

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:  
CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

CONTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE c-KIT NA  
AQUISIÇÃO DE QUIMIORRESISTÊNCIA AO  
DOCETAXEL NO CÂNCER DE PRÓSTATA

Marcelo Quintanilha Azevedo

Orientador: professor doutor Walter José Koff

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre  
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:  
CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

CONTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE c-KIT NA  
AQUISIÇÃO DE QUIMIORRESISTÊNCIA AO  
DOCETAXEL NO CÂNCER DE PRÓSTATA

Marcelo Quintanilha Azevedo  
Orientador: professor doutor Walter José Koff

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para  
obtenção do título de Mestre em Cirurgia

Porto Alegre  
2013

## CIP - Catalogação na Publicação

Quintanilha Azevedo, Marcelo  
CONTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE c-KIT NA AQUISIÇÃO  
DE QUIMIORRESISTÊNCIA NO CÂNCER DE PRÓSTATA /  
Marcelo Quintanilha Azevedo. -- 2013.  
96 f.

Orientador: Walter José Koff.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,  
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Metastase Ossea . 2. Adenocarcinoma de  
Prostata. 3. c-KIT. 4. CD117. 5. Docetaxel. I. José  
Koff, Walter , orient. II. Título.

Sabemos de quase nada adequadamente, de poucas coisas *a priori*, e da maioria por meio da experiência.

Gottfried Wilhelm Leibniz

## **Agradecimentos**

À minha família, pelo carinho e amor durante toda a minha caminhada.

Ao Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao professor Dr. Walter Koff e ao Dr. Emanuel Burck dos Santos, pelos ensinamentos e suporte durante minha formação como urologista.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO E <i>ABSTRACT</i> .....	9
Resumo.....	10
<i>Abstract</i> .....	13
INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	16
Introdução.....	17
Revisão da Literatura.....	19
I – Definição de tumor de próstata resistente à castração	
II – Tratamento quimioterápico de primeira linha para tumores de próstata resistentes à castração	
III – Metástase óssea de câncer de próstata	
IV – c-KIT	
V – c-KIT e câncer de próstata	
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	34
Referências Bibliográficas da Revisão da Literatura.....	35
OBJETIVO.....	39
ARTIGO EM INGLÊS ( <i>PAPER</i> ).....	40
LIST OF FIGURES IN THE ARTICLE.....	57

ARTIGO EM PORTUGUÊS.....61

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO.....82

## LISTA DE ABREVIATURAS

- SCF: stem cell factor, ligante do c-KIT
- PSA: antígeno prostático específico
- c-KIT: proto-oncogene c-KIT, CD117
- RTK: receptor tirosinoquinase
- PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
- GIST: tumor estromal do trato gastrointestinal
- SBF: soro bovino fetal
- CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- RNA: ácido ribonucleico
- G418: Geneticina
- RT-PCR: reação de cadeia de polimerase de transcriptase reversa (reverse transcription polymerase chain reaction)
- PBS: solução salina tamponada com fosfato (phosphate buffered saline)
- RPM: rotações por minuto
- RIPA: radio immuno precipitation assay
- g: giros
- mL: mililitro
- µL: microlitro
- µg: microgramas
- V: volts
- mA: mili amperes
- nM: nanomolar
- NaCl: sódio
- TD: tempo de duplicação celular
- SDS: sódio dodecil sulfato
- DMSO: dimetil sulfóxido ( dimethyl sulfoxide)
- WST-1: [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
- IC<sub>50</sub>: índice da metade da concentração de inibição máxima



**RESUMO E *ABSTRACT***

## RESUMO

### **Contribuição da Expressão de c-KIT na Aquisição de Quimiorresistência ao Docetaxel no Câncer de Próstata**

**Introdução:** após os tumores de pele não - melanoma o câncer de próstata é o tumor maligno mais comumente diagnosticado e a segunda causa de morte relacionada ao câncer na população masculina. A maioria dos pacientes que morrem por câncer de próstata possuem metástases ósseas e esta doença é pouco responsiva ao tratamento quimioterápico. O microambiente ósseo, através de uma interação bidirecional com as células cancerígenas prostáticas provoca, nessas células, alterações fenotípicas. Uma dessas alterações é a expressão das células cancerígenas metastáticas anteriormente c-KIT negativas de receptores c-KIT. Hipotetizamos, aqui, que essas alterações poderiam contribuir para a quimiorresistência desses tumores.

**Objetivo:** avaliar a hipótese de que a expressão de c-KIT pelas células de câncer de próstata contribui para a reduzida sensibilidade dessa neoplasia ao agente quimioterápico Docetaxel.

**Métodos:** estudo experimental, utilizando células PC3, derivadas de metástases de câncer de próstata humano andrógeno-independente e C42b derivadas de metástases ósseas de câncer de próstata de coluna lombar de ratos atímicos . Ambas linhagens celulares c-KIT negativas foram tratadas em meio celular adequado e, sempre que atingiram a confluência de 90 %, foram isoladas para experimento ou expansão celular.

Com o objetivo de mimetizar a expressão de c-KIT *in vitro*, parte das células foram submetidas a transfecção celular estável de c-KIT. Para isso foi utilizada uma formulação para transfecção de ácidos nucleicos em células eucarióticas (LIPOFECTAMINE 2000, Invitrogen) e, após isso, foi realizada a seleção de clones transfectantes estáveis. Os grupos foram divididos em c-KIT positivo, com ou sem o tratamento de SCF e c-KIT negativo com ou sem o tratamento de SCF, submetidos a doses crescentes do quimioterápico Docetaxel.

**Resultados:** utilizando-se o índice da metade da concentração de inibição máxima ( $IC_{50}$ ), foi observado que nos experimentos com tratamento com Docetaxel por 2 dias os  $IC_{50}$  dos grupos C42b c-KIT e PC3 c-KIT, na presença ou não do ligante SCF, foram bastante superiores aos  $IC_{50}$  dos grupos C42b e PC3 que não sofreram a transfecção estável do c-KIT, na presença ou não do ligante SCF ( $p < 0,001$  grupoxdose). Nos

experimentos com tratamento de Docetaxel por 3 dias, não foi observada diferença com significância estatística dos  $IC_{50}$  entre os grupos das células C42b transfectadas ou não com c-KIT e PC3 transfectadas ou não com c-KIT, na presença ou não do ligante SCF, principalmente quando foram usadas doses de Docetaxel mais próximas aos  $IC_{50}$  encontrados nos experimentos precedentes (tratamento com Docetaxel por 2 dias, doses inferiores a 10 nM de Docetaxel). Na tentativa de entender o aumento da quimiorresistência ao tratamento do Docetaxel por 3 dias aos grupos sem a transfecção de c-KIT, realizou-se o tempo de duplicação celular (TD) nos grupos C42b e PC3, o qual também não demonstrou diferença entre os grupos (PC3 EV TD = 40 horas, PC3 c-KIT TD 32 horas, C42b EV TD = 12 horas, C42b c-KIT TD = 14 horas).

**Conclusões:** o presente estudo não demonstrou aumento da quimiorresistência das células C42b e PC3 ao quimioterápico Docetaxel quando transfectadas com c-KIT.

*ABSTRACT***Contribution of Expression of c-KIT in the Acquisition of Chemoresistance to Docetaxel in Prostate Cancer**

**Introduction:** after non-melanoma skin tumors, prostate cancer is the most commonly diagnosed malignant tumor and the second greatest cancer-related cause of death among men. Most patients who die of prostate cancer have bone metastases. This disease does not respond well to chemotherapy. The bone microenvironment, through a bidirectional interaction with prostatic cancerous cells, causes phenotypic alterations in these cells. One of these alterations is the expression of previously c-KIT negative metastatic cancerous cells of c-KIT receptors. Here we hypothesize that these alterations might contribute to the chemoresistance of such tumors.

**Objective:** evaluating the hypothesis that the c-KIT expression by prostate cancer cells contributes to the reduced sensibility of this neoplasia to chemotherapeutic agent Docetaxel.

**Methods:** experimental study, using PC3 cells derived from metastases of androgen-independent human prostate cancer and C42b cells derived from prostate cancer bone metastases from the lumbar spine of athymic mice. Both c-KIT negative cell lines were treated in the proper cellular medium and isolated for experiment or cellular expansion whenever they reached 90% confluence.

Aiming at mimicking the c-KIT expression *in vitro*, part of the cells was submitted to stable c-KIT cell transfection. In order to do so, we used a formulation for the transfection of nucleic acids into eukaryotic cells (LIPOFECTAMINE 2000, Invitrogen). Following, the selection of stable transfectant clones was made. The groups were divided into c-KIT positive, with or without SCF treatment, and c-KIT negative, with or without SCF treatment, receiving increasing doses of the chemotherapeutic agent Docetaxel.

**Results:** using the half maximal inhibitory concentration index ( $IC_{50}$ ), we observed that in the experiments treated with Docetaxel for 2 days, the  $IC_{50}$  values of the groups C42b c-KIT and PC3 c-KIT, in the presence or absence of the ligand SCF, were very superior to the  $IC_{50}$  values of the groups C42b and PC3 that had not undergone the stable c-KIT transfection, in the presence or absence of the ligand SCF ( $p < 0.001$  group $\times$ dose). In experiments treated with Docetaxel for 3 days, we did not

observe any statistically significant difference of  $IC_{50}$  values between the groups of C42b cells transfected or not transfected with c-KIT and PC3 cells transfected or not transfected with c-KIT, in the presence or absence of the ligand SCF, especially when using doses of Docetaxel that were more similar to the  $IC_{50}$  values found in previous experiments (treatment with Docetaxel for 2 days, doses below 10 nM of Docetaxel). In an attempt to understand the increased chemoresistance to the treatment with Docetaxel for 3 days in the groups without c-KIT transfection, we performed the cell doubling time (DT) in the groups C42b and PC3, which also showed no difference between groups (PC3 EV DT = 40 hours, PC3 c-KIT DT = 32 hours, C42b EV DT = 12 hours, C42b c-KIT DT = 14 hours).

**Conclusions:** the present study showed no increased chemoresistance of C42b and PC3 cells to the chemotherapeutic agent Docetaxel when they are transfected with c-KIT.

**INTRODUÇÃO  
E  
REVISÃO DA LITERATURA**



## INTRODUÇÃO

A incidência de câncer de próstata tem aumentado nas últimas décadas sendo, hoje, o segundo tumor mais diagnosticado em homens nos países ocidentais, atrás apenas dos tumores cutâneos tipo não - melanoma (1,2).

Mais do que 217.000 homens foram diagnosticados com câncer de próstata e cerca de 32.000 morreram com câncer de próstata metastático em 2010 nos Estados Unidos, representando a segunda causa de morte por câncer na população masculina ocidental (1-4).

A maior parte dos homens diagnosticada com doença em nível locorregional tem excelente prognóstico quando tratada com prostatectomia radical e/ou radioterapia. Entretanto, uma fração significativa desses pacientes (20%-40%), que foi submetida à terapia primária, terá recidiva bioquímica, e 30-70% deles com recidiva bioquímica desenvolverão doença metastática dentro de dez anos após a terapia local (5,6).

A ablação androgênica é o tratamento para aqueles pacientes com doença metastática. Porém, a maioria desses homens irá experimentar a falha desta terapia e morrerá de câncer de próstata recorrente, resistente à castração. A metástase óssea está presente em 90% dos pacientes com

câncer de próstata avançado (7) e é a principal causa de morbidade e mortalidade nos pacientes com câncer de próstata (8). A doença prostática metastática resistente à castração é incurável e o tratamento quimioterápico paliativo é a escolha.

O uso da associação do Docetaxel com prednisona é o tratamento quimioterápico de primeira linha para o câncer de próstata resistente à castração desde 2004, quando mostrou aumento de sobrevida, melhora de qualidade de vida e redução de dor óssea, se comparado com a associação da Mitoxantrona e prednisona (9,10), terapia padrão até então.

Com o objetivo do aprimoramento ou do surgimento de novas alternativas terapêuticas, deve haver um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento, na progressão e na aquisição da quimiorresistência pelas metástases de câncer de próstata.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **I – Definição de tumor de próstata resistente à castração**

Tumor de próstata resistente à castração é definido como a doença que progride independente da terapia de deprivação androgênica. Essa progressão pode se apresentar em qualquer combinação de elevação do PSA, progressão da doença preexistente e aparecimento de novas metástases (11).

### **II – Tratamento quimioterápico de primeira linha para tumores de próstata resistentes à castração**

Até meados dos anos 90, os pacientes com tumores de próstata resistentes a castração eram geralmente tratados com abordagens paliativas. Em 1996, Tannok et al mostraram que a Mitoxantrona (com prednisona) melhorava a qualidade de vida e a dor óssea, assim como reduzia os níveis de PSA nos pacientes (12), tornando-se, nessa época, a terapia padrão inicial.

Em 2004, o estudo TAX327 comparou Docetaxel (e prednisona) semanal ou a cada 3 semanas, com Mitoxantrona (e prednisona), demonstrando benefício de sobrevida geral e sobrevida livre da doença no braço de Docetaxel a cada 3 semanas (10). Nesse mesmo ano outro

grupo (SWOG 9916) demonstrou aumento de sobrevida nos pacientes com tumor de próstata resistente à castração tratados com Docetaxel e Estramustina comparando com Mitoxantrona e prednisona (9). Com base nos resultados, Docetaxel tornou-se, no lugar da Mitoxantrona, o tratamento de primeira linha para pacientes com câncer de próstata resistente à castração.

### **III – Metástase óssea de câncer de próstata**

A propensão das células de câncer de próstata de metastatizarem para os ossos sugere uma interação bidirecional entre as células prostáticas e o microambiente ósseo. As células de câncer de próstata que metastatizam para o osso devem ter certas características fenotípicas que as ajudem a sobreviver, a se multiplicar e a se expandir no microambiente ósseo (13). Da mesma forma, o microambiente ósseo deve induzir a determinadas alterações genéticas nas células de câncer de próstata, providenciando as vantagens adaptativas para seu crescimento dentro do osso (13).

### **IV - c-KIT**

O aumento da expressão e/ou alterações estruturais de muitos receptores da família tirosinoquinase (RTKs) são frequentemente associados a diversos tipos de câncer (13). A ativação dos receptores é

crucial para o processo de crescimento, progressão, assim como proliferação, migração e angiogênese.

O proto-oncogene c-KIT (também conhecido como CD117 ou receptor SCF) representa um desses receptores tirosinoquinase e pertence à subfamília classe III, a qual também inclui o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator estimulador de colônia de macrófagos (14). O ligante do c-KIT é o SCF (do inglês, stem cell factor), também conhecido como fator de crescimento celular dos mastócitos, ligante do Kit ou Steem Factor (15,16). A ativação do c-KIT ocorre pela ligação do homodímero não covalente do SCF, o qual media a dimerização do receptor, seguindo por autofosforilização do domínio tirosinoquinase intracelular, levando a diferentes vias de transdução (15).

O receptor tirosinoquinase c-KIT e seu ligante SCF, são essenciais para a hematopoese, melanogênese e fertilidade (15), tendo papel importante na regulação da maturação, migração e proliferação de diferentes tipos celulares (17,18). Normalmente o proto-oncogene c-KIT é expresso na superfície de muitos tipos celulares como células hematopoéticas, mastócitos, melanócitos e células intersticiais de Cajal no trato digestivo (15). A perda completa da expressão de c-KIT ou SCF leva à morte embriônica ou perinatal (19).

Alguns tumores como GIST (tumor estromal do trato gastrointestinal), leucemia mieloide aguda (20,21) câncer de

pulmão de pequenas células (22,23), câncer de mama (24) e mesotelioma (25) mostraram expressão e ativação anormal de c-KIT e/ou SCF, o que leva ao aumento na proliferação e diminuição da apoptose celular tumoral. Numerosos estudos clínicos mostraram que a expressão aumentada e/ou a mutação de c-KIT estão fortemente associadas com diminuição da sobrevida e pior prognóstico para alguns tumores (26).

#### **V – c-KIT e câncer de próstata**

No câncer de próstata, alguns estudos usando linhagens celulares mostraram resultados discrepantes no que diz respeito à expressão de c-KIT e seu ligante SCF (26,27). Adicionalmente, análises de tecido prostático humano benigno e maligno mostraram padrões alterados da expressão do c-KIT e do SCF (26).

Recentemente o grupo do departamento de Urologia da Wayne State University realizou um estudo abrangente no padrão da expressão de c-KIT e SCF no tecido prostático benigno e maligno, evidenciando uma tendência geral de aumento de expressão de c-KIT na progressão clínica do câncer de próstata (13). Esse trabalho mostrou maior aumento da tendência de expressão de c-KIT em metástases de câncer de próstata do que nos tumores primários, sem mostrar o aumento de SCF (13).

Além disso, nesse mesmo grupo, estudos usando modelo experimental de metástase óssea de câncer de próstata mostraram que essas células expressam fortemente c-KIT em tumores intraósseos (13). Tumores subcutâneos desenvolvidos pelas mesmas células em camundongos imunossuprimidos permanecem negativos na expressão de c-KIT (13), sugerindo que o microambiente ósseo supra regula a expressão de c-KIT, favorecendo a expansão óssea metastática.

Uma vez que a associação da expressão de c-KIT está relacionada à aquisição de quimiorresistência em outros tumores, e o desfecho do tratamento quimioterápico em câncer de próstata com metástases ósseas tem um resultado pobre, é possível que a indução da expressão de c-KIT em câncer de próstata metastático no tecido ósseo contribua para a reduzida sensibilidade da neoplasia prostática ao tratamento quimioterápico.

## **Material e Métodos**

### **Linhagens Celulares:**

PC3 \_ Células originalmente derivadas de metástase óssea de câncer de próstata humano andrógeno independente (27). A linhagem celular PC3 tem um maior potencial metastático comparado com as

linhagens DU145 e LNCaP (28,29). Essa linhagem não apresenta expressão de c-KIT (13). As células foram cultivadas em meio de cultura RMPI 1640 (GIBCO®) contendo 10 % de soro fetal bovino (SBF, Atlanta\_Biologicals), 100 IE/ml de penicilina e 100 U/ml de estreptomicina e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando foi atingida a confluência de 90%, as células foram tratadas com tripsina (GIBCO®) e isoladas para os experimentos, ou expansão celular.

C42b \_ Células com origem em metástases ósseas de coluna lombar de ratos atímicos (30,31). Foram cultivadas em meio de cultura RMPI 1640 (GIBCO®) contendo 10 % de soro fetal bovino (SBF, Atlanta\_Biologicals), 100 IE/ml de penicilina e 100 U/ml de estreptomicina e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando foi atingida a confluência de 90% as células foram tratadas com tripsina (GIBCO®) e, posteriormente, isoladas para os experimentos, ou ainda para expansão celular.

### **Transfecção celular**

Esta técnica foi utilizada com o intuito de mimetizar a expressão de c-KIT *in vitro*, de modo a simular o observado quando as células de câncer de próstata estão em contato com o microambiente ósseo. Células PC3 e C42b c-KIT negativo foram submetidas à transfecção estável de c-KIT. Para isso, foi utilizado o Lipofectamine 2000™ que é um reagente



usado na transfecção de ácidos nucleicos (DNA e RNA) para células eucarióticas com a vantagem de uma grande eficiência neste procedimento.

O DNA que é introduzido nas células pode ser linear ou circular (plasmídeos). Os plasmídeos não podem se propagar em células eucarióticas, a menos que estejam integrados (inseridos em cromossomos) no genoma. Como resultado e, também, pela degradação sofrida, o DNA do plasmídeo transfectado é diluído cerca de 5 vezes a cada replicação celular. Entretanto, utilizando marcadores gênicos que estão incluídos no plasmídeo, os quais dão às células algumas vantagens seletivas, podem facilmente ser selecionadas linhas celulares estáveis. Os mais utilizados são os genes com resistência a fármacos (como os que inativam a neomicina ou a geneticina – G418) nos plasmídeos, o que permite a seleção celular. É importante que se saiba que as células selecionadas transfectadas que possuem a resistência à droga não necessariamente expressam a proteína de interesse. Para isso, foram criados diversos clones, e confirmou-se a expressão proteica de interesse por RT-PCR e Western Blot (figura 1, figura 2, figura 3).

As linhagens celulares utilizadas foram cultivadas um dia antes da transfecção, em número de  $1 \times 10^5$  células de cada linhagem, em  $500 \mu\text{l}$  de meio de crescimento em placa de titulação de 6 vasos, sem

antibióticos, para que, no momento da transfecção, as células estivessem com uma confluência de 90 a 95%. No dia posterior foram diluídos 8  $\mu$ l (4  $\mu$ g) do plasmídeo em 250  $\mu$ l de Opti-MEM<sup>®</sup>, misturando-se cuidadosamente. A incubação durou 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi combinado o plasmídeo diluído com o Lipofectamine<sup>™</sup> 2000, também diluído, misturando-se gentilmente por 25 minutos em temperatura ambiente (os controles negativos foram células cultivadas em 2,5 ml de RPMI 1640 com 10 % de SFB). Para cada vaso de cultura utilizaram-se 100  $\mu$ l desta solução. As células foram levadas para a incubadora de CO<sub>2</sub> e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. O meio de cultura foi trocado a cada 6 horas do início da incubação. Após as 48 horas iniciais as células foram divididas com o uso da tripsina e transferidas para um frasco de 25 cm<sup>2</sup>. Neste momento, teve início o tratamento com G418 na concentração de 350  $\mu$ g/ml. As células cresceram nesse meio até que todas do grupo de controle tivessem morrido com o uso do mesmo meio (com G418). O tipo de plasmídeo usado foi o pCMV6-NEO (cat. SC120061 in pCMV6-NEO). Esse vetor é resistente à Geneticina (figura 1).

### **Seleção de clones transfectantes estáveis**

A seleção de células transfectadas, que são G418 resistentes, foi realizada, porque mesmo após a transfecção celular a proteína de interesse não necessariamente é expressa por essas células. Para isso selecionaram-se vários clones e confirmou-se a expressão proteica por RT-PCR (do inglês, Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) e Western Blot (figuras 1, figura 2, figura 3). As células transfectadas com c-KIT foram expandidas 28 dias após o início do tratamento com G418 e, então, cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (4 x 10<sup>3</sup> células/frasco) em meio completo sem G418. Quando o crescimento de colônias se tornou visível, desenharam-se círculos em torno dessas colônias por fora dos frascos, utilizando-se caneta marcadora de texto. As áreas foram coletadas com swabs de algodão com tripsina. As células foram transferidas para uma placa de titulação de 24 vasos com 1,5 ml de meio celular completo e quando se expandiram, passaram para um frasco de 25 cm<sup>2</sup> e, sempre que possível, para um frasco de área de 75 cm<sup>2</sup>. As células foram tratadas, a partir de então, com G418 novamente. Quando atingiram a confluência de 90%, foram novamente divididas e separadas por clones celulares (clone número 1, número 2, etc.).

## RT-PCR

Utilizou-se o RT\_PCR para avaliação das células transfectadas com c-KIT. Para isso, as duas linhagens celulares foram cultivadas com confluência de 100% em placa de titulação de 24 vasos e as células, submetidas à extração do RNA, utilizando-se o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Cat. n. 15596-026), que é usado para a isolamento do RNA de células e tecidos. Esse reagente é uma solução monofásica de fenol e isocianato de guanidina que mantém a integridade do RNA, enquanto dissolve os componentes celulares e rompe as células. Estas foram lavadas com 1 ml de PBS, que era em seguida aspirado, sendo adicionados, logo após, 800  $\mu$ l do reagente Trizol<sup>®</sup> por 10 minutos. Observou-se por microscópio a lise celular de cada vaso sendo o conteúdo transferido para um eppendorf de 1,5 ml, com a adição de clorofórmio em uma razão de 1:5 do Trizol<sup>®</sup>. O eppendorf, fechado e misturado vigorosamente por 15 segundos, foi deixado a temperatura ambiente por 3 minutos. A solução foi centrifugada a 4 °C com a velocidade máxima (13.2 RPM), por 20 minutos. Após a centrifugação, observaram-se três camadas distintas, sendo coletada com pipeta a camada do topo que continha o RNA. Cerca de 400  $\mu$ l foram coletados e transferidos para um novo eppendorf. Utilizaram-se 400  $\mu$ l de isopropanol para a precipitação do RNA, sendo deixados pelo menos por 2 horas a uma temperatura de -20 °C. Após esse período, o conteúdo do

ependorf foi transferido para a centrífugadora e a solução era centrifugada por 20 minutos a 13,2 RPM sobre uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi então descartado e observou-se o RNA como um pellet no fundo do tubo de ependorf. Adicionou-se 1 ml de etanol a 70% ao pellet e centrifugou-se por 5 minutos, com uma velocidade de 7500 RPM, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado. O RNA era, então, ressuspensão, utilizando-se 10  $\mu$ l de água livre de nuclease, por 10 minutos a temperatura ambiente. Com o RNA ressuspensão, utilizou-se o IScript cDNA Synthesis Kit (BioRad cat. n. 1708890), conforme as normas técnicas desse kit, para análise espectrofotométrica no BioRad Smart Spec 3000. Logo após, realizou-se a transcrição reversa no GeneAmp PCR e, em seguida, no mesmo aparelho, passou-se à reação PCR, com o uso dos primers adequados. Conforme o PCR era finalizado, o E-gel cassette de agarose era carregado com as amostras dos ependorfs, e carregado no E-gel IBase Power System. Após esse passo, o gel estava pronto para ser utilizado no transiluminador ultravioleta .

### **Western Blot**

A análise proteica foi realizada através da técnica de Western Blot, nas células transfectadas, ou não, com c-KIT.

As células tratadas com os antagonistas foram colocadas em

tampão de lise e posteriormente foram homogeneizadas em tampão RIPA refrigerado, contendo inibidores de proteases, centrifugadas a 200 g por 5 minutos, ressuspensas em 1 mL de tampão em tubo cônico, centrifugadas a 600 g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante da centrifugação foi coletado, a concentração de proteína determinada e armazenada em alíquotas de 50 µL. A concentração de proteína presente nas culturas foi determinada utilizando - se um kit de reagentes da Thermo Scientific. No procedimento, aos 10 µL da amostra a ser dosada foram adicionados 150 µL do reagente, conforme especificações do fabricante. Determinou-se a intensidade de absorbância da mistura resultante a 660 nm, após 10 minutos de reação.

Eletroforese em gel SDS / Poliacrilamida: Alíquotas de 50 µg de proteínas foram ressuspensas em 30 µL de tampão de amostra [Tris-HCL 500 mM, pH 6.8, glicerol, SDS, 10%, β-mercaptoetanol, bromofenol azul 0,05%] e, a seguir, as amostras aquecidas em banho seco, a 95° C, por 4 minutos. O volume total das amostras, bem como 10 µL de padrão de peso molecular para proteína foram submetidas à eletroforese, aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, sob uma tensão de 80 V por 10 minutos aproximadamente, até que as proteínas atingissem o gel separador. Quando a tensão atingiu 120 V, as proteínas foram separadas de acordo com seus pesos moleculares, tendo o padrão como parâmetro.

Western Blotting: Após a realização de SDS-PAGE, descrito

anteriormente, realizou-se o imunoblotting, através de transferência eletroforética (250 mA, por 1 hora) das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose. Incubou-se a membrana com solução bloqueadora 7,5% de leite desnatado em tampão Tris 200 mM, pH 7.5, contendo NaCl 500mM, durante 1 hora, antes da incubação por 12 horas, a 4° C, com o anticorpo monoclonal, cujas diluições foram feitas de acordo com as especificações do fabricante, restritas às respectivas proteínas (1:500). Após a incubação com o anticorpo primário e lavagens para remoção das ligações inespecíficas, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, por 1 hora. As bandas imunorreativas foram visualizadas com reagente quimioluminescente Renaissance (NEN Life Science Products), procedendo-se de acordo com o fabricante.

## **IN VITRO**

### **Ensaio de quimiossensibilidade celular**

Cultivaram-se células PC3 e C42B c-KIT positivas e c-KIT negativas numa concentração de  $5 \times 10^3$  células/ml para C42B em cada célula de placa de titulação de 96 vasos e  $2.5 \times 10^3$  células/ml para PC3

em cada célula de placa de titulação de 96 vasos no dia anterior ao experimento, em quadruplicado. Um dia após o cultivo das células, metade de cada um dos grupos (C42B c-KIT, C42B, PC3 c-KIT, PC3) recebeu o tratamento de 100 ng/ml de SCF. Após uma hora do tratamento com o ligante deu-se o início do tratamento com crescentes doses de Docetaxel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), para cada grupo celular com ou sem c-KIT e ativado, ou não, com SCF.

O Docetaxel é um agente antitumoral da família dos taxanos, que age como um inibidor de funções celulares como a divisão celular; é usado no tratamento do câncer de mama, pulmão e próstata, por exemplo. O Docetaxel foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e, antes do uso, era dissolvido em 1 ml de DMSO, com uma concentração final de 1mg/ml para estoque.

O ensaio colorimétrico com WST-1 foi realizado 48 ou 72 horas após o início do tratamento com Docetaxel. Esse ensaio é utilizado para avaliação da proliferação e viabilidade celular, o que se relaciona com a atividade global da desidrogenase mitocondrial. Conforme a viabilidade celular, os sais de tetrazolium são clivados por enzimas celulares. O formazan, então, foi quantificado por espectrofotometria (Eliza reader). Para o ensaio obedeceu-se ao protocolo do fabricante (Cell Proliferation Reagent WST-1, ROCHE Applied Science, número do catálogo 1 644 807). Uma vez utilizada a média da absorção, ela foi calculada para cada um dos tipos celulares e para cada variação celular. Com essa média,



calculou-se a taxa inibitória, subtraindo-se o valor da média de absorção a 100%. As taxas de inibição de vitalidade celular foram convertidas em probits (probability units) e as doses de Docetaxel receberam transformação logaritmica e, após isso, usou-se a análise de covariância para comparar os grupos e localizar as diferenças entre eles, usando-se o teste de post-hoc de Sidak. Para obter o  $IC_{50}$  utilizou-se a fórmula  $IC_{50} = 10^{((5-b_0)/b_1)}$  a partir dos probits da análise de covariância. Para realizar os traçados dos gráficos, lançou-se mão dos parâmetros das equações lineares de cada grupo obtido na análise de covariância e depois de uma retrotransformação de probits para percentual. Utilizou-se para esse propósito o SPSS 21 e o Sigma Plot 11.

## LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

**Figura 1:** Plasmídeo pCMV6-NEO. (página 99).

**Figura 2:** RT-PCR para a expressão de c-KIT nos clones C42b obtidos por transfecção estável. Fosforilação de c-KIT com tratamento de SCF. (página 100).

**Figura 3:** RT-PCR para a expressão de c-KIT nos clones PC3 obtidos por transfecção estável. Fosforilação de c-KIT com tratamento de SCF. (página 101).

## REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2010 Jul-Aug;59(4):225-49.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
4. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Cancer Incidence and Mortality Worldwide IARC CANCERBASE. 2008; n10.
5. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*. 1999;281(17):1591–1597.
6. D’Amico AV, Cote K, Loffredo M, Renshaw AA, Schultz D. Determinants of prostate cancer-specific survival after radiation therapy for patients with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2002; 20(23):4567–4573.
7. Morrissey C, Vessella RL. The role of tumor microenvironment in prostate cancer bone metastasis. *J Cell Biochem*. 2007, Jul 1; 101(4): 873-86.
8. Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, Gasser TC, and Mihatsch MJ (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* 31, 578–583.
9. CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1513-20.

10. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct;351(15):1502-12.
11. Scher HI, Halabi S, Tannock I, et al. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J Clin Oncol* 2008;26:1148-59.
12. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol*. 1996;14(6):1756-1764.
13. Wiesner C, Nabha SM, Dos Santos EB, Yamamoto H, Meng H, Melchior SW, et al. C-kit and its ligand stem cell factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis. *Neoplasia*. 2008 Sep;10(9):996-1003.
14. Zwick E, Bange J, and Ullrich A (2001). Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 8, 161-173.
15. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987 Nov;6(11):3341-51.
16. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*. 1990 Oct 5;63(1):235-43.
17. Huang E, Nocka K, Beier DR, Chu TY, Buck J, Lahm HW, et al. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell*. 1990 Oct 5;63(1):225-33.
18. Sette C, Dolci S, Geremia R, Rossi P. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment,

- maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol.* 2000;44(6):599-608.
19. Yoshida H, Kunisada T, Grimm T, Nishimura EK, Nishioka E, Nishikawa SI. Review: melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2001 Nov;6(1):1-5.
  20. Lev S, Blechman JM, Givol D, Yarden Y. Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lessons in signal transduction. *Crit Rev Oncog.* 1994;5(2-3):141-68.
  21. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest.* 1993 Oct;92(4):1736-44.
  22. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Nov 7;92(23):10560-4.
  23. Matsuda R, Takahashi T, Nakamura S, Sekido Y, Nishida K, Seto M, et al. Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol.* 1993 Jan;142(1):339-46.
  24. Hines SJ, Organ C, Kornstein MJ, Krystal GW. Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ.* 1995 Jun;6(6):769-79.
  25. Catalano A, Rodilossi S, Rippo MR, Caprari P, Procopio A. Induction of stem cell factor/c-Kit/slug signal transduction in multidrug-resistant malignant mesothelioma cells. *J Biol Chem.* 2004 Nov 5;279(45):46706-14.
  26. Hassan HT. c-Kit expression in human normal and malignant stem cells prognostic and therapeutic implications. *Leuk Res.* 2009 Jan;33(1):5-10.

27. Simak R, Capodiceci P, Cohen DW, Fair WR, Scher H, Melamed J, et al. Expression of c-kit and kit-ligand in benign and malignant prostatic tissues. *Histol Histopathol.* 2000 Apr;15(2):365-74.
28. Savarese DM, Valinski H, Quesenberry P, Savarese T. Expression and function of colony-stimulating factors and their receptors in human prostate carcinoma cell lines. *Prostate.* 1998 Feb 1;34(2):80-91.
29. Virtanen SS, Vaananen HK, Harkonen PL, Lakkakorpi PT. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2708-14.
30. Pulukuri SM, Gondi SC, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, Rao JS. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem.* 2005 Oct 28;280(43):36529-40. Epub 2005 Aug 26.
31. Lin DL, Tarnowski CP, Zhang J, Dai J, Rohn E, Patel AH, et al. Bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line mineralizes in vitro. *Prostate.* 2001 May 15;47(3):212-21.

## **OBJETIVO**

1. Avaliar a hipótese de que a expressão de c-KIT pelas células de câncer de próstata contribui para a reduzida sensibilidade dessa neoplasia aos agente quimioterápico Docetaxel.

**ARTIGO EM INGLÊS (PAPER)**



## ARTICLE

**Contribution of Expression of c-KIT in the Acquisition of  
Chemoresistance to Docetaxel in Prostate Cancer****Marcelo Quintanilha Azevedo<sup>1</sup>, Walter José Koff<sup>2</sup>, Fernanda  
Rossell Malinsky<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup> Urologist Physician. Fellow: Fischer International Prostate Cancer, Detroit, MI. MD, MSc. Student of the Department of Surgery of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Brazil.

<sup>2</sup> MD, PhD Professor of the Department of Surgery of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, School of Medicine, Brazil.

<sup>3</sup> PhD Student, Department of Biophysics of the Universidade Federal de São Paulo, Brazil.

## **Abstract**

*Introduction:* castration-resistant metastatic prostate tumors respond poorly to chemotherapeutic treatments. The bone microenvironment induces certain genetic alterations in prostate cancer cells, such as the c-KIT expression. Since the association of the c-KIT expression is linked to the development of chemoresistance in other tumors and the outcome of the chemotherapeutic treatment of prostate cancer with bone metastases has poor results, we hypothesized that the induction of the c-KIT expression in prostate cancer with metastases in bone tissue contributes to the reduced sensitivity of prostatic neoplasia to Docetaxel.

*Materials and Methods:* previously c-KIT negative PC3 and C42b cells, derived from bone metastasis of androgen-independent human prostate cancer and originating from bone metastases from the lumbar spine of athymic mice, respectively, underwent cell transfection and thus became c-KIT positive, mimicking the phenotypic cell changes when in bone environment. These cells were treated with increasing doses of Docetaxel and, at 48 or 72 hours of treatment, were subjected to colorimetric WST-1 assay, used to assess cell proliferation and viability, which relates to the global activity of mitochondrial dehydrogenase.

*Results:* using the half maximal inhibitory concentration index ( $IC_{50}$ ), we observed that in the experiments treated with Docetaxel for 2 days, the  $IC_{50}$  values of the groups C42b c-KIT and PC3 c-KIT, in the presence or absence of the ligand SCF, were very superior to the  $IC_{50}$  values of the groups C42b and PC3 that had not undergone the stable c-KIT transfection, in the presence or absence of the ligand SCF ( $p < 0.001$  group $\times$ dose). In experiments treated with Docetaxel for 3 days, we did not observe any statistically significant difference of  $IC_{50}$  values between the groups of C42b cells transfected or not transfected with c-KIT and PC3 cells transfected or not transfected with c-KIT, in the presence or absence of the ligand SCF, especially when using doses of Docetaxel that were more similar to the  $IC_{50}$  values found in previous experiments (treatment with Docetaxel for 2 days, doses below 10 nM of Docetaxel). In an attempt to understand the increased chemoresistance to the treatment with Docetaxel for 3 days in the groups without c-KIT transfection, we performed the cell doubling time in the groups C42b and PC3, which also showed no difference between groups (PC3 EV DT = 40 hours, PC3 c-KIT DT = 32 hours, C42b EV DT = 12 hours, C42b c-KIT DT = 14 hours).

*Conclusions:* The present study showed no increased chemoresistance of C42b and PC3 cells to the chemotherapeutic agent Docetaxel when they are transfected with c-KIT.

## Introduction

With the exception of non-melanoma skin tumors, prostate cancer is the most commonly diagnosed malignant tumor among men, with approximately two hundred and seventeen thousand new cases per year in the United States, causing approximately thirty thousand deaths annually in this country. It is the second greatest cause of death of cancer in the Western male population (1). Based on autopsy study, about 90 % of men who die of prostate cancer have bone metastases (2).

The treatment for the metastatic prostate disease is palliative. The androgen ablation is the initial treatment for patients with metastases. However, this therapy will fail for most men, and they will progress into the stage called hormone-refractory or castration-resistant tumor (3), which is regarded as the tumor that progresses regardless of the androgen deprivation therapy. The progression may be present in any combination of PSA elevation, progression of the preexisting disease and appearance of new metastases.

The standard treatment for hormone tumors resistant to androgen ablation is the combination of Docetaxel with prednisone. Docetaxel is an antitumor agent of the taxane family, which acts as an inhibitor of cellular

functions like cell division and is used in other tumors, such as breast and lung tumors. Docetaxel, when compared to Mitoxantrone, considered a first-line treatment until 2004, was superior in terms of improving pain standards, decreasing PSA, improving quality of life and increasing survival rates (4, 5).

The bone microenvironment, through a bidirectional interaction with metastatic prostate cancer cells, causes phenotypic alterations in the cells. One of these alterations is the expression of previously c-KIT negative metastatic cancerous cells of c-KIT receptors (6). Some tumors, such as GIST (gastrointestinal stromal tumor), acute myeloid leukemia (7,8), small-cell lung cancer (9), breast cancer (10) and mesothelioma (11), showed abnormal c-KIT and/or SCF expression and activation, leading to increased proliferation and to decreased tumor apoptosis. Numerous clinical studies have indicated that increased c-KIT expression and/or c-KIT mutation are strongly associated with decreased survival rates and poor prognosis for some tumors (12).

Based on the poor response of metastatic prostate tumors to chemotherapeutic agents, on the phenotypic alterations of prostate cells, expressing c-KIT when in contact with the bone microenvironment, and on the association of this cellular alteration with the worst prognosis in

other tumors, we hypothesize that the c-KIT expression in prostate cancer cells contributes to the chemoresistance of such tumors.

## **Materials and Methods**

Cell culture: we used PC3 and C42b cells in this study, which are originally derived from bone metastasis of androgen-independent human prostate cancer (13) and originated in lumbar spine bone metastases in athymic mice (14), respectively, obtained originally from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). These cells were cultured in the culture medium RMPI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), with 10% fetal bovine serum (FBS, Atlanta\_Biologicals, Lawrence-Ville, GA), 100 IE/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin, and incubated at 37° C and 5% CO<sub>2</sub>.

Cell transfection: the technique was used in order to mimic the c-KIT expression *in vitro*, so as to simulate what is observed when prostate cancer cells are in contact with the bone microenvironment. c-KIT negative PC3 and C42b cells were subjected to stable c-KIT transfection. The cell lines used were cultured one day before the transfection, in a number of  $1 \times 10^5$  cells of each line, in 500  $\mu$ l of growth medium in a 6-

well titer plate, without antibiotics, so that cells reached a 90-95% confluence at the time of the transfection. On the following day, 8  $\mu$ l (4  $\mu$ g) of the plasmid were diluted in 250  $\mu$ l of Opti-MEM<sup>®</sup>, mixing gently. The incubation was carried out for 5 minutes at room temperature. Subsequently, the diluted plasmid was combined with Lipofectamine<sup>™</sup> 2000, also diluted, mixing gently for 25 minutes at room temperature (negative control were cells cultivated in 2,5 ml of RPMI 1640 with 10% SFB) . For each culture well, 100  $\mu$ l of this solution were used. The cells were taken to the CO<sub>2</sub> incubator and incubated at 37° C and 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours. The culture medium was changed every 6 hours from the start of incubation. After the first 48 hours, the cells were split using trypsin and transferred to a 25 sq cm flask. At this moment, the treatment with G418 at the concentration of 350  $\mu$ g/ml was initiated. The cells were grown in this medium until the ones in the control group had died by using the same medium (with G418). The type of plasmid used was pCMV6-NEO (cat. SC120061 in pCMV6-NEO) (Figure 1). This vector is resistant to Geneticin.

Selection of transfectable clones: several clones were selected and the protein expression was confirmed by RT-PCR (Reverse-Time Polymerase Chain Reaction) and Western Blot. The cells transfected with c-KIT were expanded 28 days after the beginning of the treatment with

G418 and cultivated in 75 sq cm flasks ( $4 \times 10^3$  cells/flask) in complete medium without G418. When colony growth became visible, circles were drawn around them outside the flasks, using highlighters. The areas were collected with cotton swabs using trypsin. The cells were transferred to a 24-well titer plate with 1.5 ml of complete cell medium. When they expanded, they went into a 25 sq cm flask, and, whenever possible, into a 75 sq cm flask. From then on, the cells were treated with G418 again. When they reached 90% confluence, they were divided and separated by cell clones (clone number 1, number 2, etc.) once more.

RT-PCR: used to evaluate the cells transfected with c-KIT (figure 2, figure 3). To this end, the two cell lines were cultured in 100% confluence in a 24-well titer plate. These cells were subjected to RNA extraction, using the reagent Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Cat. n. 15596-026). When the RNA was resuspended, we used IScript cDNA Synthesis Kit (BioRad cat. n. 1708890), following the kit's technical standards, for the spectrophotometric analysis with BioRad Smart Spec 3000. Shortly after, we conducted the reverse transcription in the GeneAmp PCR and, using the same equipment, the PCR reaction, using the proper primers. As the PCR was completed, the agarose E-gel cassette was loaded with samples from eppendorf tubes and loaded into the E-Gel IBase Power System. After this step, the gel was ready to be used in the UV transilluminator.



Western Blot: The protein analysis was performed using the Western blot technique, both in the cells that were or were not transfected with c-KIT.

Cells treated with the antagonists were placed in lysis buffer and subsequently homogenized in cold RIPA buffer containing protease inhibitors, centrifuged at 200 g for 5 minutes, resuspended in 1 mL of buffer in conical tubes, centrifuged at 600 g for 10 minutes at 4° C. We collected the centrifugation supernatant, determined the protein concentration and stored it in 50 µL aliquots. The protein concentration present in the cultures was determined using 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific). During the procedure, 150 µL of the reagent were added to the 10 µL of the sample that was going to be dosed, according to the manufacturer's specifications. The absorbance intensity of the resulting mixture was determined at 660 nm, after 10 minutes of reaction.

Polyacrylamide / SDS Gel Electrophoresis: We resuspended 50 µg protein aliquots in 30 µL of sample buffer [Tris-HCL 500 mM, pH 6.8, glycerol, 10% SDS (sodium dodecyl sulfate), β-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue]. Then, the samples were heated in a dry bath at 95° C for 10 minutes. The total volume of the samples, as well as 10 µL of standard molecular weight for protein, were subjected to electrophoresis, applied in 12% polyacrylamide gel, at a voltage of 80 V for around 2 hours, until the proteins reached the separating gel. When the voltage

reached 120 V, the proteins were separated according to their molecular weights, having the standard as a parameter.

**Western Blotting:** After performing SDS-PAGE as described above, we performed the immunoblotting through the electrophoretic transfer (250 mA, for 1 hour) of the proteins from the polyacrylamide gel to a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with blocking solution 7.5% skimmed milk in Tris 200 mM buffer, pH 7.5, containing 500 mM NaCl, for 30 minutes, before the 12-hour incubation at 4° C, with the primary monoclonal antibody, whose dilutions were prepared according to the manufacturer's specifications, restricted to the respective proteins (1:500). Successive PBS washes were performed to remove non-specific bindings; the membrane was incubated with the secondary antibody conjugated to peroxidase, for 1 hour. The immunoreactive bands were visualized with the chemiluminescence reagent Renaissance (NEN Life Science Products), proceeding according to the manufacturer.

**Treatment of cells with Docetaxel:** PC3 C42B c-KIT positive and c-KIT negative cells were cultured at a concentration of  $5 \times 10^3$  cells/ml for C42B in each cell of 96-well titer plate and  $2.5 \times 10^3$  for PC3 in each cell of 96-well titer plate the day before the experiment, quadrupled. One day after culturing the cells, half of each of the groups (C42B c-KIT, C42B, PC3 c-KIT, PC3) received the treatment of 100 ng/ml SCF. After one

hour of treatment with the ligand, the treatment with increasing doses of Docetaxel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) started, for each cell group with or without c-KIT and activated or not activated with SCF. Docetaxel was stored at -20° C and was dissolved in 1 ml of DMSO before use, with a final concentration of 1 mg/ml for stock.

Cell chemosensitivity assay: the colorimetric WST-1 assay was carried out 48 or 72 hours after the beginning of the treatment with Docetaxel. In order to do this, we followed the manufacturer's protocol (Cell Proliferation Reagent WST-1, ROCHE Applied Science, catalog number 1 644 807).

Statistical analysis: The average absorption was calculated for each cell group and for each cell variation. Using this average, we calculated the inhibition rate by subtracting the average absorption value at 100%. The cell vitality inhibition rates were converted to probits (probability units) and the doses of Docetaxel received logarithmic transformation. After that, we used covariance analysis to compare the groups and identify differences between groups, using Sidak post-hoc test. To obtain the IC<sub>50</sub> value, we used the formula  $IC_{50} = 10^{((5-b_0)/b_1)}$  from the probits of the covariance analysis. To draw the chart lines we used the parameters of linear equations of each group obtained in the covariance analysis

followed by a retro-transformation of probits into percentages. To this end, we used SPSS 21 and Sigma Plot 11.

## Results

The experiments were divided into days of treatment with Docetaxel and into different doses of Docetaxel. The main parameter for each experiment was the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ). According to the FDA (Food and Drug Administration), the  $IC_{50}$  value represents the drug concentration required for 50% of *in vitro* cell inhibition (15).

In the experiment shown in figure 4, the C42b cells were cultured  $5 \times 10^3$  cells/ml and the treatment with Docetaxel was carried out for 48 hours. The final concentrations of Docetaxel were 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 (nM). The  $IC_{50}$  values for this experiment were C42b 2.64, C42b + SCF 13.02, C42b c-KIT 262.36, C42b c-KIT + SCF 2282919.33 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} < 0.001$ ) (figure 4).

In the experiment shown in figure the C42b cells were cultured  $5 \times 10^3$  cells/ml and the treatment with Docetaxel was conducted for 72 hours.

The final concentrations of Docetaxel for this study were 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 (nM). The  $IC_{50}$  values for this experiment were C42b 0.98, C42b + SCF 0.95, C42b c-KIT 3.94, C42b c-KIT + SCF 2.62 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} = 0.052$ ) (figure 5). Since there was a significant decrease of the difference in the  $IC_{50}$  values between the groups when the treatment was carried out for 72 hours, we conducted a new experiment (figure 6) using doses of Docetaxel similar to the  $IC_{50}$  found in the previous experiment (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 5, 25 (nM)). Again, the  $IC_{50}$  values for the groups were C42b 0.53, C42b + SCF 0.60, C42b c-KIT 0.67, C42b c-KIT + SCF 0.54 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} = 0.043$ ) (figure 6). We performed the previous experiment once again, using the same doses of Docetaxel, for 48 hours (figure 7). The results were C42b 1.45, C42b + SCF 1.38, C42b c-KIT 5.35, C42b c-KIT + SCF 6.24 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} = 0.08$ ). For PC3 cells we performed the culture of  $2.5 \times 10^3$  cells/ml with doses of Docetaxel at 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 (nM) for 48 hours (figure 8). The results of the  $IC_{50}$  values found were PC3 44.06, PC3 + SCF 39.40, PC3 c-KIT 7.28, PC3 c-KIT + SCF 4514289.14 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} < 0.02$ ). Similarly to what we did with C42b cells, the treatment was extended, in a new experiment for 72 hours, using the same doses of Docetaxel (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 (nM)) (figure 9). The results of the  $IC_{50}$  values were PC3 11.01, PC3 + SCF 8.54, PC3 c-KIT 5.10, PC3 c-KIT + SCF 8.13 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} = 0.384$ ). In an attempt to understand the increased chemoresistance to the

treatment with Docetaxel for 3 days in the groups without c-KIT transfection, we performed the cell doubling time in the groups C42b and PC3, which also showed no difference between groups (PC3 EV DT = 40 hours, PC3 c-KIT DT = 32 hours, C42b EV DT = 12 hours, C42b c-KIT DT = 14 hours) (Figures 10, 11).

## **Discussion**

The results we presented here reveal interesting aspects of the role of c-KIT expression by prostate cancer cells when in contact with the bone microenvironment. The analysis we carried out here is that the c-KIT expression by these cells would increase the chemoresistance to the treatment with Docetaxel, based on several articles that demonstrate that some tumors (6, 7) showed abnormal c-KIT and/or SCF expression and activation, leading to increased proliferation and to decreased tumor apoptosis. This guided other clinical studies to show that increased c-KIT expression and/or c-KIT mutation were strongly associated with decreased survival rates and poor prognosis for some tumors (12). The initial results of this study, using doses greater than 10 nM of final concentration of Docetaxel, treated for 48 hours, showed an increase of the  $IC_{50}$  values for the groups that underwent c-KIT transfection,

regardless of the treatment with the ligand SCF, statistically significant ( $P < 0.001$ ) and with a great difference between the  $IC_{50}$  values of the groups (the  $IC_{50}$  values found for PC3 and C42b was  $> 100$  for c-KIT groups). Nonetheless, when we performed the cell treatment with Docetaxel for 72 hours and we approached the doses of Docetaxel near the  $IC_{50}$  values found earlier (between 3 and 5) , we found  $IC_{50}$  values that are lower and are no different between groups that are and are not transfected with c-KIT.

## **Conclusions**

Even though several studies show a more aggressive tumor, resistant to the available chemotherapeutic treatments, when in the presence of c-KIT activation, this study has not demonstrated an increase in cell chemoresistance when they are transfected with c-kit. Further studies should be conducted to clarify the role of c-KIT in prostate cancer cells when in contact with the bone microenvironment.

## **Acknowledgements**

The author acknowledge the essential collaboration of Allen Saliganan, of the Center for Animal Experiments at Wayne State University, Detroit; and of Xiaoning Zen, for his technical assistance, reviews and comments.

## **Financing**

This project obtained funds from internal funds obtained by the laboratory of Dr. Ricardo Daniel Bonfil, by Wayne State University and by Karmanos Cancer Hospital, Detroit, Michigan. In terms of infrastructure, the experiments were conducted at the Urology laboratories at Wayne State University, which provide the equipment needed to develop them.



## LIST OF FIGURES IN THE ARTICLE

**Figure 1:** plasmid pCMV6-NEO (page 85).

**Figure 2:** screening of the c-KIT expression in C42b cells, by RT-PCR in the clones obtained by stable c-KIT transfection (page 86).

**Figure 3:** screening of the c-KIT expression in PC3 cells, by RT-PCR in the clones obtained by stable c-KIT transfection (page 87).

**Figure 4:** C42b, number of cultured cells =  $5 \times 10^3$  cells/ml, 48 hours of treatment with Docetaxel in the final doses of 0; 0.1; 0.5; 1; 10; 50; 100 (nM).  $IC_{50}$  C42b 2.64 C42b + SCF 13.02 C42b c-KIT 263.36 C42b c-KIT + SCF 2282919.33. ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} < 0.001$ ). (Page 88).

**Figure 5:** C42b, number of cultured cells =  $5 \times 10^3$  cells/ml, 72 hours of treatment with Docetaxel in the final doses of 0; 0.1; 0.5; 1; 10; 50; 100 (nM).  $IC_{50}$  C42b 0.98 C42b + SCF 0.95 C42b c-KIT 3.94 C42b c-KIT + SCF 2.62 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} = 0.052$ ). (Page 89).

**Figure 6:** C42b, number of cultured cells =  $5 \times 10^3$  cells/ml, 72 hours of treatment with Docetaxel in the final doses of 0; 0.1; 0.5; 1; 2; 4; 5; 25 (nM).  $IC_{50}$  C42b 0.53 C42b + SCF 0.60 C42b c-KIT 0.67 C42b c-KIT + SCF 0.54 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} = 0.043$ ). (Page 90).

**Figure 7:** C42b, number of cultured cells =  $5 \times 10^3$  cells/ml, 48 hours of treatment with Docetaxel in the final doses of 0; 0.1; 0.5; 1; 2; 4; 5; 25

(nM). IC<sub>50</sub> C42b 1.45 C42b +SCF 1.38 C42b c-KIT 5.35 C42b c-KIT + SCF 6.24 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} = 0.08$ ). (Page 91).

**Figure 8:** PC3, number of cultured cells =  $2.5 \times 10^3$  cells/ml, 48 hours of treatment with Docetaxel in the final doses of 0; 0.1; 0.5; 1; 10; 50; 100 (nM). IC<sub>50</sub> PC3 44.06 PC3 + SCF 39.40 PC3 c-KIT 7.28 PC3 c-KIT + SCF 4514289.14 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} < 0.002$ ). (Page 92).

**Figure 9:** PC3, number of cultured cells =  $2.5 \times 10^3$  cells/ml, 72 hours of treatment with Docetaxel in the final doses of 0; 0.1; 0.5; 1; 10; 50; 100 (nM). IC<sub>50</sub> PC3 11.01 PC3 + SCF 8.54 PC3 c-KIT 5.10 PC3 c-KIT + SCF 8.13 ( $P_{\text{group} \times \text{dose}} = 0.384$ ). (Page 93).

**Table 1:** Table with the results of the IC<sub>50</sub> values for the cell group C42b (Page 94).

**Table 2:** Table with the results of the IC<sub>50</sub> values for the cell group PC3 (Page 95).

**Figure 10:** Doubling time for C42b – EV and C42b c–KIT (Page 96).

**Figure 11:** Doubling time for PC3 – EV and PC3 c–KIT (Page 97).

## References

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
2. Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*. 2000 May;31(5):578-83.
3. Klein EA, Kupelian PA. Localized prostate cancer: radiation or surgery? *Urol Clin North Am*. 2003 May;30(2):315-30, ix.
4. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1513-20.
5. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1502-12.
6. Wiesner C, Nabha SM, Dos Santos EB, Yamamoto H, Meng H, Melchior SW, et al. C-kit and its ligand stem cell factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis. *Neoplasia*. 2008 Sep;10(9):996-1003.
7. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*. 1993 Oct;92(4):1736-44.
8. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 7;92(23):10560-4.

9. Matsuda R, Takahashi T, Nakamura S, Sekido Y, Nishida K, Seto M, et al. Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol.* 1993 Jan;142(1):339-46.
10. Hines SJ, Organ C, Kornstein MJ, Krystal GW. Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ.* 1995 Jun;6(6):769-79.
11. Catalano A, Rodilossi S, Rippon MR, Caprari P, Procopio A. Induction of stem cell factor/c-Kit/slug signal transduction in multidrug-resistant malignant mesothelioma cells. *J Biol Chem.* 2004 Nov 5;279(45):46706-14.
12. Hassan HT. c-Kit expression in human normal and malignant stem cells prognostic and therapeutic implications. *Leuk Res.* 2009 Jan;33(1):5-10.
13. Virtanen SS, Vaananen HK, Harkonen PL, Lakkakorpi PT. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2708-14.
14. Lin DL, Tarnowski CP, Zhang J, Dai J, Rohn E, Patel AH, et al. Bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line mineralizes in vitro. *Prostate.* 2001 May 15;47(3):212-21.
15. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/slides/3621s1d/sld036.htm>

**ARTIGO EM PORTUGUÊS**

**ARTIGO****Contribuição da Expressão de c-KIT na Aquisição de  
Quimiorresistência ao Docetaxel no Câncer de Próstata****Marcelo Quintanilha Azevedo<sup>1</sup>, Walter José Koff<sup>2</sup>, Fernanda  
Rossell Malinsky<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup> Médico Urologista. Fellow: Fischer International Prostate Cancer, Detroit, MI.

Aluno do Curso de Mestrado em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup> Médico: Professor Titular do Departamento de Cirurgia da UFRGS. Livre-Docente.

<sup>3</sup> Aluna do Doutorado do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo.

## Resumo

*Introdução:* os tumores prostáticos metastáticos resistentes à castração possuem uma pobre resposta aos tratamentos quimioterápicos. O microambiente ósseo induz a determinadas alterações genéticas nas células de câncer de próstata, como a expressão de c-KIT. Uma vez que a associação da expressão de c-KIT está ligada à aquisição de quimiorresistência em outros tumores, e o desfecho do tratamento quimioterápico em câncer de próstata com metástases ósseas tem um resultado pobre, hipotetizou-se que a indução da expressão de c-KIT em câncer de próstata metastático no tecido ósseo contribui na reduzida sensibilidade da neoplasia prostática ao tratamento quimioterápico Docetaxel.

*Material e Métodos:* células PC3 e C42b, derivadas de metástase óssea de câncer de próstata humano andrógeno independente e com origem em metástases ósseas de coluna lombar de ratos atímicos, respectivamente, previamente c-KIT negativas, foram submetidas à transfecção celular e assim tornaram-se c-KIT positivas, mimetizando as alterações fenotípicas das células, quando em ambiente ósseo. Essas células foram tratadas com doses crescentes de Docetaxel e, em 48 ou 72 horas do tratamento, foram submetidas ao ensaio colorimétrico com WST-1, que é utilizado para

avaliação da proliferação e viabilidade celular , o que se relaciona com a atividade global da desidrogenase mitocondrial.

*Resultados:* utilizando-se o índice da metade da concentração de inibição máxima ( $IC_{50}$ ), foi observado que nos experimentos com tratamento com Docetaxel por 2 dias os  $IC_{50}$  dos grupos C42b c-KIT e PC3 c-KIT, na presença ou não do ligante SCF, foram muito superiores aos  $IC_{50}$  dos grupos C42b e PC3 que não sofreram a transfecção estável do c-KIT, na presença ou não do ligante SCF ( $p < 0,001$  <sub>gruposxdose</sub>). Nos experimentos com tratamento de Docetaxel por 3 dias, não se observou diferença com significância estatística dos  $IC_{50}$  entre os grupos das células C42b transfectadas ou não com c-KIT e PC3 transfectadas ou não com c-KIT, na presença ou não do ligante SCF, principalmente quando foram usadas doses de Docetaxel mais próximas aos  $IC_{50}$  encontrados nos experimentos precedentes (tratamento com Docetaxel por 2 dias, doses inferiores a 10 nM de Docetaxel). Na tentativa de entender o aumento da quimiorresistência ao tratamento do Docetaxel por 3 dias dos grupos sem a transfecção de c-KIT, realizou-se o tempo de duplicação celular nos grupos C42b e PC3, o qual também não demonstrou diferença entre os grupos (PC3 EV TD = 40 horas, PC3 c-KIT TD 32 horas, C42b EV TD = 12 horas, C42b c-KIT TD = 14 horas).



*Conclusões:* O presente trabalho não demonstra aumento da quimioresistência das células C42b e PC3 ao quimioterápico Docetaxel quando transfectadas com c-KIT.

## **Introdução**

Excetuando-se os tumores de pele não - melanoma, o câncer de próstata é o tumor maligno mais diagnosticado em homens, com aproximadamente duzentos e dezessete mil novos casos nos Estados Unidos ao ano, causando cerca de trinta mil mortes anualmente nesse país, sendo a segunda causa de morte por câncer na população masculina ocidental (1). Com base em estudo de autópsia, cerca de 90% dos homens que morrem por câncer de próstata possuem metástases ósseas (2).

O tratamento para a doença prostática metastática é paliativo. A ablação androgênica é o tratamento inicial para os pacientes com metástases. Entretanto, a maioria dos homens irá experimentar a falha dessa terapia, evoluindo para o estágio chamado hormônio independente ou tumor resistente à castração (3), que é considerado o tumor que progride independente da terapia de deprivação androgênica. A progressão pode se apresentar em qualquer combinação de elevação do PSA, progressão da doença preexistente e aparecimento de novas metástases.

O tratamento padrão para o tumor hormônio resistente à ablação androgênica é a associação de Docetaxel com prednisona. O Docetaxel é um agente antitumoral da família dos taxanos, que age como um inibidor de funções celulares como a divisão celular, e é usado em outros tumores como o de mama e o de pulmão. O Docetaxel, quando comparado com a Mitoxantrona, tratamento considerado de primeira linha até 2004, mostrou-se superior em termos de melhora dos padrões de dor, diminuição do PSA, melhora da qualidade de vida e aumento da sobrevida (4,5).

O microambiente ósseo, através de uma interação bidirecional com as células cancerígenas metastáticas prostáticas, provoca nas células alterações fenotípicas. Uma delas é a expressão das células cancerígenas metastáticas anteriormente c-KIT negativas de receptores c-KIT (6). Alguns tumores como GIST (tumor estromal do trato gastrointestinal), leucemia mieloide aguda (7,8) câncer de pulmão de pequenas células (9), câncer de mama (10) e mesotelioma (11) mostraram expressão e ativação anormal de c-KIT e/ou SCF, o que levou a aumento na proliferação e diminuição da apoptose tumoral. Numerosos estudos clínicos indicaram que a expressão aumentada e/ou a mutação de c-KIT estão fortemente associadas com diminuição da sobrevida e pior prognóstico para alguns tumores (12).

Com base na baixa resposta dos tumores prostáticos metastáticos aos agentes quimioterápicos, nas alterações fenotípicas das células prostáticas, expressando c-KIT quando em contato com o microambiente ósseo, e a associação desta alteração celular com o pior prognóstico em outros tumores, pode a expressão de c-KIT, nas células de câncer de próstata, contribuir para a quimiorresistência desses tumores.

### **Material e Métodos**

Cultura celular: as células utilizadas neste estudo foram PC3 e C42b, que são originalmente derivadas de metástase óssea de câncer de próstata humano andrógeno independente (13) e de origem em metástases ósseas de coluna lombar de ratos atímicos (14), respectivamente, obtidas originalmente da American Type Culture Collection (Manassas, VA) . Essas células foram cultivadas em meio de cultura RMPI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), contendo 10 % de soro fetal bovino (SBF, Atlanta\_Biologicals, Lawrence-Ville, GA), 100 IE/ml de penicilina e 100 U/ml de estreptomicina e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Transfecção celular: a técnica foi utilizada com o intuito de mimetizar a expressão de c-KIT *in vitro*, de modo a simular o observado quando as

células de câncer de próstata estão em contato com o microambiente ósseo. Células PC3 e C42b c-KIT negativo foram submetidas à transfecção estável de c-KIT. As linhagens celulares utilizadas foram cultivadas um dia antes da transfecção, em um número de  $1 \times 10^5$  células de cada linhagem, em  $500 \mu\text{l}$  de meio de crescimento em placa de titulação de 6 vasos, sem antibióticos, para que, no momento da transfecção, as células estivessem com uma confluência de 90-95%. No dia posterior foram diluídos  $8 \mu\text{l}$  ( $4 \mu\text{g}$ ) do plasmídeo em  $250 \mu\text{l}$  de Opti-MEM<sup>®</sup>, misturando-se gentilmente. A incubação foi realizada por 5 minutos em temperatura ambiente. Após, foi combinado o plasmídeo diluído com o Lipofectamine<sup>™</sup> 2000, também diluído, misturando-se gentilmente por 25 minutos em temperatura ambiente (o controle negativo foram células cultivadas em 2.5 ml de RPMI 1640 com 10 % de SFB). Para cada vaso de cultura foram utilizados  $100 \mu\text{l}$  desta solução. As células foram levadas para a incubadora de CO<sub>2</sub> e incubadas a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. O meio de cultura foi trocado a cada 6 horas do início da incubação. Após as 48 horas iniciais as células foram divididas com o uso da tripsina e transferidas para um frasco de 25 cm<sup>2</sup>. Neste momento, iniciou-se o tratamento com G418 na concentração de  $350 \mu\text{g}/\text{ml}$ . As células cresceram nesse meio até que do grupo de controle tivessem morrido com o uso do mesmo meio (com G418). O tipo de

plasmídeo usado foi o pCMV6-NEO (cat. SC120061 in pCMV6-NEO) (figura 1). Esse vetor é resistente a Geneticina.

Seleção de clones transfectáveis: selecionaram-se vários clones e confirmou-se a expressão proteica por RT-PCR (do inglês, Reverse-Time Polymerase Chain Reaction) e Western Blot . As células transfectadas com c-KIT foram expandidas 28 dias após o início do tratamento com G418 e cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (4 x 10<sup>3</sup> células/frasco) em meio completo sem G418. Quando o crescimento de colônias se tornou visível, foram desenhados círculos em torno delas por fora dos frascos, com caneta marcadora de texto. As áreas foram coletadas com swabs de algodão utilizando-se tripsina e as células foram transferidas para uma placa de titulação de 24 vasos com 1,5 ml de meio celular completo. Quando se expandiram, passaram para um frasco de 25 cm<sup>2</sup> e, quando possível, para um frasco de área de 75 cm<sup>2</sup>, sendo tratadas, a partir de então, com G418 novamente. Quando atingiram a confluência de 90%, foram novamente divididas e separadas por clones celulares (clone número 1, número 2, etc.).

RT-PCR: utilizado para a avaliação das células transfectadas com c-KIT (figura 2, figura 3). Para isso, as duas linhagens celulares foram cultivadas com confluência de 100% em placa de titulação de 24 vasos.

Essas células foram submetidas à extração do RNA, utilizando-se o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Cat. n. 15596-026. Com o RNA ressuspenso, utilizou-se o IScript cDNA Synthesis Kit (BioRad cat. n. 1708890), conforme as normas técnicas do kit, para a análise espectrofotométrica no BioRad Smart Spec 3000. Logo após, realizou-se a transcrição reversa no GeneAmp PCR e, utilizando-se o mesmo aparelho, a reação PCR, com o uso dos primers adequados. Conforme o PCR era finalizado, o E-gel cassette de agarose era carregado com as amostras dos eppendorfs, e carregado no E-gel IBase Power System. Após esse passo, o gel estava pronto para ser utilizado no transiluminador ultravioleta.

Western Blot: realização da análise proteica através da técnica de Western Blot, nas células transfectadas, ou não, com c-kit. Colocadas em tampão de lise, as células tratadas com os antagonistas receberam posteriormente homogeneização em tampão RIPA refrigerado, contendo inibidores de proteases, centrifugadas a 200 g por 5 minutos, ressuspenso em 1 mL de tampão em tubo cônico, centrifugadas a 600 g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante da centrifugação foi coletado, a concentração de proteína determinada e armazenada em alíquotas de 50 µL. A concentração de proteína presente nas culturas foi determinada utilizando - se um kit de reagentes da THERMO SCIENTIFIC . No

procedimento, 10  $\mu$ L da amostra a ser dosada foram adicionadas em 150  $\mu$ L do reagente, conforme especificações do fabricante. A intensidade de absorvância da mistura resultante foi determinada a 660 nm, após 10 minutos de reação.

Alíquotas de 50  $\mu$ g de proteínas foram ressuspensas em 30  $\mu$ L de tampão de amostra [Tris-HCL 500 mM, pH 6.8, glicerol, SDS, 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol, bromofenol azul 0,05%]. A seguir, as amostras foram aquecidas em banho seco, a 95° C, por 4 minutos. O volume total delas, bem como 10  $\mu$ L de padrão de peso molecular para proteína foram submetidos à eletroforese, aplicados em gel de poliacrilamida 12%, sob uma tensão de 80 V por 10 minutos aproximadamente, até que as proteínas atingissem o gel separador. Nesse momento, a tensão foi alterada para 120 V e as proteínas, separadas de acordo com seus pesos moleculares, tendo o padrão como parâmetro. Após a realização de SDS-PAGE descrita anteriormente, deu-se o imunoblotting através de transferência eletroforética (250mA, por 1 hora) das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose. Uma solução bloqueadora 7,5% incubou a membrana de leite desnatado em tampão Tris 200 mM, pH 7.5, contendo NaCl 500mM, durante 1 h, antes da incubação por 12 horas, a 4° C, com o anticorpo monoclonal, com diluições feitas de acordo com as especificações do fabricante, restritas às respectivas proteínas (1:500). Após a incubação com o anticorpo primário



e lavagens para remoção das ligações inespecíficas, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, por 1 hora. As bandas imunorreativas foram visualizadas com reagente quimioluminescente Renaissance (NEN Life Science Products), procedendo-se de acordo com o fabricante.

Tratamento das células com Docetaxel: as células PC3 e C42B c-KIT positivas e c-KIT negativas foram cultivadas numa concentração de  $5 \times 10^3$  células/ml para C42B em cada célula de placa de titulação de 96 vasos e  $2.5 \times 10^3$  células/ml para PC3 em cada célula de placa de titulação de 96 vasos no dia anterior ao experimento, em quadruplicada. Um dia após o cultivo das células, metade de cada um dos grupos (C42B c-KIT, C42B, PC3 c-KIT, PC3) recebeu o tratamento de 100 ng/ml de SCF. Após uma hora do tratamento com o ligante, deu-se o início do tratamento com crescentes doses de Docetaxel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), para cada grupo celular com ou sem c-KIT e ativado, ou não, com SCF. O Docetaxel foi armazenado a  $-20^\circ \text{C}$  e, antes do uso, foi dissolvido em 1 ml de DMSO, com uma concentração final de 1mg/ml para estoque.

Ensaio de quimiosensibilidade celular: o ensaio colorimétrico com WST-1 ocorreu 48 ou 72 horas após o início do tratamento com Docetaxel. Para isso, obedeceu-se ao protocolo do fabricante (Cell Proliferation Reagent WST-1, ROCHE Applied Science, número do catálogo 1 644 807).

Análise estatística: calculou-se a média da absorção para cada um dos grupos celulares e para cada variação celular. Utilizando-se essa média, calculou-se a taxa inibitória, subtraindo-se o valor da média de absorção a 100%. As taxas de inibição de vitalidade celular foram convertidas em probits (probability units) e as doses de Docetaxel receberam transformação logaritmica; após isso, usou-se a análise de covariância para comparar os grupos e localizar as diferenças entre eles com o teste de post-hoc de Sidak. Para obter o  $IC_{50}$  utilizou-se a fórmula  $IC_{50} = 10^{((5-b_0)/b_1)}$  a partir dos probits da análise de covariância . Os traçados dos gráficos seguiram os parâmetros das equações lineares de cada grupo obtido na análise de covariância e uma retrotransformação de probits para percentual. Foram utilizados para este propósito o SPSS 21 e o Sigma Plot 11 .

## Resultados

Ocorreu a divisão dos experimentos por dias de tratamento com Docetaxel e por diferentes doses do mesmo. O parâmetro principal para cada experimento utilizado foi a metade inibitória da concentração máxima ( $IC_{50}$ ). De acordo com o FDA (Food and Drug Administration)  $IC_{50}$  representa a concentração da droga que é requerida para 50% da inibição celular *in vitro* (15).

No experimento da figura 4 as células C42b foram cultivadas  $5 \times 10^3$  células/ml, e realizado o tratamento com Docetaxel por 48 horas. As concentrações finais de Docetaxel foram de 0,0.1,0.5,1,10,50,100 (nM). Os  $IC_{50}$  para este experimento foram de C42b 2,64, C42b + SCF 13,02, C42b c-KIT 262,36, C42b c-KIT + SCF 2282919,33 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} < 0,001$ ) (figura 4).

No experimento da figura 5 as células C42b foram cultivadas  $5 \times 10^3$  células/ml e o tratamento com Docetaxel foi realizado por 72 horas. As concentrações finais de Docetaxel para este estudo foram de 0, 0.1,0.5,1,10,50,100, (nM). Os  $IC_{50}$  para este experimento foram de C42b 0.98, C42b + SCF 0.95, C42b c-KIT 3,94, C42b c-KIT + SCF 2,62 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} = 0,052$ ) (figura 5). Como houve uma diminuição importante da

diferença dos  $IC_{50}$  entre os grupos quando o tratamento foi realizado por 72 horas, ocorreu novo experimento (figura 6) utilizando doses de Docetaxel mais próximas aos  $IC_{50}$  encontrados no experimento anterior (0, 0,1, 0,5, 1, 2, 4, 5, 25 (nM)). Novamente os valores de  $IC_{50}$  encontrados para os grupos foram de C42b 0,53, C42b + SCF 0,60, C42b c-KIT 0,67, C42b c-KIT + SCF 0,54 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} = 0,043$ ) (figura 6). Voltou-se ao experimento anterior, utilizando-se as mesmas doses de Docetaxel, por 48 horas (figura 7). Os resultados encontrados foram de C42b 1,45, C42b + SCF 1,38, C42b c-KIT 5,35, C42b c-KIT + SCF 6,24 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} = 0,08$ ). Para as células PC3 realizou-se o cultivo de  $2,5 \times 10^3$  células/ml, com doses de Docetaxel de 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 (nM), por 48 horas (figura 8). Os resultados dos  $IC_{50}$  encontrados foram de PC3 44,06, PC3 + SCF 39,40, PC3 c-KIT 7,28, PC3 c-KIT + SCF 4514289,14 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} < 0,02$ ). Da mesma forma que as células C42b, o tratamento foi estendido em novo experimento para 72 horas, utilizando-se as mesmas doses de Docetaxel (0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 (nM)) (figura 9). Os resultados dos  $IC_{50}$  encontrados foram de PC3 11,01, PC3 + SCF 8,54, PC3 c-KIT 5,10, PC3 c-KIT + SCF 8,13 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} = 0,384$ ). Na tentativa de entender o aumento da quimiorresistência ao tratamento do Docetaxel por 3 dias aos grupos sem a transfecção de c-KIT, realizou-se o tempo de duplicação celular nos grupos C42b e PC3, o qual também não demonstrou diferença entre os grupos (PC3 EV TD =

40 horas, PC3 c-KIT TD 32 horas, C42b EV TD = 12 horas, C42b c-KIT TD = 14 horas) (Figuras 10,11)

## **Discussão**

Os resultados aqui apresentados revelam aspectos interessantes do papel da expressão de c-KIT pelas células de câncer de próstata quando em contato com o microambiente ósseo. A análise realizada é a de que a expressão de c-KIT por essas células aumentaria a quimiorresistência ao tratamento do Docetaxel, com base em vários artigos que apontam que alguns tumores (6,7) mostraram expressão e ativação anormal de c-KIT e/ou SCF, o que levou ao aumento na proliferação e diminuição da apoptose tumoral. Outros estudos clínicos evidenciaram que a expressão aumentada e/ou a mutação de c-KIT estavam fortemente associadas com diminuição da sobrevida e pior prognóstico para alguns tumores (12). Os resultados iniciais deste trabalho, utilizando-se doses maiores que 10 nM de concentração final de Docetaxel tratados por 48 horas, mostraram um aumento do IC<sub>50</sub> para os grupos que sofreram transfecção de c-KIT, independente do tratamento com o ligante SCF, estatisticamente significativo ( $P < 0,001$ ) e com uma grande diferença entre os IC<sub>50</sub> dos grupos (Os valores dos IC<sub>50</sub> encontrados para PC3 e

C42b foram  $> 100$  para os grupos c-KIT). Apesar disso, quando se realizou o tratamento celular com Docetaxel por 72 horas com aproximação das dosagens do mesmo em torno do  $IC_{50}$ , encontrados anteriormente, chegou-se ao  $IC_{50}$  de valores mais baixos, sem diferenças entre os grupos transfectados ou não com c-KIT.

## **Conclusões**

Embora diversos estudos com outros tumores mostrem um tumor mais agressivo e resistente aos tratamentos quimioterápicos oferecidos, quando na presença da ativação de c-KIT, neste trabalho não foi demonstrado um aumento da quimiorresistência das células quando transfectadas com c-KIT. Novos estudos devem ser realizados para o esclarecimento da função do c-KIT nas células de câncer de próstata quando em contato com o microambiente ósseo.

## **Agradecimentos**

O autor agradece a imprescindível colaboração de Allen Saliganan, do Centro de Experimentação Animal da Wayne State University, Detroit, e de Xiaoning Zen, pela assistência técnica, críticas e comentários.

## **Financiamento**

Este projeto obteve recursos de fundos internos obtidos pelo laboratório do Dr. Ricardo Daniel Bonfil, pela Wayne State University e Karmanos Cancer Hospital, Detroit, Michigan. Em termos de infraestrutura, foram realizados os experimentos nos laboratórios de Urologia da Wayne State University que dispõe dos equipamentos necessários para tal.

## Referências

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
2. Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*. 2000 May;31(5):578-83.
3. Klein EA, Kupelian PA. Localized prostate cancer: radiation or surgery? *Urol Clin North Am*. 2003 May;30(2):315-30, ix.
4. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1513-20.
5. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1502-12.
6. Wiesner C, Nabha SM, Dos Santos EB, Yamamoto H, Meng H, Melchior SW, et al. C-kit and its ligand stem cell factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis. *Neoplasia*. 2008 Sep;10(9):996-1003.
7. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*. 1993 Oct;92(4):1736-44.
8. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 7;92(23):10560-4.



9. Matsuda R, Takahashi T, Nakamura S, Sekido Y, Nishida K, Seto M, et al. Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol.* 1993 Jan;142(1):339-46.
10. Hines SJ, Organ C, Kornstein MJ, Krystal GW. Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ.* 1995 Jun;6(6):769-79.
11. Catalano A, Rodilossi S, Rippon MR, Caprari P, Procopio A. Induction of stem cell factor/c-Kit/slug signal transduction in multidrug-resistant malignant mesothelioma cells. *J Biol Chem.* 2004 Nov 5;279(45):46706-14.
12. Hassan HT. c-Kit expression in human normal and malignant stem cells prognostic and therapeutic implications. *Leuk Res.* 2009 Jan;33(1):5-10.
13. Virtanen SS, Vaananen HK, Harkonen PL, Lakkakorpi PT. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2708-14.
14. Lin DL, Tarnowski CP, Zhang J, Dai J, Rohn E, Patel AH, et al. Bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line mineralizes in vitro. *Prostate.* 2001 May 15;47(3):212-21.
15. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/slides/3621s1d/sld036.htm>

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

**Figura 1:** plasmídeo pCMV6-NEO (página 85).

**Figura 2:** screening da expressão de c-KIT nas células C42b, por RT-PCR nos clones obtidos por transfecção estável com c-KIT (página 86).

**Figura 3:** screening da expressão de c-KIT nas células PC3, por RT-PCR nos clones obtidos por transfecção estável com c-KIT (página 87).

**Figura 4:** C42b, número de células cultivadas =  $5 \times 10^3$  céls/ml, 48 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0; 0,1;0,5;1;10;50;100 (nM).  $IC_{50}$  C42b 2,64 C42b + SCF 13,02 C42b c-KIT 263,36 C42b c-KIT + SCF 2282919,33. ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} < 0,001$ ). (Página 88).

**Figura 5:** C42b, número de células cultivadas =  $5 \times 10^3$  células/ml, 72 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0; 0,1;0,5;1;10;50;100 (nM).  $IC_{50}$  C42b 0,98 C42b + SCF 0,95 C42b c-KIT 3,94 C42b c-KIT + SCF 2,62 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} = 0,052$ ). (Página 89).

**Figura 6:** C42b, número de células cultivadas =  $5 \times 10^3$  células/ml, 72 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0; 0,1;0,5;1;2;4;5; 25 (nM).  $IC_{50}$  C42b 0,53 C42b + SCF 0,60 C42b c-KIT 0,67 C42b c-KIT + SCF 0,54 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} = 0,043$ ). (Página 90).

**Figura 7:** C42b, número de células cultivadas =  $5 \times 10^3$  células/ml, 48 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de

0;0,1;0,5;1;2;4;5;25 (nM). IC<sub>50</sub> C42b 1,45 C42b +SCF 1,38 C42b c-KIT 5,35 C42b cKIT + SCF 6,24 ( $P_{\text{grupos} \times \text{dose}} = 0,08$ ). (Página 91).

**Figura 8:** PC3, número de células cultivadas =  $2,5 \times 10^3$  células/ml, 48 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0;0,1;0,5;1;10;50;100 (nM). IC<sub>50</sub> PC3 44,06 PC3 + SCF 39,40 PC3 c-KIT 7,28 PC3 c-KIT + SCF 4514289,14 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} < 0,002$ ). (Página 92).

**Figura 9:** PC3, número de células cultivadas =  $2,5 \times 10^3$  células/ml, 72 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0;0,1;0,5;1;10;50;100 (nM). IC<sub>50</sub> PC3 11,01 PC3 + SCF 8,54 PC3 c-KIT 5,10 PC3 c-KIT + SCF 8,13 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} = 0,384$ ). (Página 93).

**Tabela 1:** Tabela com os resultados dos IC<sub>50</sub> para o grupo celular C42b (Página 94).

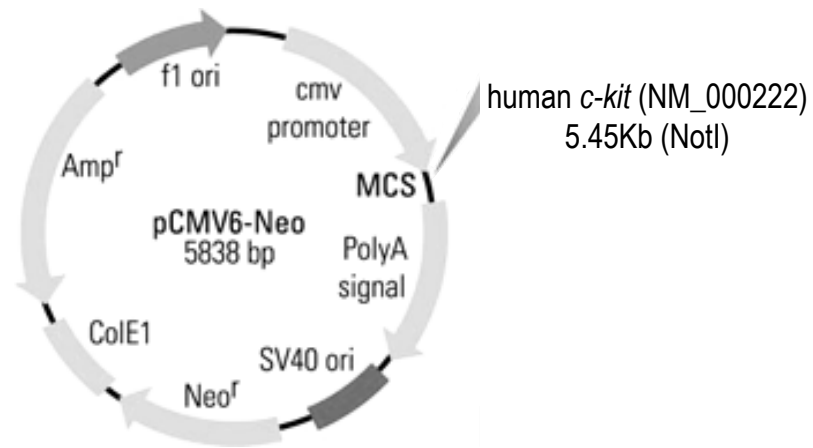
**Tabela 2:** Tabela com os resultados dos IC<sub>50</sub> para o grupo celular PC3 (Página 95).

**Figura 10:** Tempo de duplicação para C42b – EV e C42b c – KIT (Página 96).

**Figura 11:** : Tempo de duplicação para PC3 – EV e PC3 c – KIT (Página 97).

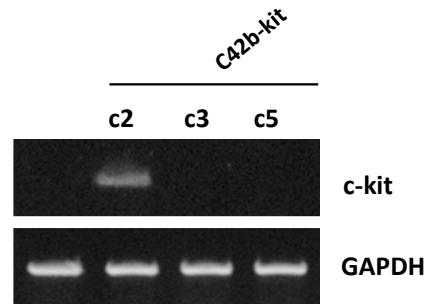
**FIGURAS DO ARTIGO**

## Plasmídeo pCMV6-Neo-c-kit

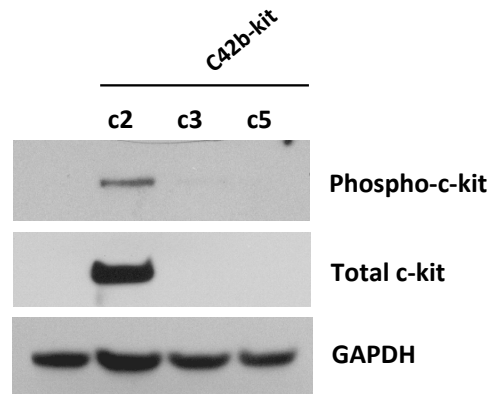


**Figura 1:** plasmídeo pCMV6-NEO

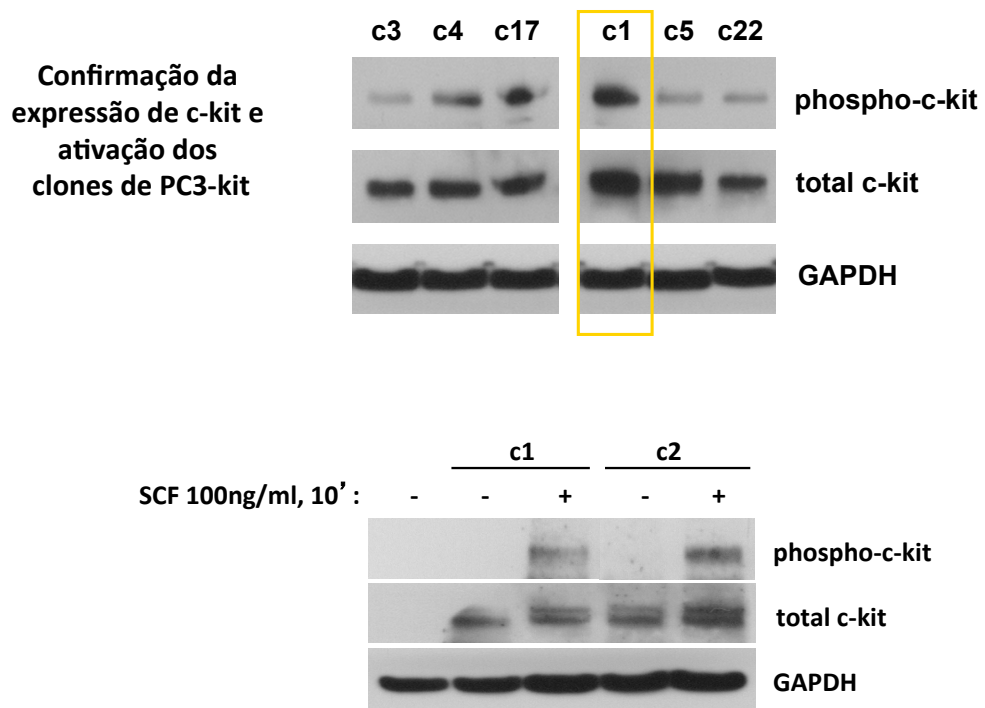
Screening da expressão de c-kit por RT-PCR em clones de C42b obtidos por transfecção estável com *c-kit*



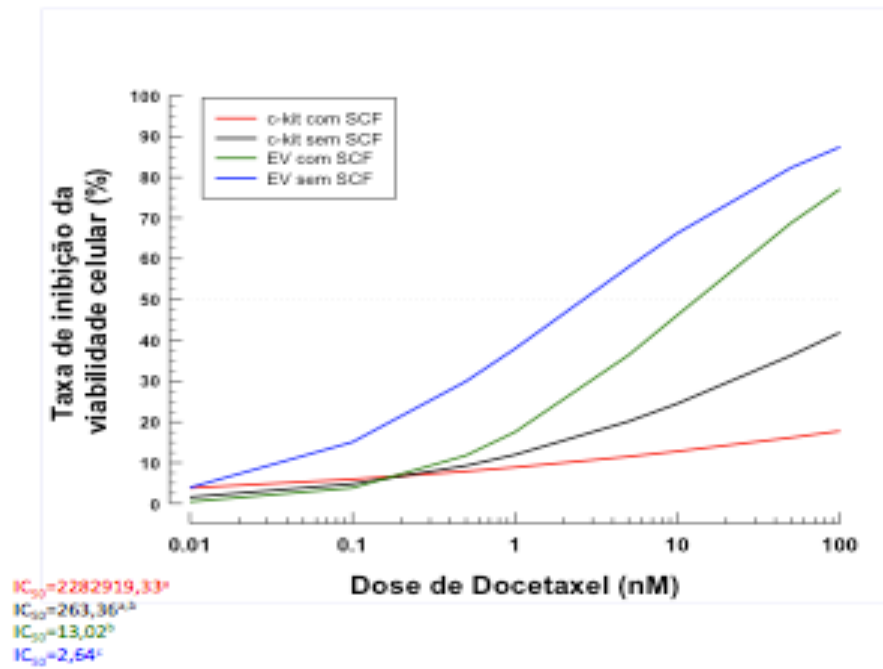
Fosforilação do c-KIT com tratamento de SCF nos clones C42b



**Figura 2:** Screening da expressão de c-KIT nas células C42b, por RT-PCR nos clones obtidos por transfecção estável com c-KIT

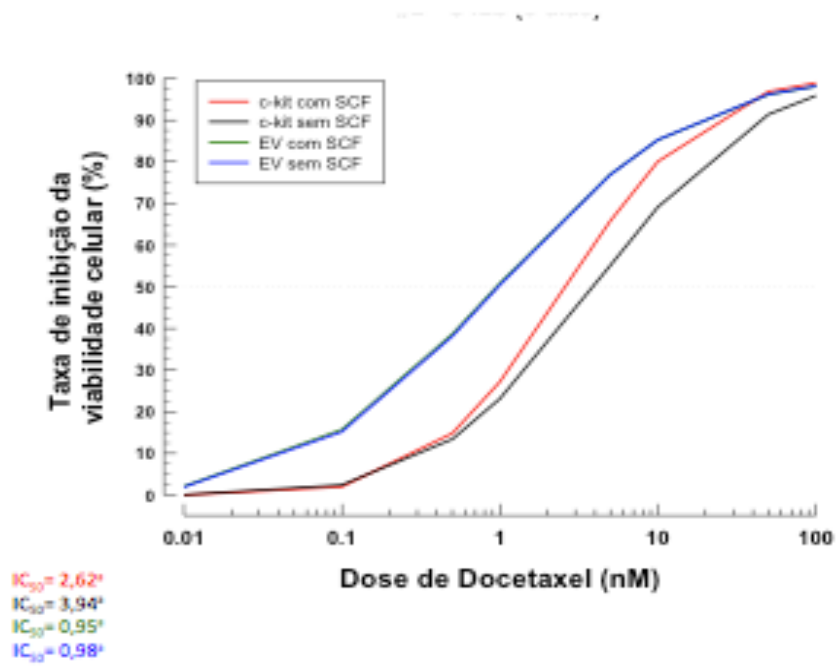


**Figura 3:** Screening da expressão de c-KIT nas células PC3, por RT-PCR nos clones obtidos por transfecção estável com c-KIT



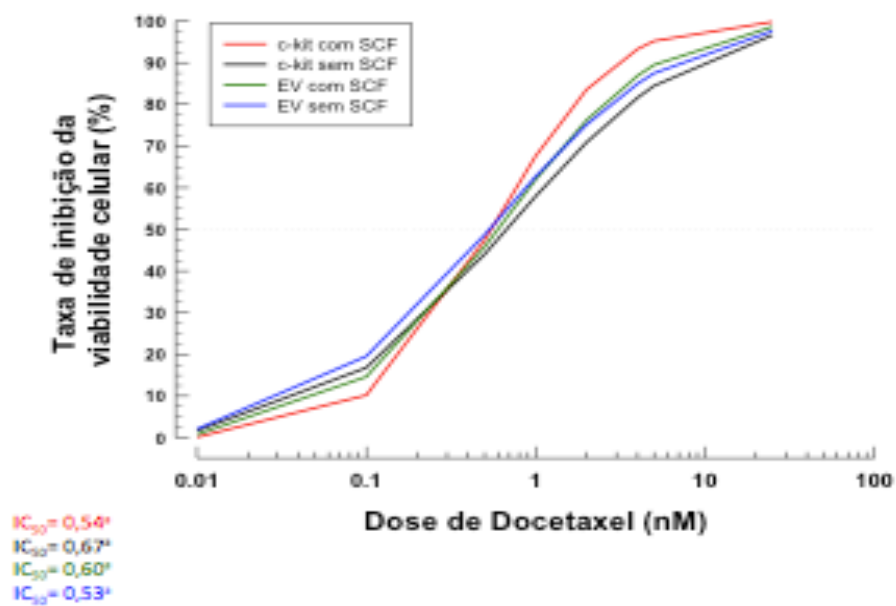
**Figura 4:** C42b,  $5 \times 10^3$  cel/ml, 2 dias de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0, 0,1,0,5,1,10,50,100 (nM)  $IC_{50}$  C42b 2,64 C42b + SCF 13,02 C42b c-KIT 263,36 C42b c-KIT + SCF 2282919,33. ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} < 0,001$ ).





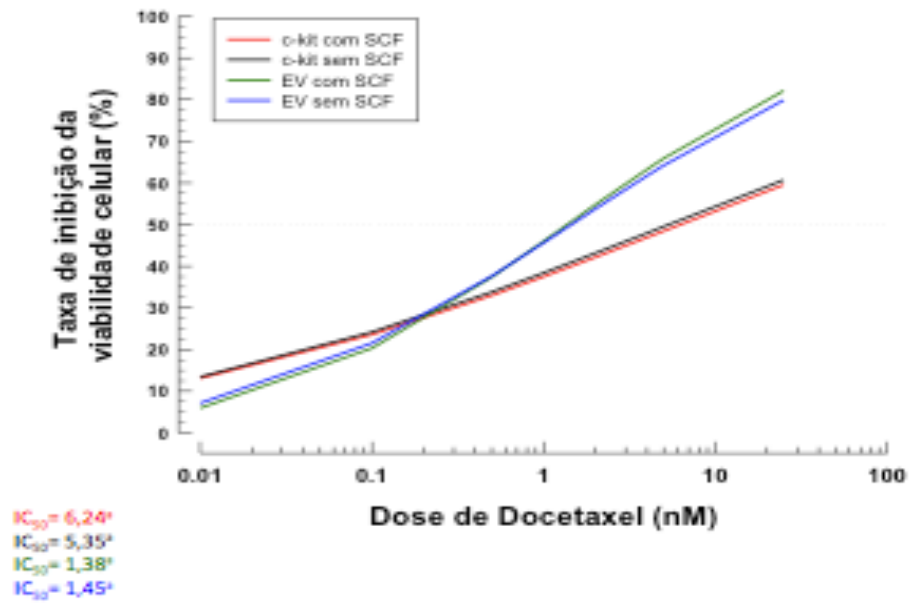
**Figura 5:** C42b, número de células cultivadas =  $5 \times 10^3$  células/ml, 72 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0, 0,1,0,5,1,10,50,100 (nM).

$IC_{50}$  C42b 0,98 C42b + SCF 0,95 C42b c-KIT 3,94 C42b c-KIT + SCF 2,62 (P grupo x dose = 0,052).



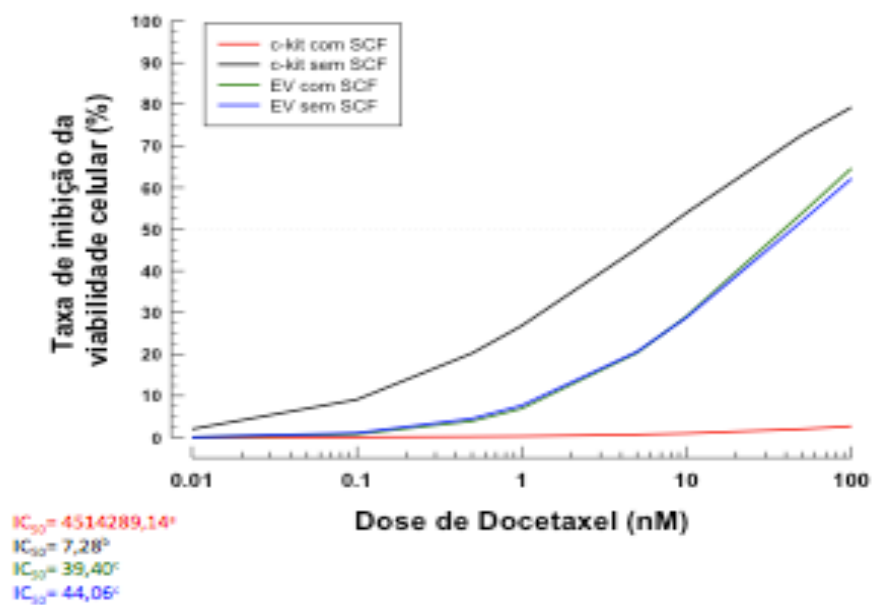
**Figura 6:** C42b, número de células cultivadas =  $5 \times 10^3$  células/ml, 72 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0, 0.1,0.5,1,2,4,5,25 (nM).

$IC_{50}$  C42b 0,53 C42b + SCF 0.60 C42b c-KIT 0,67 C42b c-KIT + SCF 0,54 (P grupo x dose = 0,043).



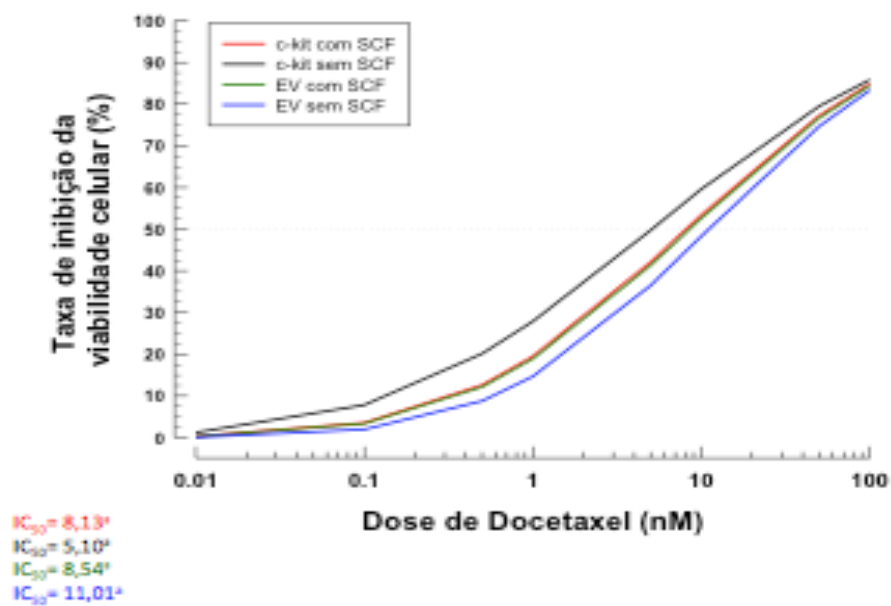
**Figura 7:** C42b, número de células cultivadas =  $5 \times 10^3$  células/ml, 48 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0, 0.1,0.5,1,2,4,5,25 (nM).

$IC_{50}$  C42b 1,45 C42b + SCF 1,38 C42b c-KIT 5,35 C42b c-KIT + SCF 6,24 (P grupo x dose = 0,08).



**Figura 8:** PC3, número de células cultivadas =  $2,5 \times 10^3$  células/ml, 48 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0, 0.1,0.5,1,5,10,50,100 (nM).

$IC_{50}$  C42b 44,06    C42b + SCF 39,40    C42b c-KIT 7,28    C42b c-KIT + SCF  
 4514289,14 ( $P_{\text{grupo} \times \text{dose}} < 0,02$ ).



**Figura 9:** PC3, número de células cultivadas =  $2,5 \times 10^3$  células/ml, 72 horas de tratamento com Docetaxel nas doses finais de 0, 0.1,0.5,1,5,10,50,100 (nM).

$IC_{50}$  C42b 11,01 C42b + SCF 8,54 C42b c-KIT 5,10 C42b c-KIT + SCF 8,13 (P

grupo x dose = 0,384).

## C42b

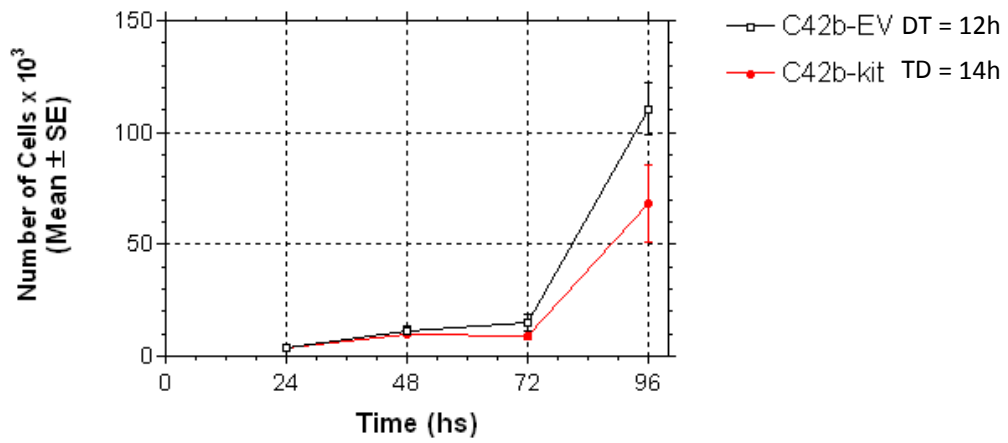
Experimento	Dias de tratamento	c-KIT c/ SCF IC <sub>50</sub>	C-KIT s/SCF IC <sub>50</sub>	EV c/ SCF IC <sub>50</sub>	EV s/ SCF IC <sub>50</sub>	P
1	2	2282919.33 <sup>a</sup>	262.36 <sup>ab</sup>	13.02 <sup>b</sup>	2.64 <sup>c</sup>	<0.001
2	3	2.62 <sup>a</sup>	3.94 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.98 <sup>a</sup>	=0.052
3	3	0.54 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	0.60 <sup>a</sup>	0.53 <sup>a</sup>	=0.043
4	2	6.24 <sup>a</sup>	5.35 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	1.45 <sup>a</sup>	=0.080

**Tabela 1:** Tabela com os resultados dos IC<sub>50</sub> para o grupo celular C42b

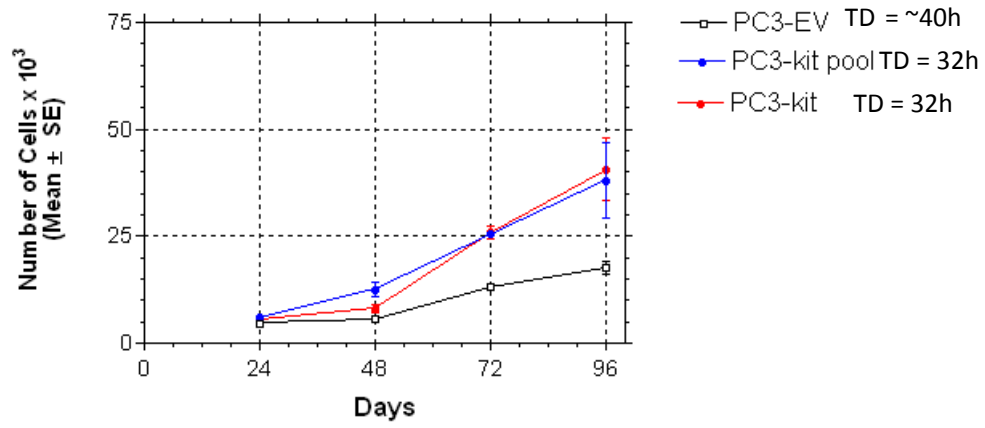
## PC3

Experimento	Dias de tratamento	c-KIT c/ SCF IC <sub>50</sub>	C-KIT s/SCF IC <sub>50</sub>	EV c/ SCF IC <sub>50</sub>	EV s/ SCF IC <sub>50</sub>	P
1	2	4514209.14 <sup>a</sup>	7.20 <sup>b</sup>	39.40 <sup>c</sup>	44.06 <sup>c</sup>	<0.002
2	3	8.13 <sup>a</sup>	5.10 <sup>a</sup>	8.54 <sup>a</sup>	11.01 <sup>a</sup>	=0.384

**Tabela 2:** Tabela com os resultados dos IC<sub>50</sub> para o grupo celular PC3.

**Tempo de duplicação para C42b-EV e C42b-c-kit****Figura 10:** Tempo de duplicação para C42b – EV e C42b c - KIT



**Tempo de duplicação para PC3-EV, PC3-KIT pool e PC3-c-kit**

**Figura 11:** : Tempo de duplicação para PC3 – EV, PC3 c-KIT pool e PC3 c - KIT