversos tipos de tumores (Natile y Colucci, 2001). Sin embargo, su uso está asociado con varios efectos secundarios, que sirven para limitar las dosis que se pueden administrar, principalmente debido a la nefrotoxicidad (Miller *et al.*, 2010). Aun así, se mantiene en uso como un agente quimioterapéutico estándar para el tratamiento de numerosos tipos de cáncer, incluido el cáncer de ovario, cervical, entre otros (Florea y Büsselbe, 2011; Gumulec *et al.*, 2014; Rose *et al.*, 2012; Stordal *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016). Algunos tumores presentan resistencia a este fármaco, esta resistencia se puede adquirir en el curso del tratamiento, como sucede en los tumores de ovario o los tumores de células germinales, o presentarse de forma intrínseca desde el inicio del tratamiento, como sucede en el cáncer colorectal, próstata, pulmón o mama (Kelland, 2007).

El CDDP se caracteriza por ser un complejo neutro, es decir no tiene la capacidad de reaccionar, por lo que se dirige a la zona donde se localiza el tumor sin sufrir previa reducción, una vez administrado, parte de su concentración entra al interior de la célula a través de distintos transportadores, llegando al núcleo, dónde ejercerá su acción citotóxica. En el núcleo, por hidratación de una de las dos moléculas de cloro, ésta se une de manera covalente al ADN generando complejos ADN-proteína y ADN-ADN, ya sea en la misma cadena o entre cadenas distintas de material genético. Esto activa inmediatamente varias rutas de señalización intracelular con el objetivo de reconocer el daño en el DNA, reparar el daño causado mediante la detención del ciclo celular o iniciar programas de apoptosis por la vía mitocondrial. Las lesiones en el ADN inducidas por platino generan distorsiones, que pueden ser reconocidas por múltiples mecanismos de reparación. Entre todos ellos, la reparación por excisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés) parece ser el más activo para eliminar ADN acoplado a CDDP. En esta fase es importante el papel de p53 que, tras el reconocimiento

del daño, actúa parando el ciclo celular en G1/S vía transactivación de p21 dando tiempo al DNA a repararse si el daño no es importante, y si esto no es posible induciendo apoptosis mediada por Bax (Kelland, 2007; Siddik, 2003).

El CaP es resistente a la quimioterapia con cisplatino debido a al desarrollo de resistencia (Timata y Momura, 2007). Para superar esto último, la dosis de cisplatino puede ser elevada, pero con efectos secundarios graves. Debido a que el cisplatino es el miembro más potente de la familia de medicamentos contra el cáncer, su uso potencial en el CaP es atractivo.

Dentro de ambos procesos de metástasis y la resistencia a la quimioterapia intervienen distintas vías de señalización, entre ellas la iniciada por el receptor c-kit (Kitanya e Hirota, 2004; Siemens *et al.*, 2013; Foster *et al.*, 2018; Cardoso *et al.*, 2014).

c-kit y Stem Cell Factor (SCF)

c-Kit o CD117 es el equivalente celular del oncogén *v-kit*, de un retrovirus felino transformado. Es una proteína transmembranal de 145 kD, que funciona como receptor con actividad de cinasa de tirosina (RTK) de tipo III y es codificado por el gen KIT. Esta clase de receptores se caracterizan por la presencia de 5 dominios tipo inmunoglobulina y una secuencia insertada de cinasa de 70-100 aminoácidos que se localizan en medio del dominio de cinasa. En el caso de c-kit, esta región es de aproximadamente 80 aminoácidos. La parte intracelular posee una región yuxtamebranal, la cual es muy importante para la regulación de la actividad de cinasa de c-kit. El dominio de cinasa comprende dos subdominios, el dominio de cinasa de tirosina 1 y 2, los cuales están interrumpidos por la secuencia insertada de cinasa. Finalmente, se encuentra la cola del extremo carboxilo terminal (Figura 4). La mayoría de los sitios de fosforilación de c-kit que se activan al recibir el estímulo de su ligando se encuentran en la región yuxtamembranal, el inserto de cinasa, o la cola COOH-terminal (Ashman, 1999; Lennartsson y Rönnstrand, 2012; Cardoso *et al.*, 2014; Abbaspour *et al.*, 2016).

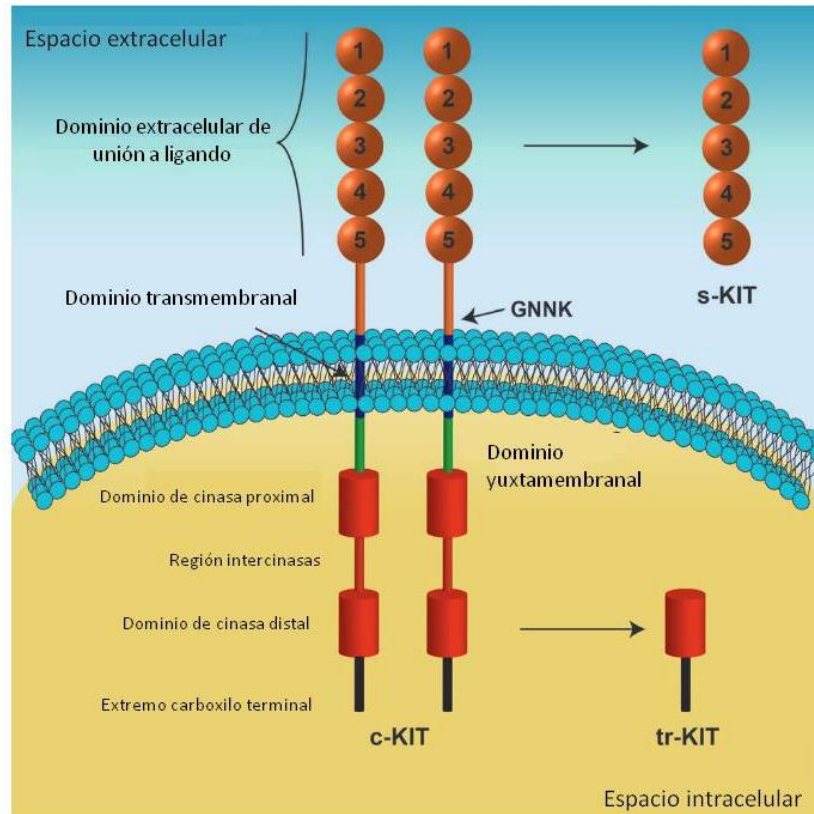


Figura 4. Representación esquemática de c-Kit. Algunas formas alternativas de c-kit se caracterizan por la presencia del tetrapéptido Gly-Asn-Asn-Lys (GNNK) en el dominio yuxtamembranal extracelular. El receptor puede ser escindido y liberado de la membrana celular, dando lugar a una molécula soluble (s-kit) que consiste únicamente en el dominio extracelular. Una forma trunca de c-kit (tr-kit), se deriva del uso del promotor alternativo, carece de los dominios extracelular y transmembranal, pero tiene parte de la cinasa (Modificado de Cardoso *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que en ratones y humanos c-kit se expresa como dos isoformas diferentes, causadas por “splicing” alternativo, en la secuencia GNNK conformada por glicina, asparagina, asparagina, lisina. Estos aminoácidos están presentes o ausentes en sentido ascendente del dominio transmembrana de c-kit (GNNK + GenBank ID: NM_000222 y GNNK- GenBank ID: NM_00109372 (Benson *et al.*, 2013; GeneBank), con tamaños respectivos de 5190 y 5178 pb). Varios estudios demostraron que las isoformas, según el tipo de célula, pueden activar diferentes vías de transducción de señales y sus efectos sobre la tumorigenicidad, confieren fosforilación constitutiva de tirosina y estimulan la asociación con la cinasa de 3-fosfatidilinositol (PI3K) (Votyuk *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2013). En 1999, un estudio demostró que la isoforma GNNK-transformada en fibroblastos NIH3T2 causó tumorigenicidad en xenotransplantes en ratones desnudos (Caruma *et al.*, 1999). Otro estudio de 2003 mostró un aumento de la expresión de la

isoforma GNNK en tumores de células germinales testiculares, en comparación con el testículo normal, que tenía una mayor expresión de receptor GNNK + c-kit (Sakuma *et al.*, 2003) Mientras que GNNK- tiene una afinidad más alta por su ligando el Stem Cell Factor (SCF), así como una cinética más rápida en su fosforilación, la isoforma GNNK- es la isoforma dominante en el tejido normal, como la médula ósea y los melanocitos. Otros estudios sugieren que la proporción de GNNK- / GNNK + es lo que causa la tumorigenicidad, con una mayor proporción de GNNK- / GNNK + como fuerza motriz cuando está presente la mutación D816V (Crosier *et al.*, 1993). Se requieren estudios adicionales para comprender las funciones fisiológicas y oncogénicas de estas isoformas.

Otra isoforma de c-kit se ha detectado en el testículo murino; esta isoforma es trunca, resulta del elemento promotor dentro del intrón 16, que contiene 12 aminoácidos y una cola COOH-terminal sin actividad de cinasa (Ashman *et al.*, 1999). Esta isoforma también se ha encontrado expresada en cáncer de próstata (Papayannopoulo *et al.*, 1991). Contrariamente, un estudio reportó que esta isoforma es específica del ratón y no se expresa en humanos (Broudy *et al.*, 1992).

El ligando de c-kit es el factor de células troncales (SCF, por sus siglas en inglés), es un factor de crecimiento que puede encontrarse unido a la membrana o de forma soluble. Lo expresan fibroblastos y células endoteliales de todo el cuerpo, promoviendo la proliferación, migración, supervivencia y diferenciación de progenitores hematopoyéticos, melanocitos y células germinales. Su gen se localiza en el cromosoma 10 de ratones y en el 12 en humanos (Ropers y Craig, 1989). En ratones, ratas y humanos, el SCF está codificado por 9 exones (Martin *et al.*, 1990).

Ambas formas de SCF, membranal y soluble, son reguladas tanto a nivel de mRNA y a nivel proteína (Anderson *et al.*, 1991). Se diferencian en la presencia del exón 6. Ambas isoformas codifican a SCF membranal, que contiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal y una región intracelular. En el splicing la forma membranal es rápidamente escindida para generar un péptido de 165 aminoácidos correspondiente al SCF soluble. Los transcritos más cortos, que carecen del exón 6, permanecen unidos a la membrana (Figura 5). Ya sea la forma membranal o la soluble, el SCF se une a c-kit, con la consecuente activación del receptor con

actividad de cinasa de tirosina, pero con diferencias cualitativas y cuantitativas en la forma de la señal.

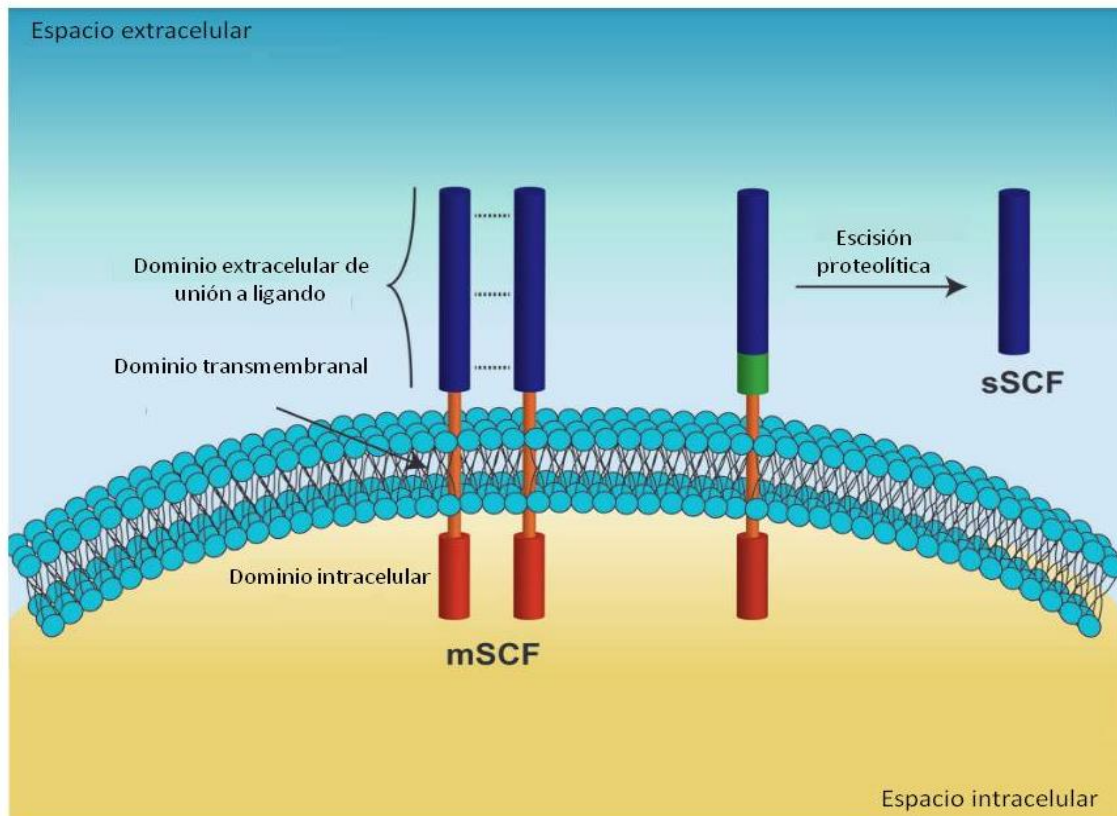


Figura 5. Representación esquemática de SCF. SCF contiene un dominio extracelular que es responsable de reconocer y unirse a c-kit, un dominio transmembranal y un dominio intracelular. SCF existe como un homodímero unido a la membrana (mSCF) o como una proteína soluble (sSCF). El sSCF se deriva de la escisión proteolítica de una variante por splicing alternativo de SCF que contiene al exón 6 alternativo (verde) (Modificado de Cardoso *et al.*, 2014).

c-kit juega un papel importante en el mantenimiento y diferenciación de células troncales (Ashman, 1999). Se ha detectado la expresión de c-kit en varias células troncales o células con la capacidad de auto-renovación y células progenitoras (Oliveira y Lukacs, 2003; Waskow *et al.*, 2002). Estudios también han confirmado que c-kit se expresa en diferentes tipos de células troncales, especialmente hematopoyéticas (Loveland y Schlatt, 1997; Blume-Jensen *et al.*, 1998). En varias mutaciones de pérdida de función de c-kit, el sitio mutado se ha relacionado con una amplia gama de defectos, desde los de menor importancia en la actividad catalítica a los defectos críticos en el sistema hematopoyético en ratones (Kissel, 2000). También se ha informado que

mutaciones en *c-Kit* afectan significativamente otros sistemas tales como la reproducción, la pigmentación, y sistema nervioso (Scott *et al.*, 1994; Mackenzie *et al.*, 1997).

Las células troncales hematopoyéticas se dividen asimétricamente y pueden auto-renovarse o diferenciarse en todos los linajes de células hematopoyéticas, incluyendo mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas y células dendríticas) y linfoides (células T, células B y células NK) (Wehrle-Haller, 2003). Durante la diferenciación, renovación y proliferación celular; este fenómeno conduce a un aumento en el número de células (Kimura *et al.*, 2004). El receptor de SCF, se expresa en células hematopoyéticas, como las células troncales y progenitoras. Sin embargo, la expresión de *c-kit* se desvanece durante diferenciación (Lyfor *et al.*, 2002; Huizinga *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995; Wars *et al.*, 1994). Menos de 1% de las células de sangre periférica expresan *c-kit*, que indica su papel mínimo en las células hematopoyéticas ya diferenciadas (Jin *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004; Ashman y Griffith, 2013). Además, *c-kit* es altamente expresado en mastocitos; como tal, las células diferenciadas dependen de la transducción de señales de *c-kit* para su supervivencia, función y crecimiento (Lennartsson *et al.*, 2005; Liang, 2013). Por último, entre los linajes linfoides, *c-kit* está implicado en el mantenimiento del sistema inmune en animales adultos (Huang *et al.*, 1996).

En células germinales en el sistema reproductor *c-Kit* parece tener un papel importante. Estudios previos mostraron que las dos principales mutaciones de *c-kit* son:

Mutaciones activadoras (*gain function*): la actividad de cinasa de tirosina de *c-kit* aparece constitutivamente aumentada en ausencia de ligando y normalmente conducen a la protección de las células germinales contra apoptosis, inducción de la migración celular y la proliferación (Willmore-Payne *et al.*, 2005).

Mutaciones inhibitoras (*lost of function*): se pierde la actividad de cinasa de tirosina de *c-kit*.

La vía necesaria para la inhibición de la apoptosis por *c-kit* es aquella por PI3K/Akt, esencial en procesos celulares tales como la síntesis de proteínas, proliferación y supervivencia (D'Amato *et al.*, 2005, Liang *et al.*, 2013).

Así mismo, una baja expresión de c-Kit en ratones provoca defectos de pigmentación, que se relaciona con la capacidad de SCF para inducir la proliferación y guiar la migración de los melanocitos de la cresta neuronal a las dermis (Kelly y Gilliland, 2002; Hoei-Hansen *et al.*, 2007; Beadling *et al.*, 2008). Otros estudios revelaron dos residuos de tirosina 568 y 570 en c-kit, que son necesarios para la pigmentación normal (Heinrich *et al.*, 2002). Mutaciones de pérdida de función en c-kit son comunes en humanos con síndrome de piebaldismo, un raro trastorno autosómico dominante de desarrollo de melanocitos. Este síndrome se caracteriza por la hipopigmentación en el estómago, el pelo y extremidades resultado de la deficiencia de melanocitos (Catalano *et al.*, 2004). Por otra parte, la actividad de c-kit influye en los sistemas digestivo y nervioso. Se sugiere que participa en las células intersticiales de Cajal o (CIC). La pérdida de las CIC se correlaciona con enfermedades como la constipación (Ikeda *et al.*, 1991). Investigaciones previas han sugerido el papel vital de c-kit en el desarrollo de las CIC o en su función (Huo *et al.*, 2005; Rodrigues y Park, 1994; Kitayama *et al.*, 1995). En ratones con mutaciones de pérdida de función de c-kit, las CIC disminuyen (Ikeda *et al.*, 1991). Varios estudios informaron el papel de c-kit en el desarrollo y/o función de las células del sistema nervioso. La presencia de c-kit también se ha detectado en células neuroproliferativas en cerebros de ratas adultas, además en cultivos neuronales (Moriyama *et al.*, 1996). También la señalización de c-kit es importante en la migración de células madre neuronales a las áreas lesionadas del cerebro (Lam *et al.*, 1999).

Vías de señalización activadas por c-kit y SCF

La activación de c-kit se produce cuando un dímero de SCF se une a su dominio extracelular. c-kit se encuentra inactivo en la superficie celular como un monómero; mientras que el SCF está como un dímero extracelular (Philo *et al.*, 1996; Longley *et al.*, 2001).). Tras la unión del SCF, el receptor forma un homodímero, causando su autofosforilación en residuos de tirosina específicos en el dominio catalítico intracelular (Ke *et al.*, 2016; Blume-Jensen *et al.*, 1991). La fosforilación de c-kit desencadena la inducción de diversas vías de transducción de señales, incluidas JAK/STAT, RAS/MAP cinasas, PI3K/Akt, PLC y SRC, como se muestra en la figura 6. La supervivencia celular, la proliferación, la diferenciación y la migración se producen una vez que c-kit está activado, lo que requiere la superposición de estas vías (Liang *et al.*, 2013; Stankov *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*,

2017; Linnekin, 1999; Blechman *et al.*, 1993; Hsu *et al.*, 1997). El receptor se ubiquitina rápidamente por SOCS6 después de la autofosforilación, lo que resulta en su internalización y degradación. Las vías descendentes se discuten en detalle a continuación.

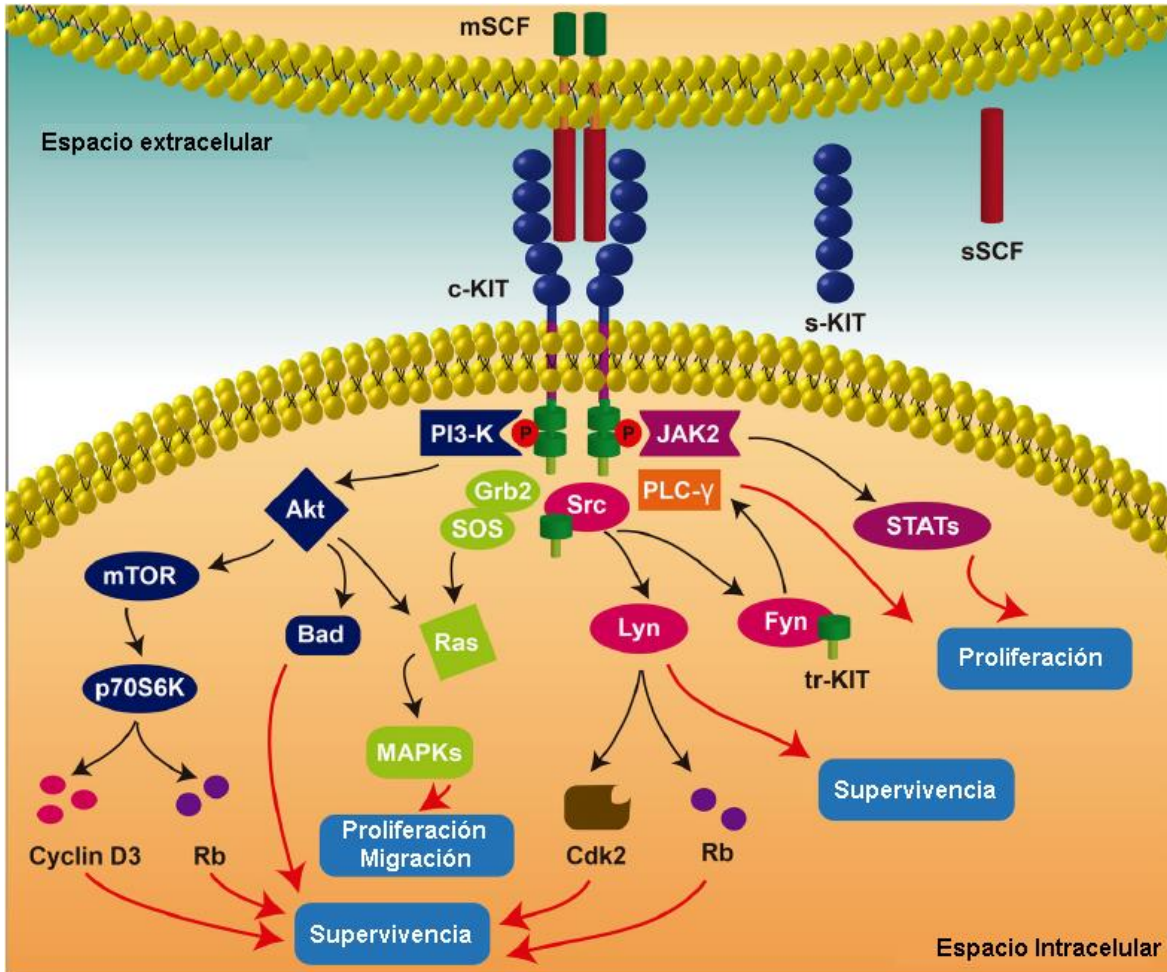


Figura 6. Cascada de señalización intracelular activada por la unión del SCF a c-kit. La señal de Ras /Erk (verde) conduce a la activación de la vía RAS-RAF-MEK-ERK. La señal de PI3K (azul oscuro) está asociada con angiogénesis y supervivencia celular. PLC-γ (naranja) regula la proliferación y la supervivencia. Src (rosa) juega un papel clave en varias vías de transducción de señales implicados en la supervivencia celular, proliferación, motilidad, migración, invasión y la angiogénesis. La vía JAK/STAT (púrpura) está implicada en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (*Modificado de Cardoso et al., 2017*).

Vía JAK / STAT

La vía JAK / STAT desempeña un papel importante en la proliferación y diferenciación celular tanto en células murinas como en células humanas. La unión del SCF induce la activación rápida de JAK2

y estimula la fosforilación de las STAT 1, 2 o 5. Una vez que las STAT se fosforilan, se translocan al núcleo, donde regulan la transcripción de los genes diana responsables de la proliferación celular (Weiler *et al.*, 1996; Moub *et al.*, 1997).

Vía de Ras/MAP cinasas

La activación de la cascada de las cinasas RAS/MAPK ocurre cuando el CD117 activado recluta proteínas adaptadoras que contienen un dominio SH-2, como GRB2, Shc y SHP2. Grb2 se unirá directamente a CD117 en los residuos Y703 e Y936 fosforilados, o indirectamente a Shc o SHP2 (Kitamura y Hirota, 2004; Thömmes *et al.*, 1999). Una vez unido, el Grb2 se asociará con SOS (Son-of-Sevenless), un factor de intercambio de nucleótidos de guanina. Este complejo provoca la activación de la cascada RAS/Raf/MEK1/2/ERK (Kitamura y Hirota, 2004; Duronio *et al.*, 1992]. Lo anterior resulta en la estimulación positiva de varios factores de transcripción necesarios para la regulación de la proliferación, apoptosis, diferenciación, adhesión y movilidad celular.

Vía PI3K/Akt

PI3K es responsable de la inducción de la actividad de Akt y Mtor (Stankov *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2008). La vía PI3K es la principal vía responsable de la supervivencia celular. Akt inactiva, por interacción, a BAD, lo que lleva a la supervivencia celular. Además, la fosforilación de c-kit y la activación de la PI3K y las rutas de SRC contribuyen al motilidad celular mediado por SCF (Ueda *et al.*, 2002).

Vía de la SRC

La variante de “splicing” GNNK de c-kit activa fuertemente a SRC y las cinasas de la familia SRC (SFK). SFK pueden interactuar con varios residuos de tirosina en CD117 (nombre alternativo de c-Kit), pero solo se requiere Tyr568 para la activación. SCF también puede activar SFK; en concreto, Lyn, Fyn y PLC. La activación de Lyn aumenta la actividad de la cinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2), así como la fosforilación de Rb, para promover la proliferación celular (Linnekin *et al.*, 1997; Saleem *et al.*, 2014). Si bien, Lyn promueve la proliferación celular, también se demostró que ésta puede regular negativamente la vía de la PI3K/Akt, aunque el mecanismo subyacente aún se desconoce (Shivakrupa y Linnekin, 2004). Mientras que Lyn puede regular negativamente

la ruta de la PI3K, Fyn puede fosforilar Akt en sentido descendente. Fyn también desempeña un papel en la activación de PLC cuando interactúa con la forma trunca de c-kit (tr-KIT) a través de la activación de ovocitos de ratón (Shivakrupa y Linnekin, 2004; Sette *et al.*, 2002).

Vía PLC γ

Varios estudios muestran diferentes sitios de acoplamiento para PLC. Esta proteína puede asociarse con los residuos fosforilados Tyr720, Tyr659, Tyr730, Tyr936 y Tyr900 de c-kit (Phane Maddens *et al.*, 2002; Lennartsson *et al.*, 2003; Gommerman *et al.*, 2003). El fosfoinosítido 2 (PIP2) es hidrolizado por PLC para generar DAG e inositol trifosfato (IP3). El diacilglicerol (DAG) activa PKC mediante su enlace, mientras que IP3 provoca la liberación de Ca²⁺. PKC tiene un papel en la supervivencia celular, la proliferación y la adhesión (Stankov *et al.*, 2014; Lennartsson *et al.*, 2005).

En resumen, la activación del eje de señalización SCF/c-kit puede conducir, mediante diversas vías de señalización, a la supervivencia, proliferación y motilidad celular, los cuales son procesos esenciales en la progresión del cáncer.

c-kit en la regulación de la progresión del cáncer

La principal mutación de c-kit conlleva a su sobreactivación que se observa en varios tipos de cáncer, como los tumores gastrointestinales (GIST), la mastocitosis, la leucemia aguda mieloide (LAM) y el melanoma (Ke *et al.*, 2016; Lammie *et al.*, 1994; Longley *et al.*, 2001). Estudios recientes y ensayos clínicos sugirieron que CD117 puede usarse de manera efectiva para el pronóstico, particularmente para predecir la metástasis del cáncer y la respuesta a la quimioterapia. Se identificaron y estudiaron biomarcadores con CD117 en varios tipos de células tumorales (Tay *et al.*, 2013; Medinger *et al.*, 2010). En un solo estudio, c-kit se sobreexpresó en 21% de los cánceres de mama, 17% de los cánceres colorrectales, 35% de los sarcomas, 36% de los carcinomas de células renales, 17% de los cánceres de ovario y 17% de los tumores hepatocelulares. Aunque sin ser estadísticamente relevante, se observó una tendencia hacia una peor prognosis en estos pacientes (Medinger *et al.*, 2010). Además, el 63% de los pacientes con LAM tenían mutaciones de CD117, mientras que el 89–100% de los pacientes con GIST expresaron CD117 (Longley *et al.*,

2001). La figura 7 muestra la amplificación y mutación de gen KIT n varios cánceres utilizando conjuntos de datos disponibles a través de cBioPortal (Cerami *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013). Las variantes genéticas de c-kit (como resultado de la eliminación de exones) identificaron una mal prognosis en pacientes con GIST después de la resección del tumor primario (Hou *et al.*, 2009; Andersson *et al.*, 2006). En 2012 se reportó que en tumores resecados de 38 pacientes antes del tratamiento con Imatinib (el inhibidor de c-kit) 63% presentó mutaciones localizadas en c-kit (Wozniak *et al.*, 2012). De igual forma, en 2017 se encontró que una sobreexpresión de las mutantes más comunes de c-kit (en los exones 11 y 13) en el 88% de los tumores de GIST había hecho metástasis al hueso (Kosemehmetoglu *et al.*, 2017). Estas mutaciones activadoras, particularmente en el exón 11, se confirmaron en estudios similares que analizaron pacientes con GIST (Penzel *et al.*, 2005; Burger *et al.*, 2005).

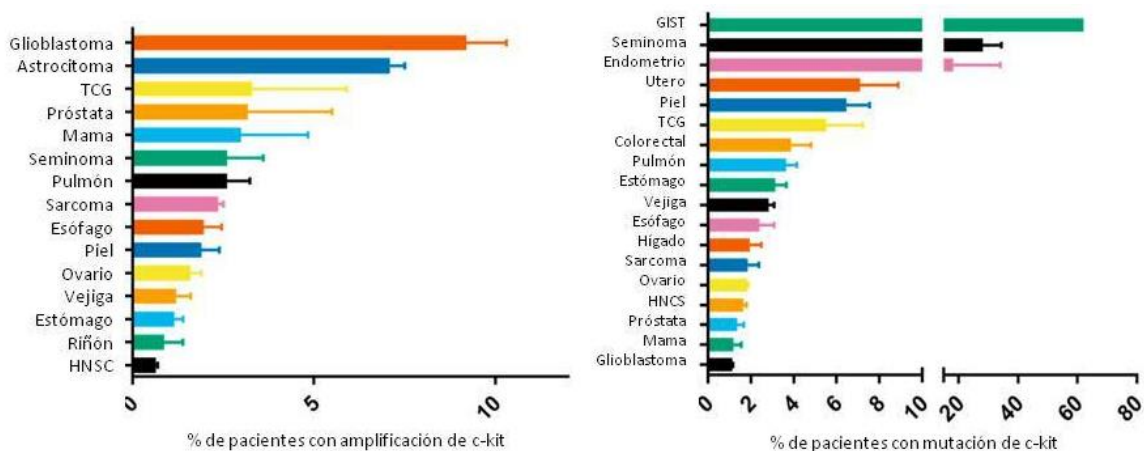


Figura 7. Estado de c-kit en varios tipos de cáncer. Los conjuntos de datos genómicos en cBioPortal (Cerami *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013) fueron examinados en busca de amplificaciones o mutaciones de CD117 (gen KIT). Se muestra el porcentaje medio de pacientes con cada tipo de cáncer con amplificaciones o mutaciones \pm SEM. TCS: tumor de células germinales; HNSC: (Modificado de Foster *et al.*, 2018)

Más allá del GIST, la relevancia clínica de la activación de PI3K/Akt impulsado por c-Kit fue respaldada por la observación de pacientes con cáncer de ovario, que mostraron una menor supervivencia cuando expresaban niveles más altos de c-Kit, así como cuando presentan mayores niveles de p-Akt (Schilder *et al.*, 2008; Chau *et al.*, 2013; Stemberger-Papíć *et al.*, 2015). La progresión acelerada en dichos pacientes se debió a la naturaleza tumorigénica y quimiorresistente de las células de cáncer de ovario con fenotipos que expresan c-kit (Burgos-Ojeda *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2011). La coexpresión de c-kit y los factores asociados de células

troncales y los ligandos en los carcinomas de mama y cáncer de pulmón de células pequeñas también desempeñan un papel en el crecimiento autocrino y la proliferación de células tumorales (Hines *et al.*, 1995; Krystal *et al.*, 1996).

La activación aberrante de c-Kit se asocia con una disminución de la quimiorreactividad/quimiorresistencia de las células cancerosas y un aumento de la señalización oncogénica, presumiblemente al mediar un escape de los desencadenantes apoptóticos (Bellone *et al.*, 2001; Catalano *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2012; Duensing *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2011).

Las mutaciones activadoras y la sobreexpresión del protooncogén c-kit son, por lo tanto, factores esenciales el crecimiento tumoral y la metástasis en múltiples tumores sólidos que se desarrollan fuera del microambiente óseo.

c-kit en CaP

Anteriormente se ha investigado la expresión c-kit y SCF en tumores prostáticos, encontrando una correlación positiva entre aumento de expresión del receptor y el avance en el estadio, incluso entumores de metástasis ósea. En 2008 Wiesner y colaboradores reportaron una mayor expresión de c-kit y SCF en las lesiones metastásicas óseas en comparación con los tumores primarios de pacientes con CaP. También, confirmaron la expresión *de novo* de c-kit mediante dos modelos de tumores intraóseos diferentes y tres líneas celulares de CaP adicionales, los resultados confirmaron que c-kit es negativo cuando las células se cultivan *in vitro* y en tumores en tejidos no óseos. Sin embargo, tales pruebas sugieren que la inducción de la expresión de c-kit se desencadena por el microambiente óseo como resultado de una adaptación de las células de CaP (Wiesner *et al.*, 2008). Sin embargo, aún no se conoce del todo el efecto del SCF sobre las células del CaP y en todo caso, es necesario definir si c-kit está participando en el proceso metastásico. Estudios recientes encontraron que las células CD117 positivas en la circulación predicen el cáncer de próstata avanzado, con una correlación positiva entre la expresión de CD117 y las puntuaciones de Gleason (Kerr *et al.*, 2015; Sakabe *et al.*, 2017).

En nuestro laboratorio se encontró que las líneas celulares derivadas de metástasis de CaP DU145 (cerebro) y PC3 (hueso) expresan c-kit y la proporción de células que lo expresan son 3.68% y 0.88% respectivamente. Además se analizó la proliferación al ser estimuladas con SCF, en donde

se demostró que el receptor es activo y la proliferación aumenta dependiendo de la dosis de SCF. Por otra parte, en ensayos de muerte celular por falta de nutrientes, se observó que SCF protege de la muerte a células DU145. Otro de los resultados más importantes es que las células capaces de crecer independientemente del anclaje expresan frecuentemente a c-kit por lo que estas células podrían tener un mayor potencial metastásico (Jiménez-Sánchez, 2014).

Ya que se observó que el patrón de expresión de c-kit es distinto en los cultivos en monocapa (2D) a los esferoides generados en el crecimiento dependiente de anclaje, en este trabajo se propone la implementación de los cultivos 3D, para comparar lo que ocurre en ambos sistemas y acercarnos más a lo que sucede *in vivo*.

Inhibidores de RTK's

Los receptores con actividad de cinasa de tirosina como c-kit, son un potencial blanco terapéutico para contrarrestar las alteraciones carcinogénicas. La activación de estos receptores puede llevar a la fosforilación de varios substratos clave. Muchos receptores para factores de crecimiento median sus efectos celulares por actividad intrínseca de cinasa de tirosina, la cual, a su vez, puede fosforilar otros substratos involucrados en mitogénesis.

Los inhibidores de la cinasa de tirosina (TKI) están siendo probados en una variedad de cánceres que expresan a c-kit y otros RTKs relacionados. Muchos de estos inhibidores se desarrollaron originalmente para otros miembros de la familia de RTKs tipo III. Sin embargo, debido a las superposiciones en la estructura del receptor, muchos TKI también tienen especificidad por c-kit (Tabla 2). En particular, el imatinib (Gleevec[®]) es un tratamiento estándar que ha demostrado especificidad para inhibir c-kit, entre otras cinasas de tirosina, como BCR-ABL (Iqbal e Iqbal, 2014; Al-Hadiya *et al.*, 2014). Los primeros estudios sobre imatinib *in vitro* y en pacientes humanos con cáncer de estroma gastrointestinal o GIST por sus siglas en ingles confirmaron el papel de c-kit en la metástasis del cáncer. En estos estudios, el imatinib fue bien tolerado y eficaz para atacar el dominio de cinasa de c-kit (Joensuu *et al.*, 2001; Van Oosterom *et al.*, 2001; Tuveson *et al.*, 2001). Los efectos inhibidores de imatinib en c-kit (junto con su inhibición de la indoleamina 2,3-dioxigenasa, una enzima inmunosupresora) lo han convertido en un agente quimioterapéutico de primera línea (Balachandran *et al.*, 2011; Seifert *et al.*, 2017; Seifert *et al.*, 2014). Sin embargo, el

desarrollo de la resistencia al imatinib es frecuente (Edris *et al.*, 2013). Los GIST resistentes a imatinib metastáticos no resecables llevaron al desarrollo de TKI relacionados con imatinib, como sunitinib y regorafenib (Demetri *et al.*, 2006; Demetri *et al.*, 2013; Parikh y Gupta, 2013; Demetri *et al.*, 2013). Las mutaciones de c-kit en GIST son responsables de la resistencia al tratamiento con TKI. El 14% de los pacientes con GIST son inicialmente resistentes al imatinib y el 50% desarrolla resistencia dentro de los dos años de tratamiento. Para la mayoría de los pacientes, se utiliza sunitinib y es efectivo, a menos que estos pacientes posean la mutación D816H/V, en cuyo caso serán resistentes a ambos TKI. Imatinib funciona mejor en c-kit inactivo y evita su activación (Gajiwala *et al.*, 2009). El éxito del imatinib en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC), que inhibe principalmente el BCR-ABL en esta línea de células cancerosas, llevó al desarrollo del nilotinib como tratamiento de segunda línea, un fármaco que también presenta propiedades anti-CD117 (Saglio *et al.*, 2010; Kantarjian *et al.*, 2011; Reichardt *et al.*, 2012).

Tabla 2. Especificidad de inhibidores TKI para c-kit.

| Nombre | Nombre de prueba | Otros blancos (además de c-kit) | Biodisponibilidad | Especificidad por c-kit | Referencia |
|---------------------|------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------|--|
| Imatinib | Gleevec/Glivec, STI571 | BCR-Abl, RET, PDGF-R | 98% | 0.1 µM | DrugBank Database, Juurikiv, Galanis |
| Sunitinib | Sutent, SU11248 | JAK/STAT, PDGF-R, Ras/MAPK, VEGFR | 50% (rápido) | 26 nM | DrugBank Database, Galanis, Di Gion, Hu |
| Nilotinib | Tasigna | BCR-Abl, Lck | 30% | S.D. | DrugBank Database, Andersson |
| Dasatinib | Sprycel | BCR-Abl, Src | 14–34% | 13 nM | DrugBank Database, Galanis, Wong, Santos |
| Axitinib | Inlyta | BCR-Abl, PDGFR, VEGFR | 58% | 1.7 nM | DrugBank Database, Chen, Bellesoeur |
| Masitinib | Masivet, Kinavet | FGFR, PDGFR | 60% (animals) | 200 ± 40 nM | Bellamy, Dubreuil |
| Pazopanib | Votrient | FGFR, PDGFR, VEGFR | 14–39% | 146 nM | DrugBank Database, Galanis, Deng |
| Toceranib | Palladia | PDGFR, VEGFR | 77% | <10 nM | Yancey, Halsey |
| Cabozantinib | XL184 | VEGFR, c-Met | 74–93% | 4.6 nM | Yakes |
| Flumatinib | HH-GV-678 | c-Abl, PDGFR | S.D. | 2.66 µM | Zhao, Luo |

S.D. Sin datos

Las propiedades anti-angiogénicas de los TKI, como el imatinib, el sunitinib y el pazopanib (que también inhiben a c-kit), se han considerado como terapias prometedoras para el cáncer epitelial de ovario, con ensayos clínicos que demuestran eficacia y tolerabilidad en los tres fármacos (Jackson *et al.*, 2015; Leone Roberti Maggiore *et al.*, 2013) . Hasta la fecha, los TKI siguen siendo

un foco de estudio, ya que los ensayos clínicos piloto y a gran escala informan datos sobre sus beneficios potenciales en el melanoma metastásico, la fibromatosis y los tumores neuroendocrinos (Mahipal *et al.*, 2012; Penel *et al.*, 2011; Chugh *et al.*, 2010; Koch *et al.*, 2016; Kostoula *et al.*, 2005).

Por otro lado, las células de CaP, DU145 y PC3 mostraron un comportamiento contradictorio en respuesta al imatinib, que estaba respaldado por un patrón de expresión (o actividad) distinto de los reguladores del ciclo celular, la apoptosis y la angiogénesis. Imatinib fue eficaz al disminuir la viabilidad celular y aumentar la apoptosis de las células DU145 al alterar la expresión y la actividad de los reguladores de este proceso. Contrario a las DU145, en las células PC3, el imatinib estimuló la viabilidad celular y aumentó la expresión del factor angiogénico VEGF. Este estudio también sugirió que la especificidad en respuesta a imatinib pueden estar relacionadas con la expresión diferencial de las isoformas c-kit, a saber, tr-kit. Por lo tanto, los ensayos futuros que prueban la eficacia de imatinib en CaP, los tumores deben ir acompañados de la caracterización molecular de los RTKs (Cardoso *et al.*, 2015).

Además, los hallazgos presentes ayudaron a comprender las discrepancias en la eficacia de imatinib como opción terapéutica en el CaP. Estos resultados contrastan con los hallazgos experimentales en células cultivadas y modelos animales, donde el imatinib, solo o en combinación con otros fármacos quimioterapéuticos, tuvo efectos citotóxicos (Kimura *et al.*, 2007; Choudhury *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012) y mejoró la quimioterapia y la radiosensibilidad de las células CaP (Kimura *et al.*, 2007; Choudhury *et al.*, 2009; Kubler *et al.*, 2005).

En este trabajo se propone que al administrarse un TKI, en este caso imatinib, a la población de células tumorales que expresan c-kit, en combinación con los tratamientos convencionales de quimioterapia como el CDDP, se podría erradicar una mayor proporción de las células cancerosas. Posteriormente sugerir en la clínica la co-administración de ambos fármacos para contrarrestar la resistencia a CDDP, además de disminuir la dosis del quimiofármaco y evitar los efectos adversos que comúnmente se tiene.

Justificación

El CaP es uno de los tipos de cáncer de gran relevancia por su alta incidencia y mortalidad, esto, en su mayoría, a un diagnóstico tardío, en donde incluso ya hay formación de metástasis; además, su tratamiento se complica debido a heterogeneidad en las alteraciones moleculares porque algunos son resistentes a la hormono y quimioterapia. Por esta razón, es necesaria una terapia más dirigida, puesto que las quimioterapias aprobadas no tienen una respuesta eficiente. Por otra parte, la diferencia en el aumento de la expresión de c-kit en tumores metastásicos, en comparación con los tumores primarios, podría indicar la participación de esta proteína y su ligando en el avance de la formación de metástasis, por lo tanto los quimiofármacos dirigidos hacia su inhibición podría ser una estrategia terapéutica nueva para abordar al CaP.

Hipótesis

Ya que se ha observado la expresión de c-kit en líneas celulares derivadas de metástasis de CaP, se espera que la activación por SCF aumente su potencial invasivo *in vitro* e incremente la resistencia a Cisplatino.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la participación del receptor c-kit y SCF en la capacidad de invasión y la resistencia a Cisplatino de células metastásicas de cáncer de próstata.

Objetivos particulares

- ✓ Corroborar la expresión de c-kit en líneas celulares de cáncer de próstata.
- ✓ Evaluar el efecto del SCF en la formación de esferoides en cultivos 3D .
- ✓ Evaluar el efecto de SCF en la capacidad invasiva.
- ✓ Observar el efecto del SCF junto con la administración de Cisplatino.
- ✓ Evaluar por Western Blot la activación de c-kit y sus principales vías de señalización río abajo.
- ✓ Determinar el efecto del Imatinib en conjunto con Cisplatino.

Materiales y métodos

Líneas celulares y cultivo

Las células DU145 (ATCC® HTB81™) de metástasis de cáncer de próstata en cerebro se cultivaron en medio RMPI 1460 (Caisson labs) con 10% de suero fetal bovino (SFB) y con 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina. El SFB se inactiva a 56 °C por 30 minutos antes de ser adicionado al medio de cultivo.

La línea celular con la que se trabajó fue mantenida y expandida a 37° C en una incubadora con atmosfera húmeda (95% aire y 5% CO₂) siguiendo los procedimientos y las prácticas estándar requeridas por el trabajo con cultivo en condiciones estériles (Davis 2002).

Cultivo celular en 3D

El método que se usó es una modificación hecha por Gangadhara *et al.* (2016) al ensayo original reportado por Lee *et al.* en 2007.

Para el cultivo se usó una placa de 96 pozos, a los cuales se añadieron 50 µL/pozo de Matrigel® (Corning). Todo el material utilizado durante la manipulación del Matrigel se mantuvo en frío. Posteriormente se dejó solidificar en la incubadora a 37°C.

A partir de un cultivo en monocapa, las células se desprendieron con Verseno estéril (EDTA 1 mM, NaCl 0.17 mM, KCl 3 mM y Na₂HPO₄ 10mM, pH 7.7) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Las células se re-suspendieron con medio de cultivo RMPI más SFB (10%) y Matrigel al 3% en el medio de cultivo, se transfirieron 10,000, 7500 y 5000 células en diferentes pozos con Matrigel. Después, se agregaron 200µL de medio de cultivo con Matrigel al 3%. El cultivo se mantuvo por 10 días a 37 °C en una atmosfera húmeda con una composición de 95% aire y 5% CO₂, cada 3 días se reemplazó el medio de cultivo con medio nuevo.

Efecto de SCF en la formación de esferoides.

Para el ensayo del efecto del SCF (Pepro Tech Inc. 300-07) en el cultivo 3D se sembraron 7500 células por pozo en placas de 96 pozos. Posteriormente al grupo control negativo se añadieron 200 µl de medio, al control positivo medio con 10% de SFB, el siguiente grupo de prueba SCF (100ng/ml) con 10% SFB y el último grupo medio con SCF (100ng/ml) únicamente. Se tomaron fotografías y cuantificaron manualmente el número de esferoides formados a 1, 6 y 9 días.

Extracción y cuantificación de proteínas

Se sembraron células en cajas Petri, una vez obtenida una confluencia del 90% con 10 ml de medio y SFB 10%, se llevó a cabo la estimulación de estas con SCF (5ng/ml) a diferentes tiempos (0, 1, 5, 10, 30 y 60 minutos) y se continuó a la extracción de proteínas.

Para obtener el extracto total de proteínas las células se lisaron con buffer de ensayo de inmunoprecipitación RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 1%, DOC 0.5%, SDS 0.1% pH 7.5) con inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasa (Sigma), se incubaron por 20 minutos con agitación a 4°C. El lisado se centrifugó durante 20 min a 13,000 rpm a 4°C, el sobrenadante se recuperó y almacenó a -80°C hasta su utilización.

La concentración de proteína se determinó con el kit "DC Protein Assay" (BIORAD) que es un método colorimétrico. El ensayo se basa en la reacción de la proteína con solución de tartrato de cobre alcalino y reactivo de Folín. Al igual que con el ensayo Lowry, hay dos pasos que conducen al desarrollo del color: la reacción entre la proteína y el cobre en un medio alcalino, y la posterior reducción del reactivo de Folín por la proteína tratada con cobre. Finalmente se leyó en un espectrofotómetro a 750 nm.

Análisis de expresión y activación de distintas proteínas por *western-blot*

Para la separación de las proteínas se prepararon geles SDS-PAGE al 8 o 10% según la proteína a detectar, en los cuales se cargó 30 µg de proteína total; posteriormente se transfirió a una membrana de polivinilo fluorado (PVDF). Esta membrana se lavó con solución salina de Tris-Tween al 10% (v/v) (TBS-T) y bloqueó con leche en polvo "Svelty®" al 3% en TBS-tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario específico para las proteínas que se identificaron con los anticuerpos listados en la tabla 3. Al día siguiente

se incubó con el anticuerpo secundario adecuado para la inmunoglobulina (IgG) del anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. En el caso del anticuerpo secundario biotinilado para c-kit y p-ckit se incubó durante 2 horas y posteriormente se incubó 1 hora con streptavidina. Finalmente se reveló mediante el sistema de detección “Clarity western ECL substrate” de BIORAD.

Tabla 3. Anticuerpos

| Anticuerpo anti- | Dilución | | Tiempo de incubación |
|--|--------------------|----------------------|-----------------------------|
| p-ckit (Y568/Y570) | 1:1000 | Genetex GTX25616 | Toda la noche a 4°C |
| c-kit (c-term) | 1:2000 | Genetex GTX61165 | |
| p-Akt (Ser 473) | 1:1000 | Biologend 649002 | |
| Akt | 1:1000 | Cell Signaling 4691S | |
| p-Erk ½ (Thr202/Tyr204) | 1:1000 | Cell Signaling | |
| Erk ½ | 1:1000 | Genetex GTX17942 | |
| GAPDH | 1:10000 | Santa Cruz SC-48167 | |
| IgG de conejo (HRP) | 1:2000- 1:30000 | Genetex GTX213110-01 | 1 hora TA |
| IgG de cabra, conejo, ratón biotinilado | 1:10000 | Dako E0453 | 2 horas |
| Streptavidina/HRP | 1:20000 | Dako P0397 | 1 hora |

Modelo de invasividad de cámara de Boyden

La capacidad de invasión de las células DU145 se evaluó mediante el ensayo de “transwell” bajo la influencia del quimioatrayente SCF a diferentes concentraciones: 1, 10 y 100 ng/mL; como controles, se utilizó RPMI suplementado con 10% SFB y RPMI sin suplementación.

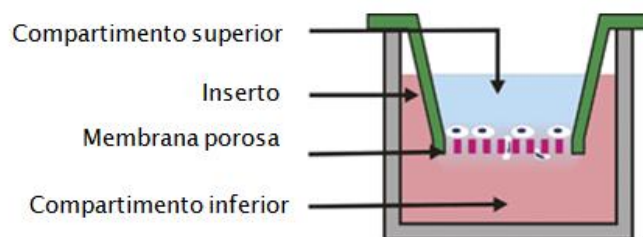


Figura 8. Esquema del modelo de cámara de Boyden.

Este ensayo se realizó en cámaras de Boyden recubiertas con 70 μL de Matrigel diluido en medio RPMI (3 mg proteína/mL), posteriormente se colocaron 2.5×10^5 células suspendidas en medio sin SFB (Fig. 8). El ensayo transcurrió durante 24 hrs y las células que atravesaron la cámara se despidieron con Verseno para posteriormente cuantificarlas. Estas células se tiñeron con Cell Tracker Red[®] (Thermo Fisher Scientific) y cuantificaron por espectrofotometría a una longitud de onda de 602 nm.

Determinación de la DL₅₀ de Cisplatino.

Las pruebas para la DL₅₀ de Cisplatino (SIGMA P4394) se realizaron sembrando 5×10^4 células/pozo en placas de 96 pozos y se incubaron 2 hrs para su adherencia, posteriormente se añadieron concentraciones crecientes del quimiofármaco (5-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$), después de 24 hrs se retiró el tratamiento y se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.

Efecto de SCF sobre la citotoxicidad de cisplatino

Se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/pozo en placas de 96 pozos con 50 μL de medio RPMI con SFB 10% y se incubaron durante 2 horas para su adhesión. Posteriormente se estimularon con SCF a distintas concentraciones (1, 3, 5 y 10 ng/ml) una hora después se agregó la DL₅₀ de Cisplatino (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a cada pozo, exceptuando el control con solo SFB 10%, después de 24 horas se determinó la viabilidad celular por MTT.

Efecto del Imatinib y SCF sobre la citotoxicidad del Cisplatino

De la misma manera que en los experimentos anteriores se sembraron 5×10^4 células/pozo y se dejaron adherir en incubación por 2 horas. Después se agregó a los grupos correspondientes la DL_{50} de Imatinib ($10 \mu\text{M}$) (Glivec[®], Novartis) e incubó por 1 hora. Posteriormente, se añadió el SCF (5 ng/ml) e incubó por 1 hora, finalmente fue agregada la DL_{50} de Cisplatino. El ensayo de MTT se realizó 24 horas después.

Ensayo de viabilidad celular por MTT

Para determinar la viabilidad celular se realizó un ensayo de reducción metabólica de Bromuro de 3(-4,5-dimetiltiazol-2-ilo) 2,5-difeniltetrazol (MTT) (Mosmann, 1983). Para cada experimento al finalizar el tratamiento se reemplazó con $100 \mu\text{l}$ de medio fresco y $50 \mu\text{l}$ de MTT (0.5 mg/mL ; Sigma-Aldrich) e incubó a 37°C durante 2 horas. Al término de la incubación se descartó el medio y adicionó $150 \mu\text{l}$ de isopropanol. La densidad óptica (DO) se leyó en un lector de placas, modelo EL-800 de BIO TEK, a una longitud de onda de 570 nm .

Análisis estadístico

Se realizó prueba de ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con $p < 0.5$ utilizando GraphPad Prism versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Joya California EE. UU., www.graphpad.com

Resultados

Expresión de c-kit

Con la finalidad de corroborar que el receptor c-kit se encuentra expresado en las células DU145, se analizó por medio de Western Blot lisados proteicos de la línea celular, se confirmó la presencia del receptor c-kit en la línea celular DU145 (Figura 9) como ya se había reportado en nuestro laboratorio (Jimenez-Sanchez, 2014). Como control positivo se usaron lisados proteicos de la línea celular de leucemia mieloide crónica K562. Estas células se eligieron como control ya se sabe que expresan niveles considerables de c-kit. En ambas líneas celulares la proteína fue reconocida con el anticuerpo anti c-kit con una masa molecular de 145 kDa, correspondiente al peso del receptor anclado a la membrana. Además, observamos que la expresión de c-kit es menor en DU145 en comparación con lo observado en K562.



Figura 9. Microfotografía de cultivo en monocapa de células DU145 y expresión de c-kit por western blot. Se evaluó la presencia del receptor c-kit mediante Western blot, usando extracto total proteico de las células DU145, mientras que como control positivo se usó la línea K562, además como control interno de carga se usó GAPDH. De lado izquierdo se muestra una microfotografía del cultivo en 2D de las células (400x).

Efecto de SCF en cultivo 3D.

Con el objetivo de evaluar la adhesión y supervivencia de las células cancerosas, que son características de las células metastásicas, se implementó el cultivo en 3D, que funciona como un ensayo de crecimiento de colonias y se acerca a las condiciones que existen en el microambiente tumora. Una vez estandarizado el cultivo celular en 3D y confirmada la presencia del receptor, se continuó a la evaluación del efecto del SCF sobre la formación de colonias, en el cual se usaron 4 grupos de prueba: control negativo (medio de cultivo) (Grupo A), medio con SFB (Grupo B) medio

con SFB-SCF (Grupo C) y medio con SCF (Grupo D). La concentración de SCF se mantuvo constante en 100ng/ml, se usó dicha concentración tomando en cuenta la difusión en el medio y el Matrigel. En la figura 10 se muestran las microfotografías del avance del cultivo 3D a través de varios días, mientras que en la tabla 4 se muestra la cuantificación de colonias de las mismas fotografías. En ausencia de factores de crecimiento las células (grupo A) no tienen la capacidad de formar colonias y sobrevivir por más de 6 días, contrario a lo observado en los otros tres grupos. Como se muestra en la figura 10 (Grupo D) las células DU145 presentan más resistencia a la falta de nutrientes cuando solo se les adiciona SCF, ya que fueron capaces de formar colonias en ausencia de SFB, lo cual es interesante, sugiere que SCF estimula vías de señalización para la supervivencia a la falta de nutrientes. Por otra parte el cultivo se mantiene viable por aproximadamente 2 días más usando SCF.

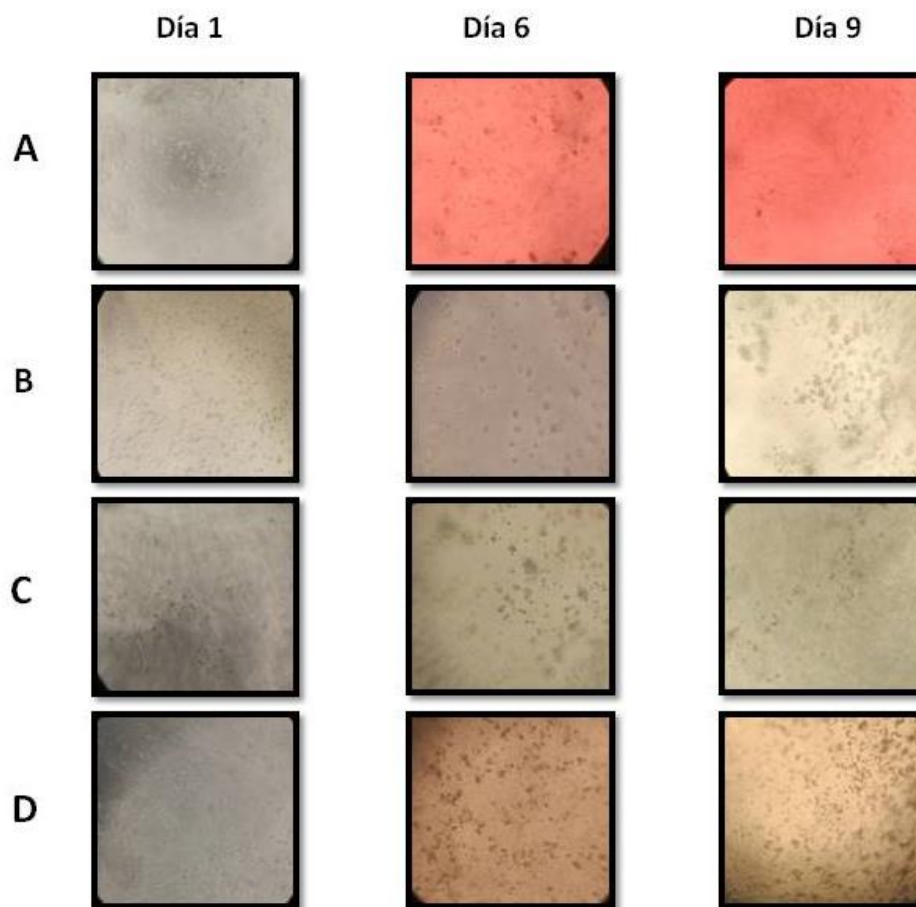


Figura 10. Efecto del SCF en el cultivo en 3D de células DU145. En la figura se muestran microfotografías de cultivo celular de la línea celular DU145 en 3D a distintos tiempos de incubación. A las 24 hrs de iniciar

el cultivo hasta 9 días. El grupo A) corresponde al control negativo es decir medio solo; grupo B) es medio adicionado con 10% de SFB, C) medio, SFB y 100 ng/ml de SCF, finalmente el grupo D medio y 100 ng/ml de SCF. Se observan las células separadas unas de otras, 5 días después algunas empiezan a dividirse y a los 9 días ya se observan las estructuras esferoidales.

| | Día 1 | Día 6 | Día 9 |
|---------|-------|-------|-------|
| Control | 129 | 133 | 84 |
| SFB | 487 | 281 | 589 |
| SFB+SCF | 112 | 216 | 329 |
| SCF | 247 | 1142 | 1458 |

Tabla 4. Cuantificación del efecto de SCF en la formación de colonias de células DU145 en cultivo 3D. Observamos los 4 grupos de tratamiento: Control, medio con SFB, SFB con SCF y SCF (100ng/ml) a 1, 6 y 9 días de incubación. En el grupo control hay un decremento de colonias conforme aumentan los días, sin embargo, en el grupo de SCF el número de colonias aumenta al igual que en el grupo con SFB y SCF.

Esto indica que SCF tiene un efecto sobre la capacidad de las células para sobrevivir a un medio carente de nutrientes y además formar esferoides, muy probablemente mediante la activación de c-kit. Lo anterior, podría contribuir a la resistencia de las células a medios adversos para la implantación y formación de metástasis en sitios distintos al tumor primario.

Efecto de SCF en la capacidad invasiva de las células in vitro.

Es bien sabido que para que una célula cancerosa sea capaz de invadir otros tejidos debe tener dos características: la motilidad y la degradación de la MEC (Fidler, 2003; Scott y Weinberg, 2011). Para profundizar más en el efecto del SCF en la migración e invasión de la línea celular de cáncer de próstata, se decidió analizar la motilidad y capacidad de las células para degradar proteínas de MEC por medio de la cámara de Boyden recubierta con matrigel. El experimento se realizó por triplicado, las células se sembraron sobre la capa de Matrigel y se usó como quimiotáctico distintas concentraciones de SCF, finalmente a las 24 hrs se cuantificaron las células que lograron atravesar el inserto.

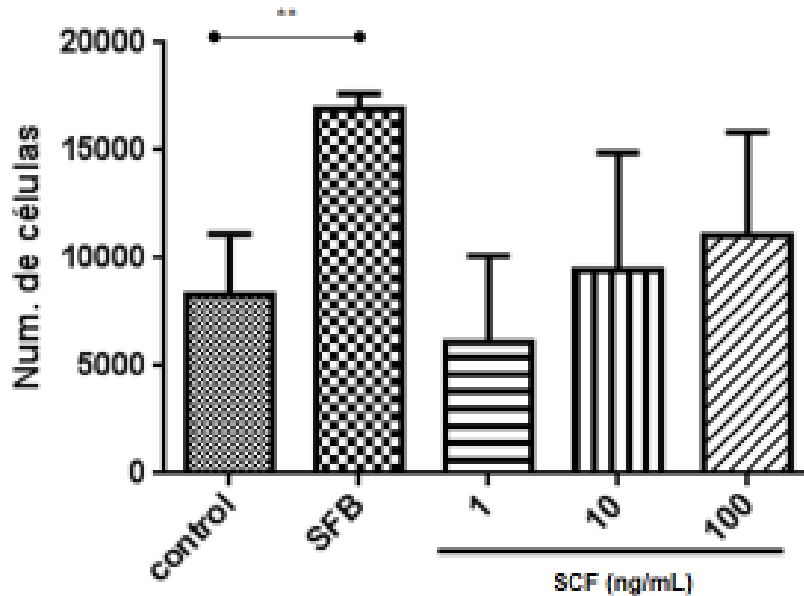


Figura 11. Efecto del SCF en la invasividad de células DU145. Se usaron concentraciones crecientes de SCF (1, 10 y 100 ng/ml). Los valores mostrados son la media de tres pruebas independientes por triplicado. Además de muestra una tabla con los porcentajes de células que atravesaron el inserto (** $p < 0.01$).

Como se muestra en la figura 11, las células DU145 en condiciones basales, es decir, en ausencia de estímulos exógenos, tienen baja capacidad intrínseca para atravesar el Matrigel. Sin embargo, en presencia de SFB (control positivo), el número de células capaces de atravesar la membrana cubierta Matrigel aumenta. Al recibir el estímulo con SCF se observa que hay una relación dosis-respuesta entre el número de células que traspasa la membrana y la concentración de SCF sin embargo no hay diferencia significativa respecto al control negativo. Aproximadamente el 3% de las células colocadas en el inserto expuesto SCF son capaces de degradar la MEC y atravesar la membrana de acuerdo a nuestro ensayo de invasividad y comparando con el porcentaje de células que DU145 que expresan a c-kit (3.68%) el resultado coincide con dicho número, se tomó como 100% las células sembradas en el inserto.

Determinación de la dosis letal 50 de Cisplatino

Como ya se mencionó, además de la capacidad invasiva y la formación de metástasis, otra de las principales causas de la mortalidad en el CaP es el bajo éxito de la quimioterapia (Kitayama e

Hirota, 2004; Siemens *et al.*, 2013; Foster *et al.*, 2018; Cardoso *et al.*, 2014), lo cual está relacionado con la resistencia a quimiofármacos como el Cisplatino (Timata y Momura, 2007; Kelland, 2007; Kitamya e Hirota, 2004). Por esta razón se determinó la dosis letal 50 (DL₅₀) del Cisplatino en células DU145, éstas se incubaron con dosis variables de dicho fármaco en un rango de 5-300µg/ml, lo cual se basó en lo reportado por Kojima y colaboradores (2008). Las DL₅₀ a 24 y 48 horas de tratamiento fueron de 60 µg/ml y 70 µg/ml, respectivamente.

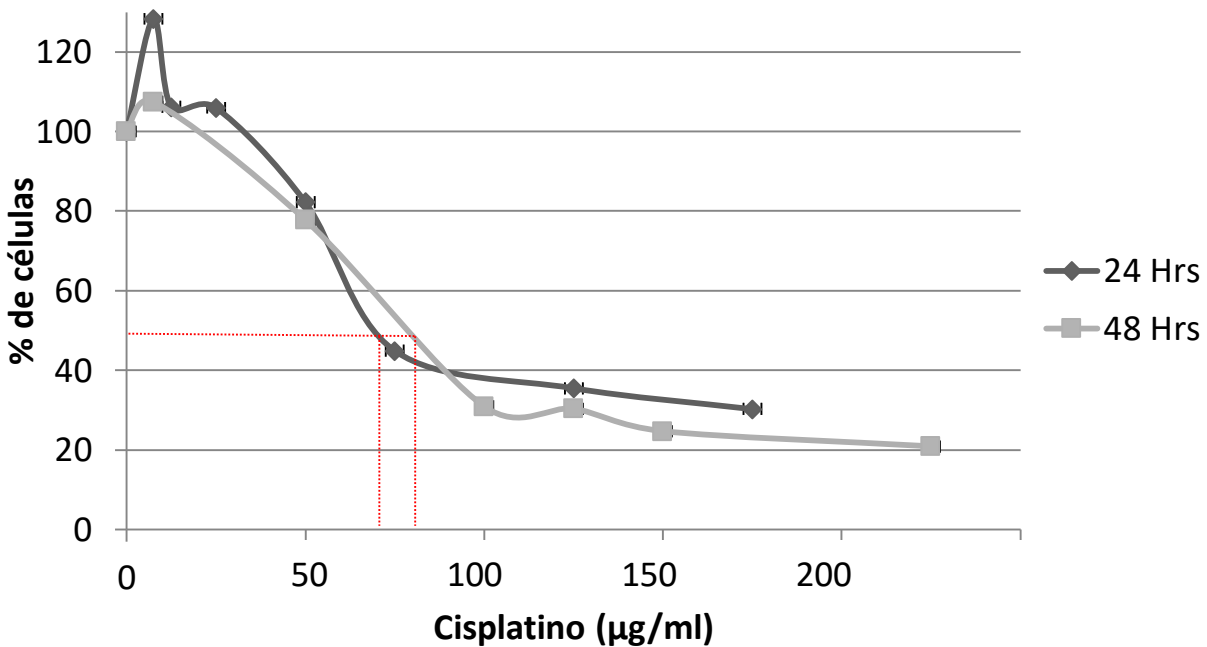


Figura 12. Determinación de la dosis letal 50 de Cisplatino en células DU145 a 24 y 48 hrs. En el eje de las abscisas encontramos el % de células que mueren por la exposición a Cisplatino, mientras que en las ordenadas la dosis en µg/ml, la DL₅₀ se calculó mediante la interpolación del 50% de muerte con la dosis de Cisplatino.

Es importante destacar que en algunas investigaciones se ha reportado que la línea celular DU145 es resistente a Cisplatino (Kojima, 2008; Akao, 2002; Akao 2006; Mizutani, 2006) y en este trabajo obtuvimos el mismo resultado ya que la DL50 determinada es alta.

Efecto del SCF y cisplatino

Para estudiar el efecto del SCF sobre la citotoxicidad de Cisplatino en las células DU145, éstas fueron tratadas durante 24 horas con distintas concentraciones de SCF (1,3,5 y 10 ng/ml) en combinación con la DL₅₀ de Cisplatino (200 µM) y posteriormente se determinó la viabilidad

celular. En la figura 13 se muestran los resultados en los cuales se observa que la adición de 1-10 ng/ml de SCF previene la muerte inducida por cisplatino.

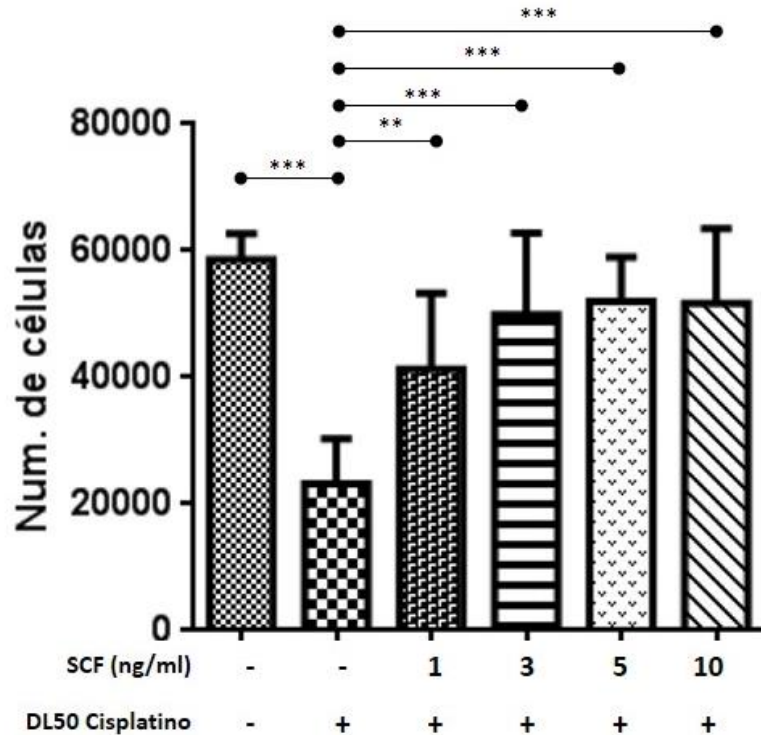


Figura 13. Efecto citotóxico del cisplatino en conjunto con la administración de SCF. En la gráfica se muestran los resultados de la viabilidad celular de células DU145 después de 24 horas de ser expuestas a la DL50 de Cisplatino en combinación con concentraciones crecientes de SCF (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Inhibición de c-kit con Imatinib.

Después de observar que el SCF provoca resistencia a cisplatino en células D145, se decidió analizar si estos efectos eran debidos a la activación de c-kit. Para abordar dicha idea se generaron tratamientos con Cisplatino, SCF e Imatinib, el cual es el inhibidor de RTKs que presenta mayor afinidad por c-kit (Iqbal e Iqbal, 2014; Al-Hadiva *et al.*, 2014). La DL₅₀ de Imatinib se usó de acuerdo a lo reportado por Cardoso y cols (2015). Como se puede observar en la figura 14, después de 24h de tratamiento con cisplatino e Imanitib presentan una reducción en el número de células de aproximadamente el 60%. También, se determinó que la estimulación con SCF previene de la

citotoxicidad del Cisplatino y del Imatinib. El co-tratamiento con Imatinib y Cisplatino, no mostró efectos aditivos, ni sinérgico. Interesantemente, el efecto citoprotector de SCF parece ser menor cuando las células son expuestas al cocktail Imatinib/cisplatino.

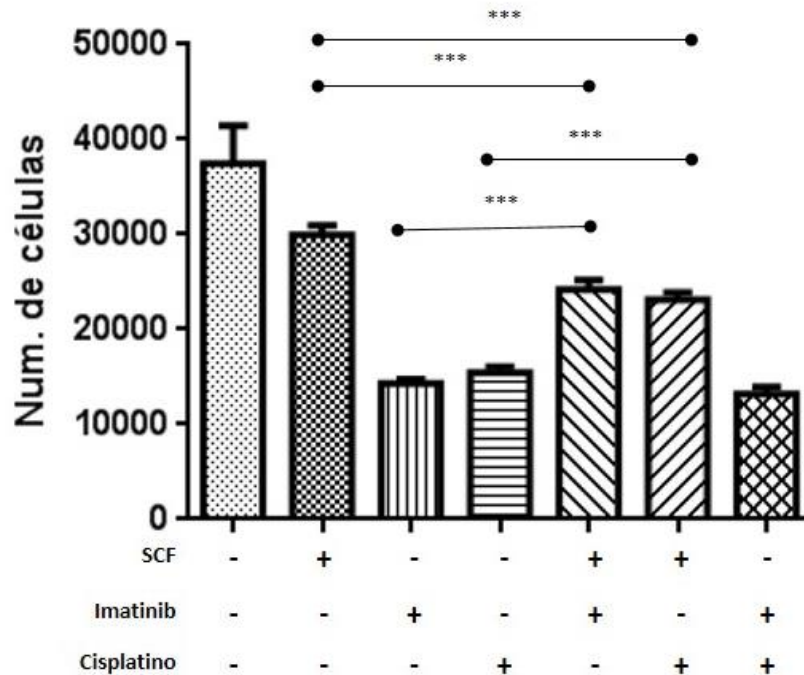


Figura 14. Efecto de la administración en conjunto de SCF, Imatinib y Cisplatino en células DU145. Los resultados mostrados corresponden a la media de 3 repeticiones de experimentos independientes y su desviación estándar (**p<0.001). La viabilidad celular se midió después de 24 horas de iniciado el experimento.

Estudio de la activación de c-kit y señalización

Luego de conocer que SCF induce la protección en las células DU145 ante el Cisplatino y el Imatinib, se evaluó la activación de c-kit y la fosforilación de distintas proteínas de las vías de señalización activadas río abajo del receptor tras la estimulación con SCF. Se determinaron los efectos en el estado de Akt y ERK ½ mediante Western blot.

En la figura 15 se observa un aumento en los niveles de la forma activa de c-kit después de tan sólo un 1 minuto de exposición a SCF, alcanzando un máximo a los 10 min, después de lo cual el efecto comienza a disminuir. Por otra parte, la forma activa de Akt presentó un incremento a 1 y 5 minutos de tratamiento con SCF, lo que sugiere que Akt es una de las cascadas de señalización de respuesta temprana a SCF. En Erk 1/2 observamos un comportamiento muy similar al de la forma fosforilada de p-ckit, sugiriendo que la cascada de señalización de ERK es altamente dependiente de c-kit en células D145 estimuladas con SCF.

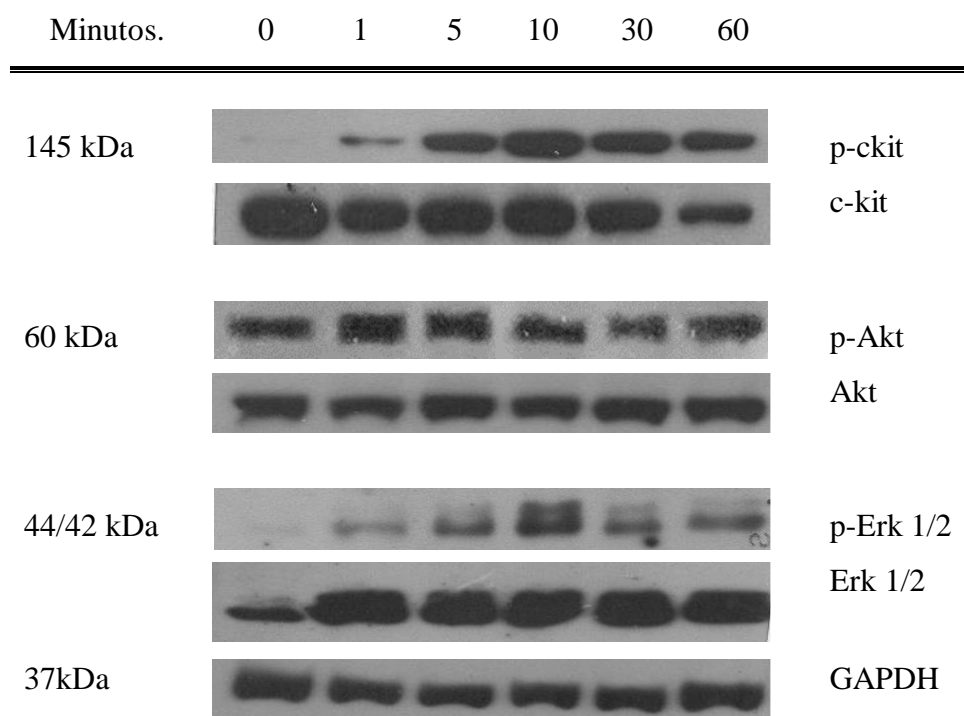


Figura 15. Determinación por Western blot de los niveles de activación del receptor c-kit (Y568, Y570), Akt (Ser 473) y Erk 1/2 (Thr202/Tyr204) en células DU145 a varios tiempos de la estimulación por SCF (5ng/ml). Se usó GAPDH como control de carga.

Discusión

La capacidad de las células cancerosas para invadir es crítica para la formación de metástasis y, por lo tanto, también para el resultado de cualquier opción de terapia contra el cáncer, como la quimioterapia. Las señales de interacción entre las células de cáncer y su microambiente determinan el fenotipo de los tumores. Las células del cáncer pueden alterar su estroma adyacente siendo capaz de modular la producción de factores de crecimiento para establecer un entorno propicio para la progresión tumoral (Zins *et al.*, 2007). En este trabajo se estudió el efecto de la activación de la ruta de SCF/c-Kit, que a menudo se sobreexpresa en tumores humanos, lo que lleva a un aumento de la tumorigénesis, la proliferación, la migración y la resistencia a quimiofármacos (Bellone *et al.*, 2001; Catalano *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2012; Duensing *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2011).

Para nuestro estudio se usaron células DU145 de metástasis de cáncer de próstata en cerebro, en las cuales la expresión de c-kit se da en un 3.68% de su población, sin embargo dicha expresión cambia al someter a las células a un medio no apto para el anclaje (Jiménez-Sánchez, 2014). Con esta premisa se procedió a realizar el cultivo en 3D y exponer las células al ligando de c-kit, el SCF. Se usó una concentración de 100ng/ml (dicha concentración fue añadida tomando en cuenta la difusión en el medio y el Matrigel) se observó que al exponer al cultivo con medio y SCF incrementó el número de esferoides en comparación al medio con SFB y SCF esto debido posiblemente a que SCF activó, a través de c-kit, vías de proliferación y supervivencia a la falta de nutrientes como PI3K/Akt y de las MAPKS. Además, al usar la técnica de cultivo en 3D podemos acercarnos más a las condiciones reales del medio ambiente de un tumor: hipoxia y falta de nutrientes, la supervivencia a éstas son condiciones importantes para que una célula tumoral sea capaz de formar metástasis en otros órganos que es uno de los objetivos de este trabajo. Para confirmar que en este tipo de cultivo la expresión de c-kit cambia, es necesario realizar un análisis cuantitativo ya sea por Western blot o citometría de flujo, también realizar el experimento en mayor escala para obtener proteína suficiente para la cuantificación, la extracción de las células en este medio es más compleja que en un cultivo 2D.

Otra característica de las células con potencial metastásico es la capacidad invasiva, la cual se evaluó *in vitro* por medio de cámaras de Boyden recubiertas con Matrigel, en este experimento los resultados no fueron estadísticamente significativos, sin embargo el porcentaje de células que logró atravesar el Matrigel y la membrana porosa coincide con el porcentaje que exprese c-kit en la población de células DU145 que es aproximadamente del 3%.

Se sabe que el SCF es una quimiotaxina y un factor de supervivencia para las células troncales/progenitoras de origen hematopoyético y células troncales del sistema nervioso (Erlandsson *et al.*, 2004), esto es relevante ya que el sitio de formación del 2% de los tumores metastásicos de cáncer de próstata es el cerebro (Bubendorf *et al.*, 2000) por lo que SCF podría estar funcionando como un quimioatrayente para las células metastásicas.

En cáncer, existen células con características fenotípicas y funcionales de células troncales, a las cuales se les denomina “células troncales tumorales” (CTT), representan una proporción muy pequeña de la masa tumoral y se les atribuyen características de invasividad y resistencia (Kong, 2010). Varios trabajos proponen que las células que expresan c-kit en el CaP podrían ser células troncales tumorales (Ceder, 2008; Li, 2008; Ma, 2012), para poder confirmar esta hipótesis se podría realizar por citometría de flujo el co-marcaje de las células con c-kit, CD44, CD133 o EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial) que son marcadores para células troncales (Zhong, 2013).

Considerando que la progresión metastásica del CaP ocurre principalmente en médula ósea y que el SCF es un factor de crecimiento ampliamente expresado en el microambiente medular (Lennartsaan, 2012). Se esperaba que la respuesta hacia el quimioatrayente fuera mayor, sin embargo coincide con la baja expresión detectada de c-kit, posiblemente las células capaces de atravesar el inserto sea células troncales tumorales.

Por otra parte Eberle *et al.* en 2016 demostraron que la inhibición del eje SCF/c-kit reduce la motilidad de células de cáncer de adenocarcinoma (CRL-5800, CRL-5826Y HTB-182) y células de cáncer de próstata (DU145) en cultivos 3D, además se observó que en cultivo 3D aumenta dicha motilidad, esto puede ser atribuido a un incremento en la transición epitelial-mesenquimal (EMT por sus siglas en inglés) (Kalluri y Weinberg, 2010) indicado por la expresión alterada de vimentina, N-caderina y E-caderina como un agonista.

En el presente trabajo, se descubrió que las células DU145 son altamente resistentes al Cisplatino, ya que se usaron concentraciones muy altas para lograr una DL₅₀ y conocer el efecto que SCF/c-kit tiene sobre las células expuestas al quimiofármaco. El efecto observado al estimular a las células con SCF es que aumenta la resistencia en un rango de concentraciones por abajo y por arriba de la concentración fisiológica (3.3 ng/ml) esto sugiere que la concentración fisiológica puede incrementar potencialmente la resistencia a Cisplatino de las células DU145y también en pacientes, por el bajo éxito de la quimioterapia en la clínica. Se ha reportado que células residuales de cáncer de ovario han sobrevivido 3 o 5 días al tratamiento con cisplatino (Latifi *et al.*, 2011; Baribeau *et al.*, 2014), como un posible mecanismo se propone la activación de la vía de señalización MAPK/ERK (Baribeau *et al.*, 2014) que también es activada por c-kit al unirse con su ligando. En otros estudios se observó que la resistencia a la apoptosis activada por c-kit es mediada por la vía PI3K/Akt en el linaje hematopoyético (Timokhina, 1998), SCF y c-kit es fuertemente expresado en el sistema nervioso central de adulto (Hiota 1992, Morii 1992) y que el SCF protege de la muerte a las neuronas de la corteza cerebral mediante la activación de Akt-NF-κB (Dhandapani 2005), esto es relevante ya que las células DU145 provienen de metástasis cerebral de cáncer de próstata (Stone, 1978). Akt se encuentra río abajo en la cascada de señalización PI3K e induce la sobrevivencia celular interfiriendo en el inicio de la apoptosis, fosforila Bad (Blume-Jensen, 1998), FOX (Brunet 1999) ,NF-κB (Dhadophani 2005). Se sabe que NF-κB activo ingresa al núcleo y regula por incremento la transcripción de Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, survivina y Akt, teniendo como consecuencia la evasión de la apoptosis. Sun y *et al.* encontraron que las células de cáncer de vejiga resistentes al cisplatino mostraron más agresividad, tumorigénesis rápida, resistencia a fármacos y EMT a través de la activación de NF-κB (Sun *et al.*, 2016). En 2016, Körber y su grupo de trabajo demostraron que la quimiorresistencia al 5-FU en estas células de cáncer de colon dependía en gran medida de la activación de NF-κB. Se encontró que la regulación a la baja del ADN-PKC suprimió la expresión de la P-gp para la quimiosensibilidad del cisplatino al debilitar la vía de Akt/NF-κB en células de osteosarcoma con CD133 positivo. Por lo tanto es necesario extender el experimento y analizar el mecanismo por el cual se está dando la resistencia, se propone que pueden ser 2, el primero la evasión de la apoptosis inducida por el cisplatino a través de la inhibición de proteínas pro-apoptóticas como Bcl-2 y Bax y la otra, bombas

de expulsión ABC, inducidas por la transcripción de genes blanco de los factores de transcripción TCF/LEF activados por translocación de β -catenina al núcleo.

Una vez confirmada la resistencia a Cisplatino por la estimulación con SCF, se procedió a inhibir a c-kit con Imatinib para observar si el efecto era debido a la activación del receptor, sin embargo, contrario a lo que se esperaba, dicho efecto no se observó. En cambio, el imatinib por si solo es capaz de disminuir la proliferación de las células DU145, pero al administrarlo junto con el Cisplatino no se observó un efecto aditivo o sinérgico, por lo tanto el tratamiento con ambos fármacos no tendría éxito en la clínica al menos en el tratamiento del CaP, porque existen reportes de la efectividad del tratamiento en leucemia, cáncer de ovario y cáncer endometrial (Wey *et al.*, 2015; Skorta *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014), sin embargo el tratamiento con Imatinib se propone como una estrategia terapéutica para poder disminuir los efectos secundarios que genera el Cisplatino.

Para profundizar más en los mecanismos de acción que se están llevando a cabo en las células DU145 tras la estimulación con SCF, analizamos algunas proteínas representativas de distintas vías de señalización para elucidar el mecanismo de acción que se está llevando a cabo en la célula, realizado por western blot tras la estimulación de las células por SCF. El primer resultado importante es que demostramos que el receptor c-kit se encuentra funcional (Figura 16), hay un incremento de su activación después de 5 min de estimulación y decae una hora después de iniciado el experimento. De igual manera se analizó Akt o PKB, una cinasa de la vía PI3K y que tiene múltiples proteínas blanco río abajo, también se analizó su forma activa (p-Akt, Ser 473), encontramos que Akt, al parecer, se encuentra activa de manera constitutiva, esta vía posiblemente sea independiente de la activación por c-kit, sin embargo no se analizó la otra fosforilación de Akt en la Thr 308, se sabe que para la activación completa de Akt se necesita de ambas fosforilaciones, además de que cada una proporciona distinta afinidad por sus proteínas blanco (Franke, 2008). Entre sus principales dianas se encuentra IKK α , una cinasa involucrada en la activación de NF- κ B. La fosforilación de IKK por Akt estabiliza la interacción entre el factor de transcripción y el ADN permitiendo la transcripción de sus genes responsivos entre los que se encuentran genes antiapoptóticos (Romashkova y Makarov, 1999) que como se mencionó puede estar funcionando como un mecanismo de resistencia a Cisplatino, ya que este induce la

apoptosis. Puede regular el metabolismo, mediante la inactivación de la cinasa 3 de la glucógeno sintasa (GSK-3 β) (Diehl *et al.*, 1998; Gregory *et al.*, 2003), y el ciclo celular, por la activación de Mdm2 que entra al núcleo disminuyendo los niveles de p53 (Oren, 2003; Feng *et al.*, 2004; Hannessy *et al.*, 2005), además fosforila a p21^{Cip}, un inhibidor de la unión Cdk-ciclina, esta fosforilación impide que p21^{Cip} se trasloque al núcleo y sea degradada en el citoplasma, por lo tanto promueve el ciclo celular (Pestell *et al.*, 1999; Zhou y Hung, 2005). Hay que destacar que la regulación del complejo 1 de la proteína blanco de Rapamicina en mamíferos (mTORC1) por Akt es importante para la proliferación celular y la supervivencia, mTORC1 controla la síntesis de numerosas proteínas implicadas en el ciclo celular progresión y el crecimiento celular (Nicholson y Anderson, 2002; Plas y Thompson, 2005; Los *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2010).

Por otra parte, una de las varias funciones de Akt es la inactivación de GSK-3 β , ésta forma parte del complejo de destrucción de β -catenina, se encarga de fosforilarla para su posterior degradación vía proteosoma, lo que evita su acumulación citoplasmática y translocación nuclear donde es un co-factor transcripcional de genes pro-carcinogénicos de la familia TCF/LEF entre los que se encuentran la ciclina D1, c-myc, entre otros. Mientras que en células de LNCaP de CaP, β -catenina se encuentra aumentada en citoplasma, por lo que es muy probable se estén expresando genes que promueven la supervivencia y resistencia a quimiofármacos (Fang *et al.*, 2016). En 2013 Chau *et al.* demostraron que en células progenitoras de cáncer de ovario, c-kit tiene un papel importante en la activación de la vía Wnt/ β -catenina y en la expresión del cassette de unión a ATP-G2 como mecanismo de expulsión de quimiofarmacos, por medio de bombas de transportadoras, así mismo descubrieron que las células sometidas a un microambiente hipoxico (1% O₂) tras la activación de HIF-1 α , aumenta la expresión de c-kit, además que elementos consenso de respuesta a HIF-1 α están dentro del promotor de c-kit. Esta es la primera demostración de que c-Kit es un gen blanco de la activación de HIF-1 α y la adición de HIF-1 α como un nuevo miembro del modulador transcripcional de c-Kit (Chau *et al.*, 2013). La hipoxia se considera un evento temprano en la carcinogénesis de la próstata asociada con un fenotipo agresivo. De hecho, clínicamente, la hipoxia y los biomarcadores relacionados con la hipoxia están asociados con el fracaso del tratamiento y la progresión de la enfermedad (Deep y Panigrahi, 2015). Dado que las células tumorales que forman metástasis están sometidas a condiciones de hipoxia es probable

que se HIF-1 α , este induciendo una sobreexpresión de c-kit como se observó en el trabajo de Jiménez- Sánchez, lo que no se pudo confirmar en este trabajo en células cultivadas en 3D, por lo tanto es necesario repetir los experimentos en 3D, recuperar las células y cuantificar la expresión de c-kit.

La segunda proteína analizada río abajo de c-kit fue ERK 1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase* por sus siglas en inglés) que forma parte de la vía de las MAPKs (Misra *et. al.*, 2002; Pandey *et. al.*, 2005). La determinación de la forma activa de ERK 1/2 muestra la activación paralela a la activación de c-kit, lo que demuestra que c-kit es capaz de activar dicha vía. ERK es el último elemento de la vía de las MAPKs y se sabe que está sobre activado en cáncer de próstata (Shen y Abate, 2010; Weber y Gioeli, 2004). Después de ser activada, se sabe que ERK1/2 activan muchos factores de transcripción, como ELK1, y las proteínas cinasas derivadas, que están estrechamente relacionadas con la proliferación celular, la apoptosis y la resistencia a los quimiofármacos. Se informó que la mutación de K-ras daba como resultado la quimiorresistencia de cáncer de pulmón a gefitinib, erlotinib o sunitinib (Liu *et al.*, 2015). N-Ras podría mejorar la adhesión de fibronectina y la quimiorresistencia de las células de mieloma (Hoang *et al.*, 2006). H-Ras medió la resistencia de las células de cáncer de ovario contra el cisplatino por la vía de señalización de Raf-1/ERK (Zhang *et al.*, 2014). Según se informa, la fosforilación de Caveolin-1 mediada por Src en Y14 era esencial para la activación de EGFR o su interacción con la integrina β 1 promovida por la homología de Src dependiente de Fyn y la fosforilación de ERK1/2, que estaba estrechamente relacionada con la quimiorresistencia (Hehlgans y Cordes, 2011). La vía de señalización ERK juega un papel en varios pasos del desarrollo tumoral (Kim y Choi, 2010). De hecho, algunos componentes de la vía Raf-MEK-ERK se activan en tumores sólidos (como el cáncer de próstata o de mama) y tumores malignos hematológicos (Rodríguez-Berriguete G. *et al.*, 2010; Grant, 2008). El aumento de las expresiones de la vía Raf se ha asociado con CaP avanzado, independencia hormonal, metástasis y un mal pronóstico (Keller *et al.*, 2004). Además, las líneas celulares de CaP aisladas de pacientes con cáncer avanzado (LNCaP, PC3, DU145) expresaron niveles bajos de inhibidores activos de la cinasa Raf (McCubrey *et al.*, 2007). TNF- α actúa como un activador ERK en algunos casos relacionados con la inflamación y la proliferación celular. De esta manera, Ricote y cols. (2006) mostró que la fosforilación de ERK se incrementó notablemente por TNF- α de

manera dosis-dependiente en células LNCaP. En CaP, la presencia de Raf-1 y MEK1 junto con los niveles elevados de ERK1 y ERK2 y sus formas fosforiladas, sugiere que IL-6 podría activar la estimulación de la proliferación celular a través de la vía ERK (Keller *et al.*, 2004). De hecho, la expresión de IL-6 aumentó en el CaP en comparación con el tejido normal (Keller *et al.*, 2004; Wegiel *et al.*, 2008). Además, las células LNCaP que producen IL-6 muestran una mayor proliferación, al menos en parte, debido a la activación de ERK (Karkera *et al.*, 2011). Recientemente, un ensayo clínico de fase I ha revelado la capacidad de un anticuerpo anti-IL-6 (siltuximab) para inhibir la fosforilación de ERK1/2 en tumores de próstata (Steiner *et al.*, 2003).

Gioeli y *et al.* (1999) demostraron que la activación de ERK está correlacionada con tumores malignos. Junttila *et al.* (Junttila MR., Li SP. y Westermarck J, 2008). demostró en el modelo de ratón TRAMP que la activación de ERK está relacionada con la proliferación epitelial prostática y el inicio del desarrollo del cáncer de próstata, mientras que la inactivación de ERK se correlaciona con la aparición de un fenotipo metastásico e independiente de andrógenos pobremente diferenciado. El ERK activado media la activación del receptor de andrógenos y/o la secreción de PSA a través del factor de crecimiento receptor tirosina quinasa, Her2/Neu (también conocido como erbB2) en células de cáncer de próstata independientes de andrógenos (Grossman *et al.*, 2001). Otro tema importante de esta vía en el desarrollo de tumores es que la fosforilación por ERK de proteínas como la miosina, la calpaína, la cinasa de adhesión focal y la paxilina promueve la migración de células cancerosas. Además, ERK puede promover la degradación de las proteínas de la matriz extracelular y la consiguiente invasión tumoral (Kim y Choi ,2010).

ERK también puede inducir la fosforilación de moléculas reguladoras apoptóticas, incluidos los miembros de la familia bcl-2 (p. Ej., Bad, Bim y controversialmente Bcl-2) y la caspasa 9 (Thakur *et al.* 2009). Hay pruebas que sugieren un efecto protector en las células mediante la activación de NF- κ B a través de ERK (Zhua *et al.*, 2004, Chu *et al.*, 2008). Tras la estimulación celular, NF- κ B se transloca al núcleo (Karin, 2006), donde promueve la expresión de varios genes antiapoptóticos, como los inhibidores de las proteínas de apoptosis (IAP) (Rodríguez-Berriguete *et al.*, 2010) y los miembros de la familia bcl-2 (Aggarwal, 2000).

Como se mencionó anteriormente, las CTTs son una subpoblación de células cancerosas y se caracterizan por la capacidad de formación de tumores, la autorenovación, la diferenciación múltiple, la resistencia a los medicamentos, el crecimiento y la recurrencia del cáncer, dos de las cuales fueron estudiadas en este trabajo. Se cree que estas células causan recaída y metástasis al dar lugar a nuevos tumores. Las CTTs se caracterizaron la resistencia a múltiples fármacos y la expresión de transportadores de casete de unión a ATP. Por lo tanto, se ha encontrado que estas células resisten la quimioterapia debido a la sobreexpresión de P-gp, ABC-G2, Bcl-2 y survivina lo cual se relaciona con lo discutido acerca de la vía Akt/ β -catenina. Encontraron que las células de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello resistentes al cisplatino, 5-FU o docetaxel mostraron la hiperexpresión de las proteínas marcadoras de células troncales (CD44, CD133, ALDH1-A1, NOTCH1, Oct4 y SOX2) y mostraron un aumento en la migración e invasión, crecimiento en esferoide, y formación de colonias, que se invirtió mediante la eliminación de ALDH1-A1 (Kulsum *et al.*, 2017). Según se informa, las células de cáncer colorrectal CD133⁺ tenían quimiorresistencia a 5-FU a través de survivina y expresión de ABC-G2 (Lee *et al.*, 2015), y la desactivación de ABCG2 inhibió la capacidad de auto renovación de estas células, y mejoró la apoptosis inducida por quimioterapia (Ma *et al.*, 2016). Por otra parte, encontraron que las células tratadas con 5-FU eran capaces de iniciar esferas y metastatizar, y los genes marcadores de células troncales sobreexpresados, Oct4 y Nanog (Izumiya *et al.*, 2012). Se observó que la morfina mejoraba la capacidad de formación de la mamósfera, la quimiorresistencia y la expresión de factores de transcripción relacionados con la potencia (Oct4, Sox2 y Nanog) de las células cancerosas mediante la activación de Wnt/ β -catenina (Niu *et al.*, 2015), lo que indica que se debe tener precaución al emplear morfina para aliviar el dolor del cáncer. Sin embargo, se demostró que el tratamiento con genisteína reduce la quimiorresistencia de las células gástricas cancerosas a 5-FU y cisplatino mediante la inhibición de la expresión de ABCG2 y la actividad de ERK 1/2 (Huang *et al.*, 2014).

Finalmente, en el presente trabajo se observó que las células DU145 son capaces de formar esferoides y aumentar su supervivencia al ser estimuladas con SCF. Además de que el SCF no funciona como quimiotaxina para estas células. Las células son resistentes a cisplatino y no aumenta la sensibilidad de este al administrar Imatinib conjuntamente. Es muy probable que la

resistencia al Cisplatino se deba a la inhibición de la apoptosis y la expresión de bombas transportadoras que expulsan al quimiofármaco, esto activado por proteínas río debajo de la activación de c-kit como Akt, Wnt/ β -catenina, MAPKs y NF- κ B.

Conclusiones

- En el presente trabajo se demostró que la activación de c-kit por su ligando SCF tiene efecto en la capacidad de supervivencia de las células DU145 en cultivo 3D.
- La estimulación con SCF no aumenta significativamente la capacidad invasiva de las células DU145.
- La activación de c-kit/SCF aumenta significativamente la supervivencia a la muerte inducida por Cisplatino Cisplatino.
- Se demostró la activación de ERK1/2 dependiente de c-kit y que Akt se encuentra activa de manera constitutiva.
- Se descubrió que las células DU145 son sensibles al Imatinib en dosis menores al Cisplatino, por lo que podría sugerirse como una opción al tratamiento de metástasis de CaP.

Perspectivas

- Con la finalidad de confirmar que la activación de c-kit participa en la resistencia a Cisplatino se realizara su inhibición con RNA de interferencia.
- Determinar el perfil de expresión de c-kit en células cultivadas en 3D, además de proteínas clave de las vías de señalización activadas por c-kit/SCF.

Referencias

Abbaspour Babaei M., Kamalidehghan B., Saleem M., Huri HZ., Ahmadipour F. (2016). Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 10:2443-59

Aggarwal BB. (2010). Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis.* 59 Suppl 1:i6-16.

Al-Hadiya BMH., Bakheit AHH., Abd-Elgalil AA. (2014). Imatinib mesylate. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* 39, 265–297.

Anderson DM., Williams DE., Tushinski R., Gimpel S., Eisenman J., Cannizzaro LA., Aronson M., Croce CM., Huebner K., Cosman D. (1991). Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. *Cell Growth Differ.* 2: 373–378.

Andersson J., Bümbling P., Meis-Kindblom JM., Sihto, H., Nupponen N., Joensuu H., Odén A., Gustavsson B., Kindblom LG., Nilsson B.(2006). Gastrointestinal stromal tumors with {KIT} exon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenterology* . 130, 1573–1581.

Andersson P., Von Euler M., Beckert M. (2014). Comparable pharmacokinetics of 85 mg RightSize nilotinib (XS003) and 150 mg Tasigna in healthy volunteers using a hybrid nanoparticle-based formulation platform for protein kinase inhibitors. *J. Clin. Oncol*, 32 (Suppl. S15),

Ashman LK (1999). The biology of stem cell factor and its receptor c-kit. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:1037–1051.

Ashman LK., Cambareri AC., To LB., Levinsky RJ., Juttner CA. (1991). Expression of the YB5. B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood.* 78:30–37

Ashman LK., Griffith R.(2013). Therapeutic targeting of c-KIT in cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* 22:103–115.

Balachandran VP., Cavnar MJ., Zeng S., Bamboat ZM., Ocuin LM., Obaid H., Sorenson EC., Popow R., Ariyan C. ,Rossi F. (2011). Imatinib potentiates antitumor {T} cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat. Med.* 17, 1094–1100

Bastide C., Bagnis C., Mannoni P., Hassoun J., Bladou F. (2002). A Nod Scid mouse model to study human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic.* 5: 311-315.

Beadling C., Jacobson-Dunlop E., Hodi FS., Le C., Warrick A., Patterson J., Town A., Harlow A., Cruz F., Azar S., Rubin BP., Muller S., West R., Heinrich MC., Corless CL. (2008). KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res.* 14 :6821–6828.

Bellamy F., Bader T., Moussy A., Hermine O. (2009). Pharmacokinetics of masitinib in cats. *Vet. Res. Commun.* 33, 831–837.

Bellesoeur A., Carton E., Alexandre J., Goldwasser F., Huillard O. (2017). Axitinib in the treatment of renal cell carcinoma: Design, development, and place in therapy. *Drug Des. Dev. Ther.* 11, 2801–2811.

Bellone G., Carbone A., Sibona N., Bosco O., Tibaudi D., Smirne C., Martone T., Gramigni C., Camandona M., Emanuelli G. y Rodeck U. (2001). Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer Res.* 61(5):2200-2206.

Bellone G., Silvestri S., Artusio E., Tibaudi D., Turletti A., Geuna M., Giachino C., Valente G., Emanuelli G., Rodeck U. (1997). Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF-beta 1. *J of cell physiol.* 172:1–11.

Benson DA., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers EW. (2013), GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36–D42.

Blechman JM., Lev S., Givol D., Yarden Y.(1993) Structure-function analyses of the kit receptor for the steel factor. *Stem Cells* 1993, 11 (Suppl. S2), 12–21.

Blume-Jensen P., Janknecht R., Hunter T. (1998). The kit receptor promotes cell survival via activation of PI3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol.* 8:779–785.

Bratt O. (2002). Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol.*168: 906-913.

Broudy VC. (1997). Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood.* 90: 1345–1364.

Broudy VC., Smith F., Lin N., Zsebo K., Egrie J., Bernstein I.(1992). Blasts from patients with acute myelogenous leukemia express functional receptors for stem cell factor. *Blood.* 80:60–67.

Bubendorf L., Schöpfer A., Wagner U., Sauter G., Moch H., Willi N., Gasser TC., Mihatsch MJ. (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol.* 31:578-83.

Burger K., den Bakker MA., Kros JM., de Bruin AM., Oosterhuis W., van den Ingh HFGM., van der Harst E., de Schipper HP., Wiemer EAC., Nooter K. (2005). Activating mutations in {c-KIT} and {PDGFR\$ \$} are exclusively found in gastrointestinal stromal tumors and not in other tumors overexpressing these imatinib mesylate target genes. *Cancer Biol. Ther.* 4, 1270–1274.

Burgos-Ojeda D., Rueda BR., Buckanovich RJ. (2012). Ovarian cancer stem cell markers: Prognostic and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 322, 1–7.

Cai J., Wang J., Huang Y., Wu H., Xia T., Xiao J., Chen X., Li H., Qiu Y., Wang Y., Wang T., Xia H., Zhang Q., (2016). ERK/ Drp1-dependent mitochondrial fission is involved in the MSC-induced drug resistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Dis.* 2016; 7:e2459.

Campbell JP., Merkel AR., Masood-Campbell SK., Eleftheriou F., Sterling JA. (2012). Models of bone metastasis. *J Vis Exp.* 67:e4260.

Cancer Research UK. Cancer risk. 2011. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/incidence/risk/>(accessed Nov 1, 2016).

- Cardoso HJ., Figueira MI., Correia S., Vaz CV., Socorro S. (2014). The SCF/c-KIT system in the male: Survival strategies in fertility and cancer. *Mol Reprod Dev.* 81:1064-79.
- Cardoso HJ., Figueira MI., Socorro S. (2017) The stem cell factor (SCF)/c-KIT signalling in testis and prostate cancer. *J. Cell Commun. Signal.*, 1–11
- Carter BS., Beaty TH., Steinberg GD., Childs B., Walsh PC. (1992). Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3367-71
- Caruana G., Cambareri AC., Ashman LK. (1999) Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 Fibroblasts. *Oncogene*, 18, 5573–5581
- Carvajal RD. (2013). Another option in our {KIT} of effective therapies for advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* 31, 3173–3175
- Catalano A., Rodilossi S., Rippo MR., Caprari P., Procopio A. (2004). Induction of stem cell factor/c-Kit/slug signal transduction in multidrug-resistant malignant mesothelioma cells. *J Biol Chem.* 279(45):46706-46714
- Catalona WJ., Richie JP., Ahmann FR., Hudson MA., Scardino PT., Flanigan RC., de Kernion JB., Ratliff TL., Kavoussi LR., Dalkin BL. (1994). 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.* 151:1283-90.
- Cerami E., Gao J., Dogrusoz U., Gross BE., Sumer SO., Aksoy BA., Jacobsen A., Byrne CJ., Heuer ML., Larsson E. (2012). The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2, 401–404.
- Chan EC., Bai Y., Bandara G., Simakova O., Brittain E., Scott L., Dyer KD., Klion AD., Maric I., Gilfillan A. (2013). KIT GNNK splice variants: Expression in systemic mastocytosis and influence on the activating potential of the D816V mutation in mast cells. *Exp. Hematol.*, 41, 870–881.
- Chau WK., Ip CK., Mak AS., Lai HC., Wong AS. (2013). c-Kit mediates chemoresistance and tumor-initiating capacity of ovarian cancer cells through activation of Wnt/ β -catenin-ATP-binding cassette G2 signaling. *Oncogene.*; 32(22):2767-81.
- Chen Y., Tortorici MA, Garrett M, Hee B, Klamerus KJ, Pithavala YK (2013). Clinical Pharmacology of Axitinib. *Clin. Pharmacokinet.* 52, 713–725.
- Chen ZY., Chen H., Qiu T., Weng XD., Guo J., Wang L., Liu. XH (2016). Effects of cisplatin on the LSD1-mediated invasion and metastasis of prostate cancer cells. *Mol Med Rep.* 14(3):2511-7.
- Choudhury A., Zhao H., Jalali F., Al Rashid Ran S., Supiot J., Kiltie S., Bristow AE. (2009). Targeting homologous recombination using imatinib results in enhanced tumor cell chemosensitivity and radiosensitivity. *Mol Cancer Ther*; 8(1):203–213.

Chu LF., Wang WT., Ghanta VK., Lin CH., Chiang YY., Hsueh CM. (2008). Ischemic brain cell-derived conditioned medium protects astrocytes against ischemia through GDNF/ERK/NF- κ B signaling pathway. *Brain Res.* 6;1239:24-35.

Chugh R., Wathen JK., Patel SR., Maki RG., Meyers PA., Schuetze SM., Priebat DA., Thomas DG., Jacobson JA., Samuels BL. (2010). Efficacy of imatinib in aggressive fibromatosis: Results of a phase II multicenter Sarcoma Alliance for Research through Collaboration (SARC) trial. *Clin. Cancer Res.* 16, 4884–4891.

Costa EC., Moreira AF., de Melo-Diogo D., Gaspar VM., Carvalho MP., Correia IJ. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv.*

Crosier PS., Ricciardi ST., Hall LR., Vitas MR., Clark SC., Crosier KE. (1993), Expression of Isoforms of the Human Receptor Tyrosine Kinase c-kit in Leukemic Cell Lines and Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 82, 1151–1158.

Cunningham D., You Z. (2015). In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods.* 2: 1-14.

D'Amato G., Steinert DM., McAuliffe JC., Trent JC. (2005). Update on the biology and therapy of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Control.* 12:44–56.

DaSilva N., Hu Z., Ma W., Rosnet O., Birnbaum D., Drexler H. (1994). Expression of the FLT3 gene in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia.* 8:885–888.

Deepa G. y Panigraha K. (2015). Hypoxia-Induced Signaling Promotes Prostate Cancer Progression: Exosomes Role as Messenger of Hypoxic Response in Tumor Microenvironment. *Crit Rev Oncog.* 20(5-6): 419–434.

Demetri GD., Heinrich MC., Fletcher JA., Fletcher CDM., den Abbeele AD., Corless CL., Antonescu CR., George S., Morgan JA., Chen MH. (2009). Molecular target modulation, imaging, and clinical evaluation of gastrointestinal stromal tumor patients treated with sunitinib malate after imatinib failure. *Clin. Cancer Res.* 15, 5902–5909.

Demetri GD., Reichardt P., Kang YK., Blay JY., Rutkowski P., Gelderblom H., Hohenberger P., Leahy M., von Mehren M., Joensuu H. (2013). Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 381, 295–302.

Demetri GD., van Oosterom AT., Garrett CR., Blackstein ME., Shah MH., Verweij J., McArthur G., Judson IR., Heinrich MC., Morgan JA. (2006). Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: A randomised controlled trial. *Lancet*, 368, 1329–1338.

Deng Y., Sychterz C., Suttle AB., Dar MM., Bershas D., Negash K., Qian Y., Chen EP., Gorycki PD., Ho MYK. (2013). Bioavailability, metabolism and disposition of oral pazopanib in patients with advanced cancer. *Xenobiotica*, 43, 443–453.

Di Gion P., Kanefendt F., Lindauer A., Scheffler M., Doroshenko O., Fuhr U., Wolf J., Jaehde U. (2011). Clinical Pharmacokinetics of Tyrosine Kinase Inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 50, 551–603.

Diehl JA., Cheng M., Roussel MF., Sherr CJ. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis Cell Growth Difference and subcellular localization. *Genes Dev.* 12:3499-3511.

Drugbank Database. Available online: <https://www.drugbank.ca/> (acceso 10 de octubre del 2018).

Dubreuil P., Letard S., Ciufolini M., Gros L., Humbert M., Castéran N., Borge L., Hajem B., Lermet A., Sippl W. (2009). Masitinib (AB1010), a Potent and Selective Tyrosine Kinase Inhibitor Targeting KIT. *PLoS ONE* 4, e7258.

Duensing A., Medeiros F., McConarty B., Joseph NE., Panigrahy D., Singer S., Fletcher CD., Demetri GD., Fletcher JA. (2004). Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene.* 23(22):3999-4006.

Duronio V., Welham MJ., Abraham S., Dryden P., Schrader JW. (1992). p21 ras activation via hemopoietin receptors and c-kit requires tyrosine kinase activity but not tyrosine phosphorylation of p21 ras (GTPase-activating) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1587–1591.

Edge SB., Byrd DR., Compton CC. (2010). Prostate AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY:, 457-68.

Edris B., Willingham SB., Weiskopf K., Volkmer AK., Volkmer JP., Mühlenberg T., Montgomery KD., Contreras-Trujillo H., Czechowicz A., Fletcher JA. (2013). {Anti-KIT} monoclonal antibody inhibits imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3501–3506.

Erlandsson A., Larsson J., Forsberg-Nilsson K. (2004) Stem cell factor is a chemoattractant and a survival factor for CNS stem cells. *Exp Cell Res.* 10; 301(2), 201-210.

Fang F., Qin Y., Hao F., Li Q., Zhang W., Zhao C., Chen S., Zhao L., Wang L., Cai J. (2016). CD147 modulates androgen receptor activity through the Akt/Gsk-3 β / β -catenin/AR pathway in prostate cancer cells. *Oncol Lett.* 2:1124-1128.

Feng JH., Tamaskovic R., Yang ZZ., Brazil DP., Merlo A., Hess D., Hemmings BA. (2004). Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.* 279:35510–35517.

Fidler IJ. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited . *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.

Florea AM. y Büsselberg D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)* 3: 1351-1371.

Foster BM., Zaidi D., Young TR., Mobley ME., Kerr BA. (2018). CD117/c-kit in Cancer Stem Cell-Mediated Progression and Therapeutic Resistance. *Biomedicines.* 8;6(1).

- Franke TF. (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene*. 27:6473-6488.
- Gajiwala KS., Wu JC., Christensen J., Deshmukh GD., Diehl W., DiNitto JP., English JM., Greig MJ., He YA., Jacques SL. (2009). KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1542–1547.
- Galanis A., Levis M.(2015). Inhibition of c-Kit by tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica* 100, e77-9.
- Gangadhara S., Smith C., Barrett-Lee , Hiscox S. (2016). 3D culture of Her2+ breast cancer cells promotes AKT to MAPK switching and a loss of therapeutic response. *BMC CancerJun.* 16:345.
- Gao J., Aksoy BA., Dogrusoz U., Dresdner G., Gross B., Sumer SO., Sun Y., Jacobsen A., Sinha R., Larsson E. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* 6, p11.
- Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF Jr, Weber MJ. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res.* 59(2):279-84.
- Gommerman JL., Sittaro D., Klebasz NZ., Williams DA., Berger SA. (2000). Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood* 96, 3734–3742.
- Grant S. (2008). Cotargeting survival signaling pathways in cancer. *J Clin Invest.* 118(9):3003-6.
- Gregory MA., Qi Y., Hann SR. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem.* 278:51606-51612
- Gronberg H., Damber L., Damber JE. (1996). Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer.* 77:138-43.
- Grossmann ME., Huang H, Tindall DJ.(2001), Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 93(22):1687-97.
- Gumulec J., Balvan J., Sztalmachova M., Raudenska M., Dvorakova V., Knopfova L., Polanska H., Hudcova K., Ruttkay-Nedecky B., Babula P.(2014) Cisplatin-resistant prostate cancer model: Differences in antioxidant system, apoptosis and cell cycle. *Int J Oncol* 44: 923-933, 2014. 16.
- Gupta GP. y Massague J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* .127:679–695.
- Halsey CH., Gustafson DL., Rose BJ., Wolf-Ringwall A., Burnett RC., Duval DL., Avery AC., Thamm DH. (2014). Development of an in vitro model of acquired resistance to toceranib phosphate (Palladia®) in canine mast cell tumor. *BMC Vet. Res.* 10, 105.
- Hehlhans S. y Cordes N. (2011). Caveolin-1: an essential modulator of cancer cell radio-and chemoresistance. *Am J Cancer Res.* 1:521–530.

Heidenreich, et al. Guía clínica sobre el cáncer de próstata. European Association of Urology 2010, 182-184.

Heinrich MC., Blanke CD., Druker BJ., Corless CL. (2002). Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol.* 20:1692–1703.

Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y., Hashimoto K., Nishida T., Ishiguro S., Kawano K., Hanada M., Kurata A., Takeda M., Muhammad Tunio G., Matsuzawa Y., Kanakura Y., Shinomura Y., Kitamura Y. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 279:577–580.

Hoang B., Zhu L., Shi Y., Frost P., Yan H., Sharma S., Sharma S., Goodglick L., Dubinett S., Lichtenstein A. (2006). Oncogenic RAS mutations in myeloma cells selectively induce cox2 expression, which participates in enhanced adhesion to fibronectin and chemoresistance. *Blood.* 107:4484–4490

Hoei-Hansen CE., Kraggerud SM., Abeler VM., Kærn J., Rajpert-De Meyts E., Lothe RA. (2007). Ovarian dysgerminomas are characterised by frequent KIT mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Mol Cancer.* 6:12.

Hou YY., Grabelus F., Weber F., Zhou Y., Tan YS., Li J., Shen KT., Qin J., Sun YH., Qin XY. (2009). Impact of (KIT) and (PDGFRA) gene mutations on prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors after complete primary tumor resection. *J. Gastrointest. Surg.* 13, 1583–1592.

Hsu Y., Wu G., Mendiaz EA., Syed R., Wypych J., Toso R., Mann MB., Boone TC., Narhi LO., Lu HS. (1997) The Majority of Stem Cell Factor Exists as Monomer under Physiological Conditions. *J. Biol. Chem.* 272, 6406–6415.

Hu S., Niu H., Minkin P., Orwick S., Shimada A., Inaba H., Dahl GVH., Rubnitz J., Baker SD. (2008). Comparison of antitumor effects of multitargeted tyrosine kinase inhibitors in acute myelogenous leukemia. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1110–1120.

Hu ZB., Ma W., Uphoff C., Quentmeier H., Drexler H. (1994). c-kit expression in human megakaryoblastic leukemia cell lines. *Blood.* 83: 2133–2144.

Huang DY., Chao Y., Tai MH., Yu YH., Lin WW. (2012). STI571 reduces TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells: c-Abl activation by the death receptor leads to stress kinase-dependent cell death. *J Biomed Sci.* 19:35.

Huang S., Luca M., Gutman M., McConkey DJ., Langley KE., Lyman SD., Bar-Eli M. (1996). Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene.* 13:2339–2347.

Huang W., Wan C., Luo Q., Huang Z., Luo Q. (2005). Genistein inhibited cancer stem cell-like properties and reduced chemoresistance of gastric cancer. *Int J Mol Sci.* 15:3432–3443.

Huang WC., Chen CC. (2005). Akt-phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity. *Mol Cell Biol.* 25:6592–6602.

Huizinga JD., Thuneberg L., Kluppel M., Malysz J., Mikkelsen HB., Bernstein A. (1995). W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*. 373:347–349.

Huo L., Sugimura J., Tretiakova MS. (2005). c-kit expression in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas. *Hum Pathol*. 2005; 36:262–268.

Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tarui S, Griffin JD (1991). Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood*. 78:2962–2968.

Iqbal N, Iqbal N (2014). Imatinib: A breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother. Res. Pract.* 2014, 357027

Izumiya M, Kabashima A, Higuchi H, Igarashi T, Sakai G, Iizuka H, Nakamura S, Adachi M, Hamamoto Y, Funakoshi S, Takaishi H, Hibi T (2012). Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res*. 32:3847–3853.

Jiménez-Sánchez A. (2014). Evaluación del efecto del Stem Cell Factor en el potencial metastásico de células de cáncer de próstata. Tesis para obtener el grado de licenciado en Investigación Biomédica Básica. UNAM.

Jin K., Mao XO., Sun Y., Xie L., Greenberg DA. (2002). Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 110:311–319.

Joensuu H., Roberts PJ., Sarlomo-Rikala M., Andersson LC., Tervahartiala P., Tuveson D., Silberman SL., Capdeville R., Dimitrijevic S., Druker B. (2001) Effect of the Tyrosine Kinase Inhibitor {STI571} in a Patient with a Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor. *N. Engl. J. Med*. 344, 1052–1056.

Jouvard C., Galy-Fauroux I., Grelac F., Carpentier W., Lokajczyk A., Gandrille S, Collic-Jouault S, Fischer AM, Helley D. (2015). Low-Molecular-Weight Fucoïdan Induces Endothelial Cell Migration via the PI3K/AKT Pathway and Modulates the Transcription of Genes Involved in Angiogenesis. *Drugs*. 13, 7446–7462.

Junttila MR., Li SP. y Westermarck J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*. 22(4): 954-65.

Juurikivi A., Sandler C., Lindstedt KA., Kovanen PT., Juutilainen T., Leskinen MJ., Mäki T., Eklund KK. (2005). Inhibition of c-kit tyrosine kinase by imatinib mesylate induces apoptosis in mast cells in rheumatoid synovia: A potential approach to the treatment of arthritis. *Ann. Rheum. Dis*. 64, 1126–1131.

Kaighn ME., Narayan KS., Ohnuki Y., Lechner JF., Jones LW. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*. 17: 16-23.

Kalluri R. y Weinberg RA. (2010). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 3; 120(5):1786.

Kantarjian HM., Hochhaus A., Saglio G., De Souza C., Flinn IW., Stenke L., Goh YT., Rosti G., Nakamae H., Gallagher NJ. (2011). Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised {ENESTnd} trial. *Lancet Oncol.* 12, 841–851.

Karkera J., Steiner H, Li W, Skradski V, Moser PL, Riethdorf S, Reddy M, Puchalski T, Safer K, Prabhakar U, Pantel K, Qi M, Culig Z. (2011). The anti-interleukin-6 antibody siltuximab down-regulates genes implicated in tumorigenesis in prostate cancer patients from a phase I study. *Prostate.* 71(13):1455-65.

Ke H., Kazi JU., Zhao H., Sun J. (2016). Germline mutations of KIT in gastrointestinal stromal tumor (GIST) and mastocytosis. *Cell Biosci.* 6.

Kelland L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 7(8):573-84.

Keller ET., Fu Z., Yeung K., Brennan M. (2004). Raf kinase inhibitor protein: a prostate cancer metastasis suppressor gene. *Cancer Lett.* 207(2):131-7.

Kelly LM., Gilliland DG. (2002). Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 3:179–198.

Kerr BA., Miocinovic R., Smith AK., West XZ., Watts KE., Alzayed AW., Klink JC., Mir MC., Sturey T., Hansel DEI. (2015). CD117+ cells in the circulation are predictive of advanced prostate cancer. *Oncotarget,* 6, 1889–1897.

Keshet E., Lyman S., Williams D. (1991). Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J.* 10:2425.

Kim EK. y Choi EJ. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1802(4):396-405.

Kim EK. Y Choi EJ. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1802(4):396-405.

Kimura Y., Inoue K., Abe M., Nearman J., Baranowska-Kortylewicz J. (2007). PDGFRbeta and HIF-1alpha inhibition with imatinib and radioimmunotherapy of experimental prostate cancer. *Cancer Biol Ther;* 6(11):1763–1772.

Kimura Y., Jones N., Klüppel M., Hirashima M., Tachibana K., Cohn JB., Wrana JL., Pawson T., Bernstein A. (2004). Targeted mutations of the juxtamembrane tyrosines in the Kit receptor tyrosine kinase selectively affect multiple cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:6015–6020.

Kissel H., Timokhina I., Hardy MP., Rothschild G., Tajima Y., Soares V., Angeles M., Whitlow SR., Manova K., Besmer P. (2000). Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J.* 19:1312–1326.

KIT GenBank Page. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3815> (acceso 26 Febrero 2018).

Kitamura Y, e Hirota S. (2004). Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2924–2931.

Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Oritani K, Ikeda H, Sugahara H, Mitsui H, Kanayama Y, Kitamura Y (1995). Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood.* 85:790–798.

Koch CA, Gimm O, Vortmeyer AO, Al-Ali HK, Lamesch P, Ott R, Kluge R, Bierbach U, Tannapfel A (2006). Does the expression of c-kit (CD117) in neuroendocrine tumors represent a target for therapy? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1073, 517–526.

Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE (2004). The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer.* 4:519-27.

Körber MI, Staribacher A, Ratzenböck I, Steger G, Mader RM (2016). NFκB-Associated Pathways in Progression of Chemoresistance to 5-Fluorouracil in an In Vitro Model of Colonic Carcinoma. *Anticancer Res.* 36:1631–1639

Kosemehmetoglu K, Kaygusuz G, Fritchie K, Aydin O, Yapicier O, Coskun O, Karatayli E, Boyacigil S, Guler G, Dervisoglu S (2017). Clinical and pathological characteristics of gastrointestinal stromal tumor (GIST) metastatic to bone. *Virchows Arch.* 471, 77–90.

Kostoula V, Khan K, Savage K, Stubbs M, Quaglia A, Dhillon A, Hochhauser D, Caplin M (2005). Expression of c-kit (CD117) in neuroendocrine tumours—A target for therapy? *Oncol. Rep.* 13, 643–647.

Kuang D, Zhao X, Xiao G, Ni J, Feng Y, Wu R, Wang G (2008). Stem cell factor/c-kit signaling mediated cardiac stem cell migration via activation of p38 MAPK. *Basic Res. Cardiol.* 103, 265–273.

Kubler HR, van Randenborgh H, Treiber U, Wutzler S, Battistel C, Lehmer A, Wagenpfeil S, Hartung R, Paul R (2005). In vitro cytotoxic effects of imatinib in combination with anticancer drugs in human prostate cancer cell lines. *Prostate;* 63(4):385–394.

Kulsum S, Sudheendra HV, Pandian R, Ravindra DR, Siddappa G, R N, Chevour P, Ramachandran B, Sagar M, Jayaprakash A, Mehta A, Kekatpure V, Hedne N, (2017). Cancer stem cell mediated acquired chemoresistance in head and neck cancer can be abrogated by aldehyde dehydrogenase 1A1 inhibition. *Mol Carcinog.;* 56:694–711.

Lam L, Chow R, Berger S (1999). A transforming mutation enhances the activity of the c-Kit soluble tyrosine kinase domain. *Biochem J.* 338:131–138.

Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ (2007). Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods.* 4:359–65.

Lee MR, Ji SY, Mia-Jan K, Cho MY (2015). Chemoresistance of CD133 (+) colon cancer may be related with increased survivin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 463:229–234.

Lennartsson J y Rönstrand L (2006). The stem cell factor receptor/c-Kit as a drug target in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 6:65–75.

Lennartsson J y Rönstrand L (2012). Stem cell factor receptor/c-kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* .92: 1619–1649.

Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R (2005). Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells*. 23:16–43.

Lennartsson J, Wernstedt C, Engström U, Hellman U, Rönstrand L (2003). Identification of Tyr900 in the kinase domain of c-Kit as a Src-dependent phosphorylation site mediating interaction with c-Crk. *Exp. Cell Res*. 288, 110–118.

Leone Roberti Maggiore U, Valenzano Menada M, Venturini PL, Ferrero S (2013). The potential of sunitinib as a therapy in ovarian cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 22, 1671–1686.

Lev S, Blechman JM, Givol D, Yarden Y (1994). Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lessons in signal transduction. *Crit Rev Oncog*. 5:141–168.

Li B, Zhang G, Li R, Duan C (2015). Phosphoinositide 3-kinase/Akt Pathway Mediates Fip1-like1-platelet-derived Growth Factor Receptor α -induced Cell Infiltration and Activation: Possible Molecular Mechanism for the Malignant Phenotype of Chronic Eosinophilic Leukemia. *Cancer Transl. Med*. 1,31.

Li K, Li X, Tian J, Wang H, Pan J, Li J(2016). Downregulation of DNA-PKcs suppresses P-gp expression via inhibition of the Akt/NF- κ B pathway in CD133-positive osteosarcoma MG-63 cells. *Oncol Rep*. 36:1973–1980.

Liang J, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H (2013). The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int J Biol Sci*. 9:435-43.

Linnekin D (1999). Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 31, 1053–1074.

Linnekin D, DeBerry CS, Mou S (1997). Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J. Biol. Chem*. 272, 27450–27455.

Liu QH, Shi ML, Sun C, Bai J, Zheng JN (2015). Role of the ERK1/2 pathway in tumor chemoresistance and tumor therapy. *Bioorg Med Chem Lett*.; 25:192–197

Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y (2001). Classes of c-KIT activating mutations: Proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk. Res*. 25, 571–576.

Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. (2001), Classes of c-KIT activating mutations: Proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk. Res*. 25, 571–576

Los M, Maddika S, Erb B, Schulze-Osthoff K (2009). Switching Akt: from survival signaling to deadly response. *Bioessays*. 31:492–495.

Loveland K y Schlatt S (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *J Endocrinol.* 153:337–344.

Luo H, Quan H, Xie C, Xu Y, Fu L, Lou L (2010). HH-GV-678, a novel selective inhibitor of Bcr-Abl, outperforms imatinib and effectively overrides imatinib resistance. *Leukemia* 24, 1807–1809.

Luo L, Zeng J, Liang B, Zhao Z, Sun L, Cao D, Yang J y Shen K (2011). Ovarian cancer cells with the CD117 phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome. *Exp Mol Pathol.*; 91(2):596–602.

Luo L, Zeng J, Liang B, Zhao Z, Sun L, Cao D, Yang J, Shen K (2011). Ovarian cancer cells with the (CD117) phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome. *Exp. Mol. Pathol.* 91, 596–602.

Lyford G, He C, Soffer E, Hull TL, Strong SA, Senagore AJ, Burgart LJ, Young-Fadok T, Szurszewski JH, Farrugia G (2002). Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Gut.* 51:496–501.

Lyman SD y Jacobsen SEW (1998). c-Kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood.* 91: 1101–1134.

Ma L, Liu T, Jin Y, Wei J, Yang Y, Zhang H (2016). ABCG2 is required for self-renewal and chemoresistance of CD133- positive human colorectal cancer cells. *Tumour Biol.* 37:12889–12896.

Mackenzie MA, Jordan SA, Budd PS, Jackson IJ (1997). Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev Biol.* 192:99–107.

Mainetti LE, Zhe X, Diedrich J, Saliganan AD, Cho WJ, Cher ML, Heath E, Fridman R, Kim HR, Bonfil RD (2015). Bone-induced c-kit expression in prostate cancer: a driver of intraosseous tumor growth. *Int J Cancer.* 136:11-20.

Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA (1990). Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell.* 63: 203–211.

Masitinib (Also Known as Kinavet® and Masivet®)—MSAA: The Multiple Sclerosis Association of America. Available online: <https://mymsaa.org/publications/msresearch-update-2017/>

McCubrey JA., Steelman LS., Chappell WH., Abrams SL., Wong EW., Chang F., Lehmann B., Terrian DM., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli AM., Franklin RA. (2008). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 1773(8):1263-84.

Medinger M, Kleinschmidt M, Mross K, Wehmeyer B, Unger C, Schaefer HEE, Weber R, Azemar M (2010). c-kit (CD117) expression in human tumors and its prognostic value: An immunohistochemical analysis. *Pathol. Oncol. Res.* 16, 295–301.

Mickey DD, Stone KR, Wunderli H, Mickey GH, Vollmer RT, Paulson DF (1977). Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res.* 37: 4049-4058.

Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G y Reeves WB (2010). Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel).* 2: 2490-2518.

Misra P, Owuor ED, Li W, Yu S, Qi C, Meyer K (2002). Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. *J BiolChem.* 277:48745–54.

Moriyama Y, Tsujimura T, Hashimoto K, Morimoto M, Kitayama H, Matsuzawa, Kitamura Y, Kanakura Y (1996). Role of aspartic acid 814 in the function and expression of c-kit receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 271:3347–3350.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16; 65.

Moub S, Deberry CS, Weiler SR, Kellerb JR, Rusce FW, Longo DL (1997). Stem Cell Factor, the JAK-STAT Pathway and Signal Transduction. *Leuk. Lymphoma.* 27, 439–444.

Natile G y Coluccia M (2001). Current status of trans-platinum compounds in cancer therapy. *Coord Chem Rev* 216: 383-410.

Nicholson KM, Anderson NG (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 14:381-395.

Niu DG, Peng F, Zhang W, Guan Z, Zhao HD, Li JL, Wang KL, Li TT, Zhang Y, Zheng FM, Xu F, Han QN, Gao P, (2015). Morphine promotes cancer stem cell properties, contributing to chemoresistance in breast cancer. *Oncotarget.* 6:3963–3976.

Nomura T, Mimata H (2007). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in prostatecancer cells. *Cancer Drug Resistance Perspectives*, ed Torres LS, (Nova Science Publishers, New York), Vol. 121, 95–105.

Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T (1991). Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood.* 78:1706–1712.

Oliveira S y Lukacs N (20039). Stem cell factor: a hemopoietic cytokine with important targets in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2:313–318.

Oren M (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 10:431–442.

Pandey PK, Udayakumar TS, Lin X, Sharma D, Shapiro PS, Fondell JD (2005). Activation of TRAP/mediator subunit TRAP220/Med1 is regulated by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 25:10695–710.

Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC, Zsebo KM (1991). Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood*. 78:1403–1412.

Parikh PM, Gupta S (2013). Management of gastrointestinal stromal tumor: The imatinib era and beyond. *Indian J. Cancer*, 50, 31–40.

Pazopanib HCl (GW786034 HCl). VEGFR Inhibitor. Read Reviews & Product Use Citations. Available online:<http://www.selleckchem.com/products/Pazopanib-Hydrochloride.html>

Penel (2011) N, Le Cesne A, Bui BN, Perol D, Brain EG, Ray-Coquard I, Guillemet C, Chevreau C, Cupissol D, Chabaud S. Imatinib for progressive and recurrent aggressive fibromatosis (desmoid tumors): An {FNCLCC/French} Sarcoma Group phase {II} trial with a long-term follow-up. *Ann. Oncol.* 22, 452–457.

Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechtersheimer G (2005). The location of {KIT} and {PDGFRA} gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J. Clin. Pathol.* 58, 634–639.

Phane Maddens S, Charruyer A, Plo I, Dubreuil P, Berger S, Salles B, Laurent G, Jaffré J (2002). Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: Implication in stem cell factor radioprotective effect. *Blood*, 100, 1294–1301.

Philo JS, Wen J, Wypych, J, Schwartz MG, Mendiaz, E.A.; Langley KE. (1996), Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor, Kit. *J. Biol. Chem* 271, 6895–6902.

Pinto AC, Angelo S, Moreira JN, Simoes S (2011). Schedule treatment design and quantitative in vitro evaluation of chemotherapeutic combinations for metastatic prostate cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*; 67(2):275–284.

Plas DR, Thompson CB (2005). Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene*. 24:7435–7442.

Quinn M y Babb P (2002). Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int.* 90:162-73.

Reichardt P, Blay JY, Gelderblom H, Schlemmer M, Demetri GD, Bui-Nguyen B, McArthur GA, Yazji S, Hsu Y, Galetic I (2012). Phase {III} study of nilotinib versus best supportive care with or without a {TKI} in patients with gastrointestinal stromal tumors resistant to or intolerant of imatinib and sunitinib. *Ann. Oncol.* 23, 1680–1687.

Ricote M,, García-Tuñón I., Fraile B., Fernández C., Aller P., Paniagua R., Royuela M. (2006). P38 MAPK protects against TNF-alpha-provoked apoptosis in LNCaP prostatic cancer cells. *Apoptosis*. 11(11):1969-75.

Rodriguez GA y Park M (1994). Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr Opin Genet Devel.* 4:15–24.

Rodríguez-Berriguete G., Fraile B., de Bethencourt FR., Prieto-Folgado A., Bartolome N., Nuñez C., Prati B., Martínez-Onsurbe P., Olmedilla G., Paniagua R., Royuela M. (2010). Role of IAPs in prostate cancer progression: immunohistochemical study in normal and pathological (benign hyperplastic, prostatic intraepithelial neoplasia and cancer) human prostate. *BMC Cancer*. 15; 10:18.

Rodríguez-Berriguete G., Prieto A, Fraile B, Bouraoui Y, de Bethencourt FR, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M. (2010). Relationship between IL-6/ERK and NF- κ B: a study in normal and pathological human prostate gland. *Eur Cytokine Netw*. 21(4):241-50.

Romashkova JA, Makarov SS (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*. 401:86-90.

Ropers HH, Craig IW (1989). Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 12 and 13. *Cytogenet Cell Genet*. 51: 259–279.

Rose PG, Sill MW, McMeekin DS, Ahmed A, Salani R, Yamada SD, Wolfson AH, Fusco N y Fracasso PM (2012). A phase I study of concurrent weekly topotecan and cisplatin chemotherapy with whole pelvic radiation therapy in locally advanced cervical cancer: A gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 125: 158-162, 17.

Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP (2010). Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*. 362, 2251–2259.

Saha S, Mukherjee S, Khan P, Kajal K, Mazumdar M, Manna A, Mukherjee S, De S, Jana D, Sarkar DK, Das T (2016). Aspirin suppresses the acquisition of chemoresistance in breast cancer by disrupting an NF κ B-IL6 signaling axis responsible for the generation of cancer stem cells. *Cancer Res*. 76: 2000–2012.

Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Saito K. (2003) Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sci*. 94, 486–491.

Saleem M, Babaei A, Press D (2016). Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: A potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des. Dev. Ther*. 10, 2443–2459.

Santos FPS, Ravandi F (2009). Advances in treatment of chronic myelogenous leukemia—New treatment options with tyrosine kinase inhibitors. *Leuk. Lymphoma* ,50 (Suppl. S2), 16–26.

Savarese DM, Valinski H, Quesenberry P, and Savarese T (1998). Expression and function of colony-stimulating factors and their receptors in human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*. 34, 80–91.

Schilder RJ, Sill MW, Lee RB, Shaw TJ, Senterman MK, Klein-Szanto AJ et al. Phase II evaluation of imatinib mesylate in the treatment of recurrent or persistent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3418–3425.

Schmid HP, Engeler DS, Pummer K, Schmitz-Dräger BJ (2007). Prevention of prostate cancer: more questions than data. *Cancer Prevention. Recent Results Cancer Res*. 174:101-7.

Scott G, Ewing J, Ryan D, Abboud C (1994). Stem cell factor regulates human melanocyte-matrix interactions. *Pigment Cell Res.* 7:44–51.

Scott V y Weinberg R (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147:275-92.

Seifert AM, Kim TS, Greer JB, Cohen NA, Beckman MJ, Santamaria-Barria JA, Zeng S, Crawley MH, Green BL, DeMatteo RP (2014). {PD-1/PD-L1} Blockade Enhances the Efficacy of Imatinib in Gastrointestinal Stromal Tumor ({GIST}). *J. Am. Coll. Surg.* 219, S129.

Seifert AM, Zeng S, Zhang JQ, Kim TS, Cohen NA, Beckman MJ, Medina BD, Maltbaek JH, Loo JK, Crawley MH, (2017). {PD-1/PD-L1} Blockade Enhances T-cell Activity and Antitumor Efficacy of Imatinib in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin. Cancer Res.* 23, 454–465.

Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell.* 40: 310–322.

Sette C, Paronetto MP, Barchi M, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P (2002). Tr-kit-induced resumption of the cell cycle in mouse eggs requires activation of a Src-like kinase. *EMBO J.* 21, 5386–5395.

Seubwai W, Vaeteewoottacharn K, Kraiklang R, Umezawa K, Okada S, Wongkham S (2016). Inhibition of NFκB activity enhances sensitivity to anticancer drugs in cholangiocarcinoma cells. *Oncol Res.* 23:21–28.

Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 2010; 24:1967–2000.

Shen MM, Abate-Shen C. Pten inactivation and the emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67:6535–8.

Shivakrupa R, Linnekin D (2005). Lyn contributes to regulation of multiple Kit-dependent signaling pathways in murine bone marrow mast cells. *Cell Signal.* 2005, 17, 103–109.

Siemens H, Jackstadt R, Kaller M, Hermeking H. Repression of c-Kit by p53 is mediated by miR-34 and is associated with reduced chemoresistance, migration and stemness. *Oncotarget.* 4(9):1399-415.

Simak R, Capodieci P, Cohen DW, Fair WR, Scher H, Melamed J, Drobnjak M, Heston WD, Stix U, Steiner G, (2000). Expression of c-kit and kit-ligand in benign and malignant prostatic tissues. *Histol Histopathol.* 15, 365–374.

Skorta I, Oren M, Markwardt C, Gutekunst M, Aulitzky WE, van der Kuip H (2009). Imatinib mesylate induces cisplatin hypersensitivity in Bcr-Abl+ cells by differential modulation of p53 transcriptional and proapoptotic activity. *Cancer Res.*; 69(24):9337-45.

Søreide K, Sandvik OM, Søreide JA, Gudlaugsson E, Mangseth K, Haugland HK (2012). Tyrosine-kinase mutations in {c-KIT} and {PDGFR-alpha} genes of imatinib na{"ni}ve adult patients with gastrointestinal

stromal tumours (GISTs) of the stomach and small intestine: Relation to tumour-biological risk-profile and long-term outcome. *Clin. Transl. Oncol.* 14, 619–629.

Stankov K, Popovic S, Mikov M (2014). C-KIT signaling in cancer treatment. *Curr. Pharm. Des.* 20, 2849–2880

Steeg PS (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat. Med.* 12, 895–904.

Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate.* 17:337-47.

Steiner H., Godoy-Tundidor S., Rogatsch H., Berger AP., Fuchs D., Comuzzi B., Bartsch G., Hobisch A., Culig Z. (2003). Accelerated in vivo growth of prostate tumors that up-regulate interleukin-6 is associated with reduced retinoblastoma protein expression and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Pathol.* 162(2):655-63.

Stemberger-Papić S, Vrdoljak-Mozetic D, Ostojić DV, Rubesa-Mihaljević R, Krigtović I, Brnčić-Fisher A, Kragević M, Eminović S (2015). Expression of {CD133} and {CD117} in 64 Serous Ovarian Cancer Cases. *Coll. Antropol.* 39, 745–753.

Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer.* 21: 274-281.

Stordal B, Hamon M, McEneaney V, Roche S, Gillet JP, O'Leary JJ, Gottesman M, Clynes M (20). Resistance to paclitaxel in a cisplatin-resistant ovarian cancer cell line is mediated by P-glycoprotein. *PLoS One* 7: e40717, 201.

Sun J, Pedersen M, Rönstrand L (2008). Gab2 is involved in differential phosphoinositide 3-kinase signaling by two splice forms of c-Kit. *J. Biol. Chem.* 283, 27444–27451.

Sun L, Lee J, Fine HA (2004). Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J Clin Invest.* 113:1364.

Sun Y, Guan Z, Liang L, Cheng Y, Zhou J, Li J, Xu Y (2016). NFκB signaling plays irreplaceable roles in cisplatin-induced bladder cancer chemoresistance and tumor progression. *Int J Oncol.* 48:225–234.

Tay CM, Ong CW, Lee VKM, Pang B (2013). (KIT) gene mutation analysis in solid tumours: Biology, clinical applications and trends in diagnostic reporting. *Pathol,* 45, 127–137.

Thakur N., Sorrentino A., Heldin CH., Landström M. (2009). TGF-beta uses the E3-ligase TRAF6 to turn on the kinase TAK1 to kill prostate cancer cells. *Future Oncol.* 5(1):1-3.

Thömmes K, Lennartsson J, Carlberg M, Rönstrand L (1999). Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem. J.* 341 Pt 1,211–216.

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 (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 350:2239-46.

Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, Griffin JD, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA, Demetri GD (2001). Inactivation of the gastrointestinal stromal tumor {c-KIT} oncoprotein: Biological and clinical implications. *Oncogene*, 20, 5054–5058.

Ueda S, Mizuki M, Ikeda H, Tsujimura T, Matsumura I, Nakano K, Daino H, Honda ZI, Sonoyama J, Shibayama H (2002). Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor–induced chemotaxis: Contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood* 99, 3342–3349.

Van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, di Paola E, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Sciot R, Van Glabbeke M (2001). Safety and efficacy of imatinib ({STI571}) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: A phase {I} study. *Lancet*, 358, 1421–1423.

Voytyuk O, Lennartsson J, Mogi A, Caruana G, Courtneidge S, Ashman LK, Rö L. (2003), Src Family Kinases Are Involved in the Differential Signaling from Two Splice Forms of c-Kit. *J. Biol. Chem.* 278, 9159–9166.

Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Harney SC, Sanders KM (1995). Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants. *Am J Physiol.* 269:C1577–C1585.

Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM (1994). Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol.* 480 : 91–97.

Waskow C, Paul S, Haller C, Gassmann M, Rodewald HR (2002). Viable c-Kit W/W mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity.* 17:277–288.

Weber MJ, Gioeli D. Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem.* 2004; 91:13–25.

Wehrle-Haller B (2003). The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res.* 16:287–296.

Wei Y, To KK, Au-Yeung SC (2015). Synergistic cytotoxicity from combination of imatinib and platinum-based anticancer drugs specifically in Bcr-Abl positive leukemia cells. *J Pharmacol Sci.* 129(4):210-5.

Weiler SR, Mou S, Deberry CS, Keller JR, Ruscetti FW, Ferris DK, Longo DL, Linnekin DN (1996). JAK2 Is Associated With the c-kit Proto-oncogene Product and Is Phosphorylated in Response to Stem Cell Factor. *Blood*, 87, 3688–3693.

Wiesner C, Nabha SM, Dos Santos EB, Yamamoto H, Meng H, Melchior SW, Bittinger F, Thuroff JW, Vessella RL, Cher ML, Bonfil RD (2008). C-kit and its ligand stem cell factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis. *Neoplasia.* 10:996–1003.

Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ (2005). Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol.* 36:486–493.

Wong SF (2009). New dosing schedules of dasatinib for CML and adverse event management. *J. Hematol. Oncol.* 2, 0.

Wozniak A, Rutkowski P, Piskorz A, Ciwoniuk M, Osuch C, Bylina E, Sygut J, Chosia M, Rys J Urbanczyk K (2012). Prognostic value of {KIT/PDGFR} mutations in gastrointestinal stromal tumours (GIST): Polish Clinical (GIST) Registry experience. *Ann. Oncol.* 23, 353–360.

Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, Qian F, Chu F, Bentzien F, Cancilla B, (2011). Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* 10, 2298–2308.

Yancey MF, Merritt DA, Lesman SP, Boucher JF, Michels GM (2010). Pharmacokinetic properties of toceranib phosphate (Palladia, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in laboratory dogs and dogs with mast cell tumors. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 33, 162–171.

Yasuda T, Kuroski T (2008). Regulation of lymphocyte fate by Ras/ERK signals. *Cell Cycle*, 7, 3634–3640.

Zhang P, Zhang P, Shi B, Zhou M, Jiang H, Zhang H, Pan X, Gao H, Sun H, Li Z. (2014) Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis.* 5:e991.

Zhang X, Kyo S, Nakamura M, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Fujiwara H (2014). Imatinib sensitizes endometrial cancer cells to cisplatin by targeting CD117-positive growth-competent cells. *Cancer Lett.* 345(1):106-14.

Zhao J, Quan H, Xu Y, Kong X, Jin L, Lou L (2014). Flumatinib, a selective inhibitor of BCR-ABL/PDGFR/KIT, effectively overcomes drug resistance of certain KIT mutants. *Cancer Sci.* 105, 117–125.

Zhou BP. y Hung MC. (2005). Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3 β and β -Trcp in the regulation of metastasis. *Cell Cycle.* 4:772-776.

Zhua Y., Culmsee C., Klumpp S., Krieglstein J (2004). Neuroprotection by transforming growth factor- β 1 involves activation of nuclear factor- κ B through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1, 2 signaling pathways. *Neuroscience.* 123: 4; 897-906.