

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE**

**El papel de las plaquetas educadas en el establecimiento de  
metástasis óseas en cáncer de próstata**

**PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL**

**Caracterización de plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01 y su  
efecto sobre líneas celulares de cáncer de próstata**

**MARIANA TOLEDO LÓPEZ**

**2173027713**

**ASESORES**

**DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES**

**DR. JOSÉ FRANCISCO MIRANDA HERNÁNDEZ**

**PERIODO DE 28 DE MARZO A 28 DE SEPTIEMBRE DEL 2022**

## Introducción

A nivel mundial el cáncer de próstata (CaP) es el tipo de cáncer más diagnosticado en hombres y se considera la sexta causa de muerte en varones, ya que cada año se diagnostican 1.6 millones y 366,000 mueren a causa de este padecimiento (Rebello., *et al.* 2021; Pernar., *et al.* 2018). De igual forma en México es el cáncer más mortífero en varones, debido a que se estiman 9.8 muertes por cada 100 mil hombres (Instituto Nacional de Salud Pública, 2020).

La mayoría de los CaP tienden a crecer lentamente y no son extremadamente agresivos, ya que a menudo no provocan sintomatología hasta que se encuentra en una fase avanzada. De manera general los síntomas pueden incluir flujo miccional débil, necesidad de orinar con frecuencia, una vez que el cáncer avanza se puede presentar sangre en la orina, dificultad para iniciar la micción. Si el cáncer se ha extendido se puede presentar dolor de huesos, fatiga debido a anemia, e insuficiencia renal por obstrucción uretral bilateral (Rebello., *et al.* 2021; FDA, 2021).

En la actualidad no se han especificado los mecanismos que conducen al desarrollo y progresión del CaP ya que es una enfermedad multifocal lo que genera un problema para su comprensión, no obstante, se sabe que el CaP se desarrolla a partir del daño en el epitelio prostático, el cual puede ser originado por inflamación crónica, infección o exposición a carcinógenos, lo que conduce a la formación de la atrofia inflamatoria proliferativa y neoplasia intraepitelial prostática, los cuales se consideran precursores potenciales del CaP porque se caracterizan por el aumento de la proliferación celular (Rosenberg., *et al.* 2010). De acuerdo con Wang y colaboradores (2018) el desarrollo de la enfermedad inicia como una neoplasia intraepitelial prostática seguida de CaP localizado para dar paso a un adenocarcinoma avanzado con invasión local que va degradando la capa de las células basales, que culmina en cáncer prostático metastásico.

De igual forma, el crecimiento de las células cancerígenas del CaP depende de los andrógenos en específico la testosterona y la dihidrotestosterona, los cuales estimulan la vía de señalización del receptor de andrógenos y promueve así la regulación del ciclo celular, la supervivencia celular y la lipogénesis (Huang., *et al.* 2018; Rosenberg., *et al.* 2010).

En relación con los factores de riesgo se encuentran principalmente la edad debido a que la incidencia aumenta a medida que las personas envejecen; el origen étnico, el estilo de vida que incluye la mala alimentación y falta de ejercicio; y los antecedentes familiares (Leslie., *et al.* 2022).

El diagnóstico se basa principalmente en la prueba del antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés), la cual es una proteína producida por las células de la glándula prostática que en condiciones normales se encuentra en una mínima proporción en sangre, mientras que en el CaP tiende a filtrarse en mayor cantidad (Leslie., *et al.* 2022). De igual forma, el examen tacto rectal y las imágenes

de la próstata como es la resonancia magnética pueden proporcionar más información sobre el diagnóstico del CaP, así como una biopsia para extraer una muestra del tejido de próstata guiada por una ecografía transrectal (FDA, 2021). Por lo mismo el CaP se clasifica en grupos de riesgo bajo, intermedio o elevado en función del PSA, el estadio clínico y la escala de Gleason, esta última es la escala en la cual se evalúa el patrón glandular del tumor de la próstata, en el que se basa en dos patrones (primario y secundario) en donde el cáncer es más evidente, y se suman entre ellos. Se divide en los siguientes grados de acuerdo con la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP).

**Tabla 1. Sistema Gleason. Modificada de Bolaños & Chacón. 2017**

Sistema Gleason modificado de la ISUP		
Grado	Puntuación de Gleason	Definición
1	2-6	- Glándulas individuales, discretas y bien formadas.
2	3+4=7	- Predominantemente glándulas bien formadas con un menor componente de glándulas cribiformes, fusionadas o pobremente formadas.
3	4+3=7	- Predominantemente glándulas cribiformes, fusionadas y mal formadas con un componente de glándulas bien formadas.
4	4+4=8 3+5=8 5+3=8	- Sólo glándulas cribiformes, mal formadas, fusionadas. - Predominantemente glándulas bien formadas y un menor componente sin glándulas o necrosis. - Predominantemente ausencia de diferenciación glandular o necrosis y un menor componente de glándulas bien formadas.
5	9-10	- Ausencia de diferenciación glandular o necrosis con o sin glándulas cribiformes, mal formadas o fusionadas.

En cuanto al manejo clínico de los pacientes con CaP se debe tener en cuenta varios factores para un tratamiento apropiado con relación al riesgo y al paciente. Los tumores de bajo grado a menudo crecen de manera lenta que con frecuencia no requieren tratamiento, por lo mismo, muchos casos de bajo riesgo se supervisan mediante una vigilancia activa donde se requiere que los pacientes sean sometidos a pruebas de PSA regulares y al menos una biopsia después de 12 meses del diagnóstico original (Rebello., *et al.* 2021; Leslie., *et al.* 2022). El tratamiento para la enfermedad localmente avanzada consiste en prostatectomía radical y en radiación, ambas van a reducir la mortalidad y el riesgo de metástasis (FDA, 2021). Si la enfermedad avanza, se combina la radioterapia con terapia supresora de andrógenos (castración), ya que la testosterona promueve la supervivencia y

crecimiento de las células tumorales, por lo que al suprimir la síntesis o señalización produce atrofia de las glándulas prostáticas y la regresión del cáncer de próstata (Brawer, 2001).

A pesar de la alta supervivencia a largo plazo del cáncer de próstata localizado, el CaP metastásico sigue siendo en gran medida incurable incluso después de una terapia intensiva, por lo que es la principal causa de muerte asociada al CaP (Wang., *et al.* 2018). Los sitios más comunes donde se produce metástasis son los ganglios linfáticos locorregionales y tejido óseo. Las células cancerígenas deben abandonar el tumor primario donde se va a debilitar la adhesión célula-célula que facilitará la disociación de las células epiteliales, en donde se potencia la migración y la invasión celular. Estos procesos permiten que las células cancerosas se adapten al microambiente lo que desencadena cambios en su fenotipo. Una vez realizado esto, se produce la intravasación, la cual es la entrada activa de las células a la circulación para diseminarse por el cuerpo, donde van a atravesar la capa endotelial de los vasos para ingresar al torrente sanguíneo o a los vasos linfáticos. Una vez que las células tumorales se encuentran en circulación van a pasar por un periodo vulnerable, ya que solo una pequeña fracción de células tumorales circulantes (CTC) serán capaces de sobrevivir y extravasarse a sitios distantes. No obstante, las CTC se pueden asociar con plaquetas activadas que secretan señales protectoras que les permitirá extravasarse y formar el nicho metastásico (Rebello., *et al.* 2021 & Chitty., *et al.* 2018).

En los últimos años se ha estudiado la interacción entre las células tumorales y las plaquetas, el cual podría ser un factor que favorece la diseminación metastásica (Schlesinger, 2018). Las plaquetas son células pequeñas sanguíneas que no contienen núcleo que derivan del linaje hematopoyético de los megacariocitos, el cual es un proceso que ocurre en la médula ósea y recientemente se ha demostrado que acontece en el pulmón (Holinstat, 2017). En este proceso, el megacariocito realiza el proceso de endomitosis, que consiste en que la célula duplica su material genético y da paso a la mitosis, pero sin citocinesis, por lo que el megacariocito incrementa su tamaño. A su vez procede a la extensión de las proplaquetas que son ramificaciones citoplasmáticas, a través de los sinusoides del vaso sanguíneo de la médula ósea hasta la circulación donde son liberadas las plaquetas (Gonzalez-Villalva., *et al.* 2019., Noetzli, L. J., *et al.* 2019).

Durante mucho tiempo se ha pensado que la función principal de las plaquetas era ayudar a mantener la hemostasis y el flujo sanguíneo dentro del vaso, no obstante, estas se han visto implicadas en varios procesos como la inmunoregulación, inflamación, infecciones y la patogenicidad de enfermedades como neurodegenerativas, cardiovasculares y el cáncer (Melchinger., *et al.* 2019). Las principales funciones que se le atribuyen a las plaquetas en el cáncer son que puede potenciar las cascadas de señalización que conducen a la transición epitelial a mesénquima, pueden envolver las células tumorales diseminadas para que estas no puedan ser reconocidas por células Natural Killer para facilitar la evasión del

sistema inmune del huésped, pueden atraer a las células metastásicas a nuevos sitios mediante su interacción, y también podrían promover el ensamblaje y la estabilidad del nicho metastásico al segregar quimiocinas y factores de crecimiento (Lazar & Goldfinger, 2021).

Por otra parte, en 2010 se realizó un estudio en el que se vio que la cantidad de megacariocitos en la médula ósea aumentaba en respuesta al cáncer (Zaslavsky., *et al.* 2010). Del mismo modo, las plaquetas que han tenido interacción con las células cancerígenas y han cambiado su transcriptoma y proteoma reciben el nombre de plaquetas educadas por el tumor. Al cambiar su transcriptoma, las plaquetas pueden funcionar como biopsias líquidas al utilizar marcadores específicos de la enfermedad, lo que las convierte en un método potencialmente más sensible, seguro y mínimamente invasivo, que permitirían la detección temprana del cáncer, así como darle seguimiento a la enfermedad y supondría la identificación de nuevos objetivos para un tratamiento personalizado (Sánchez-Herrero., *et al.* 2020, In 't Veld & Wurdinger, 2019).

En relación con el cáncer de próstata, se ha reportado que existe una relación entre el recuento alto de plaquetas y las células tumorales, de hecho, varios estudios sugieren que los medicamentos antiplaquetarios y anticoagulantes podrían reducir el desarrollo de CaP (Gutiontov., *et al.* 2020). De igual forma, se ha visto que las plaquetas podrían favorecer el crecimiento tumoral, y que los gránulos de las plaquetas pueden liberar proteínas las cuales se han asociado a inducir cambios en el nicho óseo premetastásico (Kerr *et al.* 2021). Por otra parte, se ha mostrado que las plaquetas pueden estimular la extravasación de las células al inactivar el factor de transcripción PRH (proline-rich homeodomain por sus siglas en inglés) lo que produciría un aumento en los procesos de proliferación e invasión celular (Marcolino., *et al.* 2020). Las plaquetas también pueden contribuir a la metástasis mediante la agregación plaquetaria inducida por las células tumorales y su vez mejora la invasión de las células cancerosas (Rudzinski., *et al.* 2021).

A pesar de la información que existe sobre las plaquetas en el papel de cáncer de próstata, aún no están establecidos los mecanismos mediante los cuales las plaquetas interactúan con las células tumorales del CaP ni como estas interfieren en su progresión. De igual forma, a la fecha no existen modelos *in vitro* que puedan simular estas interacciones, por lo que en este proyecto se pretende establecer un modelo que permita la interacción de plaquetas con las células cancerígenas del CaP en relación con su viabilidad. Por otra parte, se utilizarán plaquetas obtenidas mediante la línea celular MEG-01 debido a que estas presentarán menor variabilidad biológica, al establecer condiciones específicas para su obtención, así como se utilizarán dos líneas celulares de CaP, debido a que las LNCaP presentan un estadio más temprano de la enfermedad, mientras que las PC3 presentan un estadio más avanzado. Al establecer el modelo *in vitro* dará paso a un mayor conocimiento sobre la relación plaquetas-células de CaP y así visualizar el efecto

de estas en la viabilidad de las células de CaP y su relación con la progresión de la enfermedad.

### **Objetivo general**

- Caracterizar el efecto de plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01 sobre la viabilidad de líneas celulares de cáncer de próstata.

### **Objetivos específicos**

- Obtener plaquetas mediante la diferenciación de la línea celular MEG-01.
- Caracterizar por ensayos funcionales y marcadores específicos a las plaquetas.
- Evaluar el efecto de las plaquetas sobre la viabilidad de las líneas celulares.

### **Materiales y métodos**

#### 1. Cultivos celulares

Se utilizó una línea celular de megacarioblastos MEG-01 (CRL-2021™), y dos líneas celulares de cáncer de próstata, LNCaP (CRL-1740™) y PC3 (CRL-1435™) obtenidas de ATCC (The American Type Culture Collection). El cultivo celular se realizó con medio RPMI 1640 (Corning® 10-040-CM) con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco® 16000044). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 2. Obtención de plaquetas a partir de la línea celular MEG-01

##### *Diferenciación de MEG-01 con ácido valproico*

De acuerdo con el análisis bibliográfico, los megacarioblastos entran en proceso de diferenciación mediante ácido valproico (AVP) de manera *in vitro* (Dhenge., *et al.* 2018). Para determinar la concentración óptima se realizó una curva a diferentes concentraciones de AVP. Se sembraron un promedio de 2 millones de MEG-01 en cajas Petri y se mantuvieron en medio RPMI con SFB al 10% por 48 horas. Pasado este tiempo, se reemplazó el medio por RPMI sin SFB, con el objetivo de inhibir el ciclo celular, posteriormente se les añadió AVP. Se tomaron 6 grupos, los cuales dos fueron control, uno de ellos no se le añadió AVP, mientras que el otro se mantuvo con SFB al 10%. Las concentraciones utilizadas fueron 1, 2, 3 y 4 mM. Se mantuvieron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta 96 horas donde se evaluó la diferenciación de megacariocitos hasta la formación de plaquetas.

### *Obtención y purificación de plaquetas mediante centrifugación*

Una vez obtenida la mejor concentración de AVP, se determinó la velocidad de centrifugación diferencial adecuada para la obtención y purificación de las plaquetas obtenidas. Se compararon 4 diferentes velocidades de centrifugación que se muestran en la **Tabla 2. Métodos de centrifugación diferencial para el aislamiento de plaquetas**. La primera centrifugación tiene el objetivo de eliminar las células al sedimentarse, mientras que la segunda centrifugación tiene como objetivo el sedimentar las plaquetas para poder resuspenderlas en buffer HEPS para realizar el conteo plaquetario mediante la cámara de Neubauer. Para determinar la pureza, se tomó el criterio de exclusión de 1 a 5 células por cada millón de plaquetas.

**Tabla 2. Métodos de centrifugación diferencial para el aislamiento de plaquetas.**

Método	Primera centrifugación		Segunda centrifugación	
	Fuerza g	Tiempo	Fuerza g	Tiempo
A	80g	25 minutos	1500g	15 minutos
B	150g	15 minutos	1500g	15 minutos
C	180g	15 minutos	1500g	15 minutos
D	200g	15 minutos	1500g	15 minutos

### 3. Caracterización de plaquetas obtenidas de MEG-01

#### *Estudio de inmunofluorescencia*

Las plaquetas se aislaron y purificaron de acuerdo con el protocolo establecido anteriormente (180g x 15 minutos – 1500g x 15 minutos) y fueron resuspendidas en RPMI. Se pasaron a una caja de 48 pozos previamente tratada con poly-L-lisina (SigmaAldrich® P4707) para fijarlas. Se dejaron durante 5 días a 37°C. Después de lavar las plaquetas 2 veces con PBS, se incubaron con el anticuerpo  $\alpha$ -CD41 (abcam® ab134131) en una concentración de 1:50 durante 45 minutos. Se lavaron 2 veces con PBS nuevamente y se incubaron con Alexa Fluor™ Plus 488 (1:500) por 1 hora dejándolas en la oscuridad. Pasado este tiempo se volvieron a lavar con PBS y se obtuvieron las imágenes de fluorescencia mediante el microscopio de fluorescencia (EVOS® FLc).

#### *Ensayo de agregación plaquetaria*

Para estudiar la agregación de las plaquetas, se llevó a cabo un ensayo con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), en el cual las plaquetas se resuspendieron en PBS una vez purificadas, y se les añadió  $\text{CaCl}_2$  a diferentes concentraciones que fueron 10, 20, 25 y 30 mM.

#### 4. Ensayos de viabilidad de líneas celulares de cáncer de próstata en contacto con plaquetas

##### *Cocultivos con líneas celulares PC3 y LNCaP*

Se sembraron 15,000 células LNCaP y PC3 en cajas de 48 pozos con medio RPMI con SFB al 10%, y se mantuvieron en las condiciones previamente mencionadas. Se dejaron proliferar hasta alcanzar una confluencia del 50%. Pasado esto, el medio fue reemplazado por RPMI más 0.1% de SFB para inhibir la proliferación celular. Posteriormente, se les añadió diferentes concentraciones de plaquetas resuspendidas en buffer HEPS. Las concentraciones ocupadas por cada célula fueron: 50, 100, 200, 300 y 400 plaquetas por cada célula tumoral. Se dejaron en incubación por 72 horas para después medir la viabilidad celular.

##### *Ensayos de viabilidad por MTT*

Las células fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar las plaquetas del medio. Se añadió 200 µL de solución de MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium] (abcam® ab211091) al 15% diluido en RPMI, y se dejaron en incubación a 37°C por 3 horas. Pasado este tiempo se le añadió 200 µL de SDS al 10% y se dejó toda la noche en agitación para disolver los cristales de formazán formados. La absorbancia se leyó a 590 nm en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (Biotek, Microplate Spectrophotometer).

#### 5. Análisis estadístico

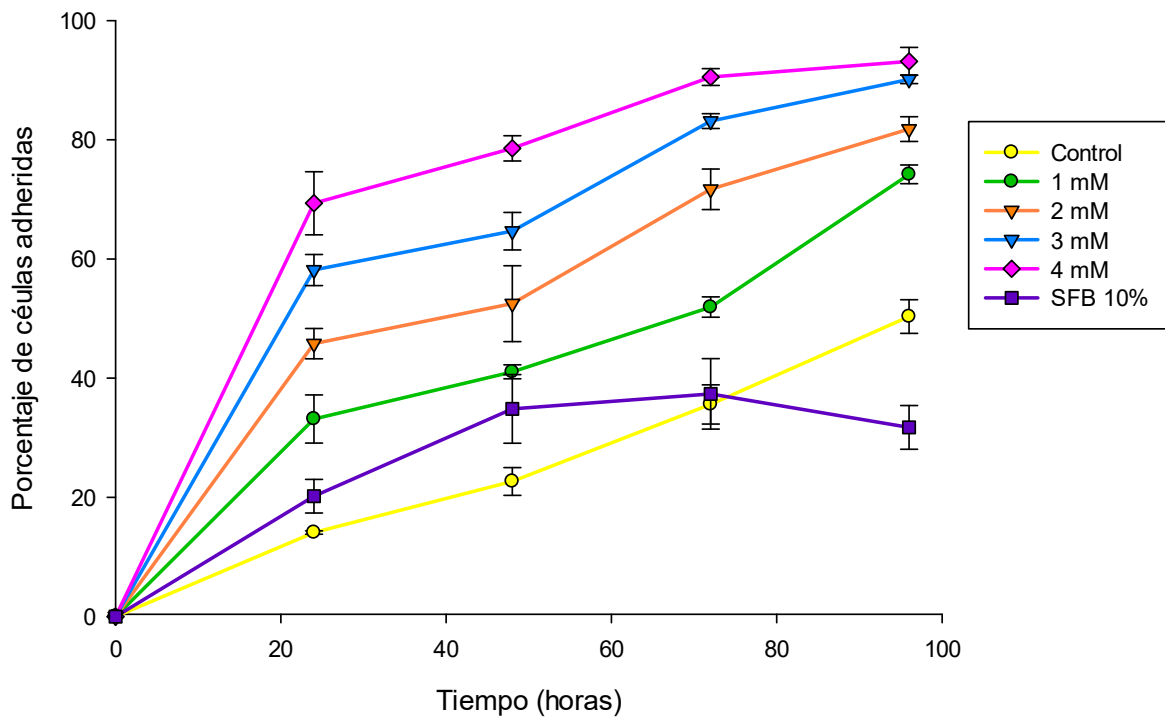
Los datos obtenidos de las pruebas fueron analizados en el software SigmaPlot® 12. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba de Dunnett, donde los valores de  $p > 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos donde  $*=p \leq 0.05$ ,  $**=p \leq 0.01$ ,  $***=p \leq 0.001$ ,  $****=p \leq 0.0001$ . Para todos los ensayos se consideró una  $n=3$  con su respectivo triplicado técnico.

## **Resultados**

### ***I. Obtención y purificación de plaquetas***

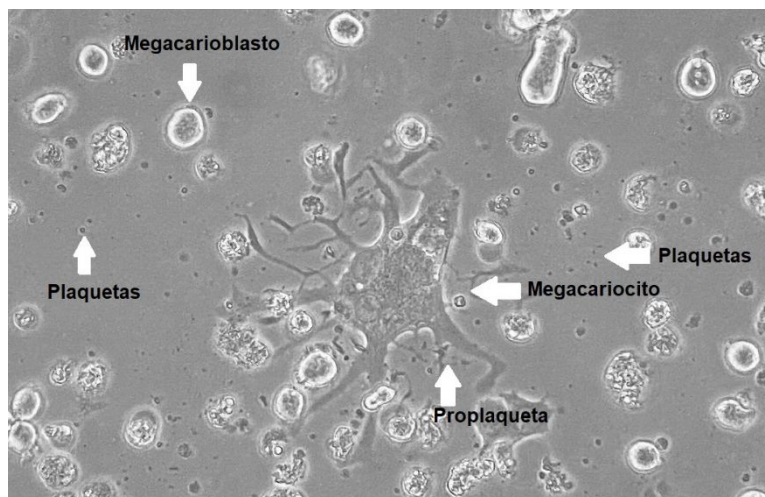
Para la diferenciación de megacarioblastos a plaquetas se utilizó ácido valproico. Se utilizaron 4 concentraciones diferentes y se determinó el porcentaje de las células adheridas a la placa contándolas al observarlas al microscopio (**Gráfico 1. Diferenciación de MEG-01 mediante distintas concentraciones de ácido valproico**). Curva de concentraciones crecientes de AVP (1, 2, 3 y 4 mM) con su grupo control y un grupo que contenía SFB al 10%. Se puede ver que la concentración de 4 mM fue la que obtuvo un mayor porcentaje de células adheridas, por lo que se decidió utilizar esta concentración para los experimentos posteriores.





**Gráfico 1. Diferenciación de MEG-01 mediante distintas concentraciones de ácido valproico.** Curva de concentraciones crecientes de AVP (1, 2, 3 y 4 mM) con su grupo control y un grupo que contenía SFB al 10%.

En la **Imagen 1** se puede observar el proceso de diferenciación a las 96 horas con una concentración de 4 mM de ácido valproico. El megacariocito aumentó de tamaño al compararlo con el megacarioblasto que no se alcanzó a diferenciar. A su vez también, se logran ver las proplaquetas que son las ramificaciones, y alrededor de estas se observan las plaquetas.



**Imagen 1. Diferenciación de megacariocitos con concentración de 4mM de AVP en un objetivo de 60X.**

Para determinar el mejor método de obtención y purificación de plaquetas, se probaron 4 diferentes métodos de centrifugación que habían sido reportados en la literatura (Schweinfurth., *et al.* 2010). Para determinar el número de plaquetas se contaron mediante la cámara de Neubauer y se tomó el criterio de exclusión de 1 a 5 células por cada millón de plaquetas.

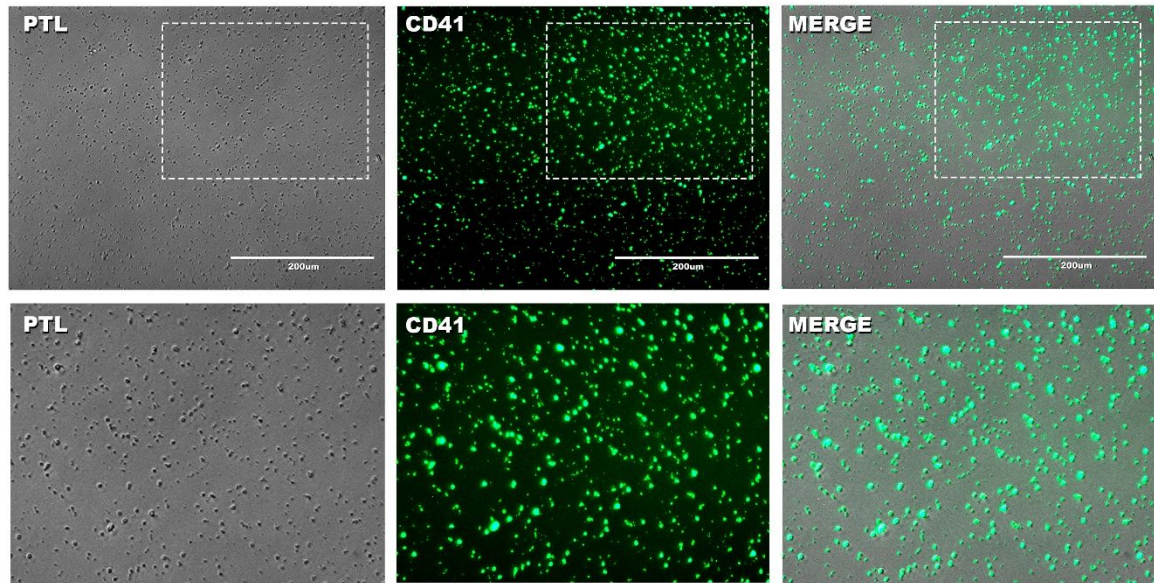
**Tabla 3. Métodos de centrifugación y conteo de plaquetas.**

Método	Primera centrifugación		Segunda centrifugación		Número de plaquetas	Número de células
	Fuerza g	Tiempo	Fuerza g	Tiempo		
A	80g	25 minutos	1500g	15 minutos	159,000	4.0
B	150g	15 minutos	1500g	15 minutos	171,000	3.75
C	180g	15 minutos	1500g	15 minutos	194,000	1.25
D	200g	15 minutos	1500g	15 minutos	144,000	0.5

De acuerdo con el número de plaquetas obtenidas y su pureza (**Tabla 3. Métodos de centrifugación y conteo de plaquetas**) se eligió el método C para obtener y purificar a las plaquetas para las siguientes pruebas a realizar debido a que presentó un mayor número de plaquetas y una pureza dentro del criterio establecido.

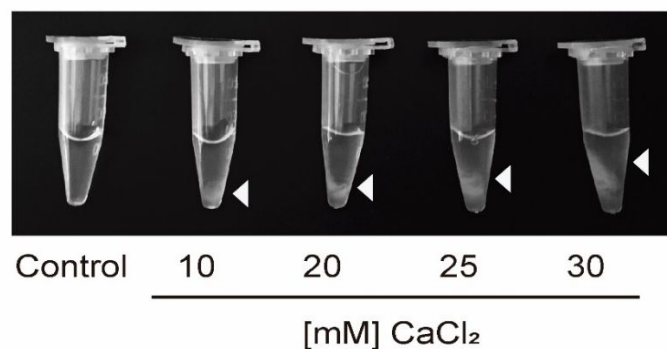
## **II. Caracterización de plaquetas obtenidas de MEG-01**

Se utilizaron dos métodos para la caracterización de las plaquetas obtenidas de la línea celular MEG-01. El primer ensayo fue de inmunofluorescencia en el cual se utilizó  $\alpha$ -CD41, el cual es un anticuerpo monoclonal de la glicoproteína transmembranal GPII b, que se expresa en el linaje de megacariocitos y plaquetas. Como se observa en la **Imagen 2. Ensayo de fluorescencia**. Las plaquetas obtenidas de la línea celular MEG-01 expresaron el marcador de superficie CD41., las plaquetas aisladas fueron positivas para CD41.



**Imagen 2. Ensayo de fluorescencia.** Las plaquetas obtenidas de la línea celular MEG-01 expresaron el marcador de superficie CD41.

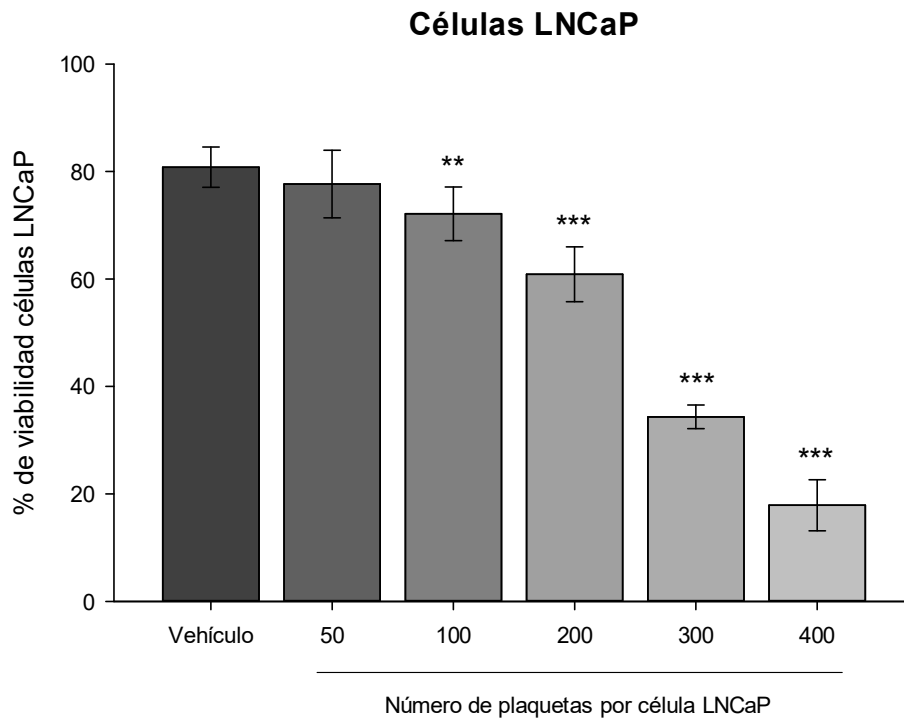
El segundo ensayo fue de agregación plaquetaria y se realizó con  $\text{CaCl}_2$ , el cual es un activador de plaquetas que permite la adhesión, agregación y secreción de gránulos que estas liberan (Toyoda., *et al.* 2018). Como se ve en la **Imagen 3. Ensayo de agregación plaquetaria.** Curva de concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  (10, 20 y 30 mM). La flecha blanca indica la agregación plaquetaria después de 15 minutos., conforme se va aumentando la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , incrementa la agregación de las plaquetas.



**Imagen 3. Ensayo de agregación plaquetaria.** Curva de concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  (10, 20, 25 y 30 mM). La flecha blanca indica la agregación plaquetaria después de 15 minutos.

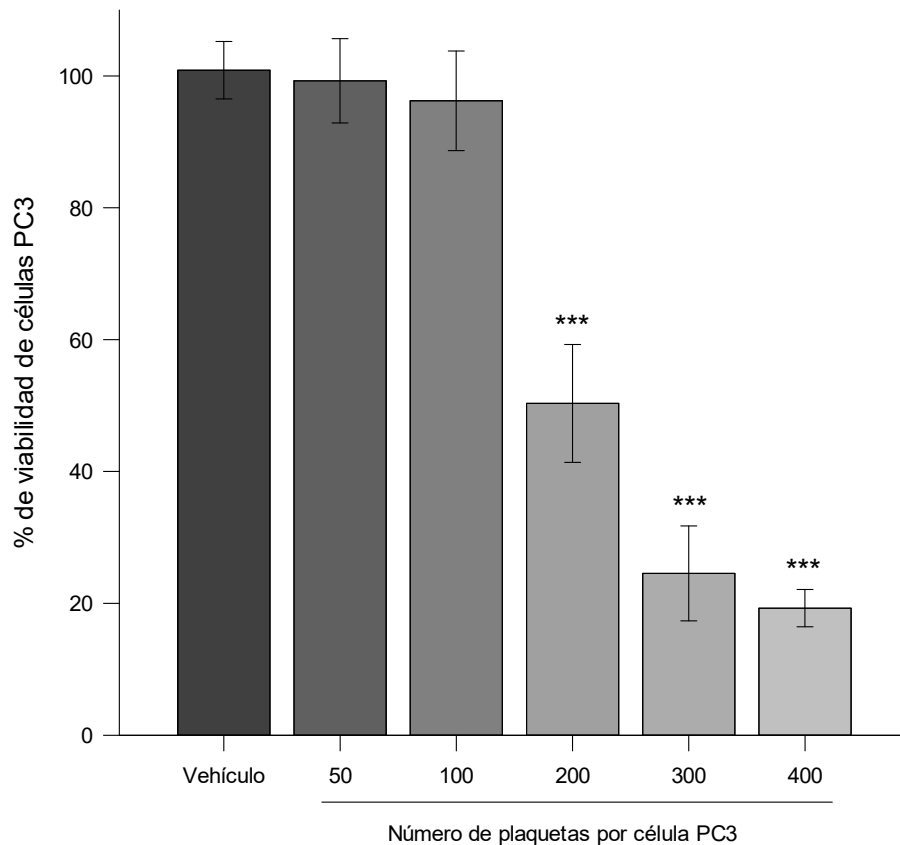
### III. *Ensayos de viabilidad líneas celulares de cáncer de próstata en contacto con plaquetas*

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de próstata, células LNCaP que presentan un estadio temprano del cáncer de próstata, y células PC3 que representan una etapa más avanzada de la enfermedad. En el **Gráfico 2**, se puede observar el porcentaje de viabilidad al poner en contacto las células LNCaP con las plaquetas a diferentes concentraciones y se observa que la única concentración que no presentó diferencia significativa es la de 50 plaquetas por cada célula tumoral. Así mismo, en el **Gráfico 3** se muestra el porcentaje de viabilidad de células PC3 al tener contacto con las plaquetas, y se puede determinar las dos concentraciones donde no hay diferencia significativa que es 50 y 100 plaquetas por cada célula PC3, sin embargo, para futuros ensayos se prefiere usar la concentración de 1 célula tumoral por cada 100 plaquetas debido a que se sugiere una mayor concentración de plaquetas para un mejor análisis de estas.



**Gráfico 2. Porcentaje de viabilidad de células LNCaP.** El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba de Dunnett, donde los valores de  $p > 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. La comparación se realizó contra el vehículo.

### Células PC3



**Gráfico 3. Porcentaje de viabilidad de células PC3.** El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba de Dunnett, donde los valores de  $p > 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. La comparación se realizó contra el vehículo.

### Discusión

Desde 1868 se describió la interacción entre las plaquetas y el cáncer, sin embargo, solamente señalaban que la coagulación es común en pacientes con cáncer. No fue hasta el 2010 que empezaron los estudios para visualizar el vínculo bidireccional entre las plaquetas y el cáncer (Varkey & Nicolaidis. 2021). Al principio se postuló que las plaquetas al agregarse y activarse contribuían a la progresión tumoral, sin embargo, ahora se sabe que la interacción entre las plaquetas y el cáncer es mucho más compleja, que podrían abarcar una serie de pasos desde la fase intravascular hasta la extravasación en el nicho de las células tumorales (Yan & Jurasz. 2016). A pesar de los estudios que se han realizado, aún no se conoce el mecanismo mediante el cual las plaquetas interactúan con las células tumorales y como estas podrían favorecer la progresión de la enfermedad. Además, las plaquetas en presencia de cáncer tienen la capacidad de modificar su transcriptoma, lo que se conoce como plaquetas educadas por tumores, sin embargo, tampoco se conocen

los posibles mecanismos de “educación”. A la fecha no existe un modelo *in vitro* de cocultivo de células tumorales y plaquetas que permita estudiar su interacción. Por lo que en este trabajo se caracterizó un modelo de cocultivo de plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01 y líneas celulares de cáncer de próstata, en donde inicialmente se evaluó la viabilidad celular con la finalidad de obtener una concentración óptima de plaquetas por cada célula tumoral, lo que permitirá a futuro conocer los efectos de las plaquetas sobre las líneas celulares, así como el efecto de las líneas celulares sobre las plaquetas.

La importancia por la cual se utilizaron plaquetas obtenidas de la línea celular MEG-01, es debido a que estas no presentan variabilidad biológica, en comparación con plaquetas de donantes sanos. Para poder obtener plaquetas se utilizó ácido valproico el cual es un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), que produce la diferenciación y proliferación celular, y se ha demostrado que estimula la megacariopoyesis en células precursoras hematopoyéticas (Liu., *et al.* 2010). Los megacariocitos al diferenciarse presentan cambios morfológicos como extensiones del citoplasma y un mayor número de núcleos, tal como mencionan Dhenge y colaboradores (2018). Previamente se ha reportado que el tratamiento con ácido valproico a una concentración de 2 mM induce la diferenciación de megacariocitos y obtención de plaquetas, sin embargo, en el presente estudio se encontró que con una concentración mayor de ácido valproico (4 mM) se pueden obtener plaquetas en menor tiempo (96 horas).

Las plaquetas obtenidas de la línea celular MEG-01 muestran el mismo comportamiento de las plaquetas obtenidas de humanos, ya que, al presentar el marcador de superficie CD41, el cual al reconocer a la glicoproteína de membrana GPIIb puede asociarse a la GPIIIa y así mediar la agregación plaquetaria. Y de igual forma se evaluó al utilizar  $\text{CaCl}_2$ , que activó la vía intrínseca de coagulación, la cual activa el factor XII en presencia de calcio donde convierte la protrombina en trombina que esta última activa a las plaquetas mediante receptores como el que el complejo GPIIb/IIIa (Waqar., *et al.* 2021., Toyoda., *et al.* 2018 & Zhang., *et al.* 2021). Posterior a la caracterización morfológica y funcional de las plaquetas obtenidas de la línea MEG-01, se deduce que comparten características similares a las plaquetas obtenidas en humanos como se muestra en el estudio de Blair & Frelinger (2019).

En la actualidad, existe poca información del papel de las plaquetas en relación con la metástasis de CaP e incluso se sabe menos sobre la interacción de las plaquetas con los estados del CaP dependientes de andrógenos y resistente a andrógenos. Por lo que al utilizar diferentes líneas celulares de CaP, permite evaluar el efecto de las plaquetas en diferentes etapas de la enfermedad (Gaupel., *et al.* 2013). Para estudiar el papel de las plaquetas en el CaP, fue necesario determinar en primer lugar la concentración a la cual las plaquetas no fueran citotóxicas, por lo que se establecieron cocultivos de contacto directo entre líneas celulares de cáncer de próstata con diferentes concentraciones de plaquetas. En el caso de las células LNCaP la concentración a la cual no resulta citotóxica es de 50 plaquetas por cada

célula tumoral, mientras que para las células PC3, la concentración óptima fue de 1:100. Las células LNCaP expresan el receptor de andrógenos, mientras que las células PC3 carecen de la expresión de este receptor y representan un estado más agresivo de la enfermedad. En un estudio realizado por Rudzinski y colaboradores (2020) observaron que las células que son resistentes a la castración tienen la capacidad de activar plaquetas debido a que expresan protombina, lo que podría aumentar el potencial agresivo del CaP. Así mismo, Xu y colaboradores (2013) mencionan que las células resistentes a la castración producen el factor activador de plaquetas, el cual es un metabolito del ácido araquidónico que juega un papel importante en la supervivencia celular. Por lo que el efecto de la viabilidad observada en este estudio concuerda con la literatura, donde las células resistentes a la castración tienden a resistir más por las características que presentan.

Una vez establecidas las condiciones necesarias para hacer el cocultivo entre plaquetas y células de cáncer de próstata, se podrá evaluar la interacción que ocurre entre ambas, que como se mencionó anteriormente, es una interacción bidireccional. En algunos tipos de cáncer como el de ovario, se ha observado que las plaquetas tienen la capacidad de promover un fenotipo más agresivo de la enfermedad (Guo., et al. 2019), sin embargo, en cáncer de próstata este efecto aún no ha sido evaluado, lo cual podría realizarse con el método de cocultivo establecido en este trabajo. El establecimiento de este modelo permitirá evaluar los posibles mecanismos de “educación” de plaquetas, así como la identificación de posibles biomarcadores específicos de cáncer de próstata. Heinhuis y colaboradores (2020) mencionan que el cambio en el transcriptoma puede ser exclusivo de cada tipo de cáncer debido a que las plaquetas pueden albergar y expresar ácidos nucleicos y proteínas específicos del tumor (Varkey & Nicolaidis. 2021). Esto es importante ya que al utilizar la línea celular de MEG-01 para la obtención de plaquetas, permitirá observar si el cambio en el transcriptoma es órgano dependiente, ya que la línea celular fue obtenida de un paciente que padecía leucemia mieloide crónica. Por lo que la identificación de marcadores específicos de cáncer de próstata confirmaría la hipótesis de que la educación es órgano dependiente.

Por otra parte, el tumor puede establecer comunicación con la médula ósea, donde se podría alterar el perfil transcripcional de los megacariocitos a través de citocinas o vesículas extracelulares, lo que podría alterar el transcriptoma de las plaquetas, siendo uno de los posibles mecanismos de educación plaquetaria, sin embargo, a la fecha esto no se ha estudiado (Varkey & Nicolaidis. 2021). La diferenciación y obtención de plaquetas *in vitro* permitirá estudiar las posibles alteraciones en el megacariocito y las plaquetas en presencia de cáncer. Por consiguiente, con los datos que se podrían obtener al analizar el transcriptoma de las plaquetas educadas por las células de cáncer de próstata, permitirían el descubrimiento de posibles biomarcadores, favoreciendo el uso de las plaquetas como una fuente de biopsias líquidas, no sólo para detectar el cáncer, sino también para determinar en la etapa

de la enfermedad, así como en la búsqueda de posibles tratamientos específicos para cada tipo de paciente.

## Conclusiones

Se obtuvieron plaquetas a partir de la diferenciación de la línea celular MEG-01 y se evaluó el efecto sobre la viabilidad de dos líneas celulares de cáncer de próstata. Las células PC3 se asociaron a una mayor viabilidad en comparación de células LNCaP. Se logró establecer un modelo *in vitro* de cocultivo de plaquetas y células tumorales de cáncer de próstata, lo que permitirá estudiar la interacción bidireccional entre plaquetas y células de cáncer de próstata.

## Perspectivas

Evaluar el efecto de las plaquetas sobre la progresión de la enfermedad, mediante ensayos de migración, invasión y proliferación celular.

Evaluar el transcriptoma de las plaquetas expuestas a líneas celulares de cáncer de próstata para la identificación de posibles biomarcadores específicos de cáncer de próstata.

## Bibliografía

1. Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., *et al.* (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). doi:10.1038/s41572-020-00243-0
2. Parnar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., & Mucci, L. A. (2018). The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a030361. doi:10.1101/cshperspect.a030361
3. Instituto Nacional de Salud Pública. (2020). Mortalidad por cáncer de próstata en México a lo largo de tres décadas. Disponible en: <https://www.insp.mx/avisos/4189-cancer-prostata-mx.html>
4. Food and Drug Administration. (2021). Cáncer de próstata: síntomas, pruebas y tratamientos. Disponible en: <https://www.fda.gov/consumers/articulos-en-espanol/cancer-de-prostata-sintomas-pruebas-y-tratamientos>
5. Rosenberg, M. T., Froehner, M., Albala, D., & Miner, M. M. (2010). Biology and natural history of prostate cancer and the role of chemoprevention. *International Journal of Clinical Practice*, 64(13), 1746–1753. doi:10.1111/j.1742-1241.2010.02541.x



6. Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & DePinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*, 32(17-18), 1105–1140. doi:10.1101/gad.315739.118
7. Huang, Y., Jiang, X., Liang, X., & Jiang, G. (2018). Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer (Review). *Oncology Letters*. doi:10.3892/ol.2018.8123
8. Leslie, S.W., Soon-Sutton, T.L., Sajjad H., Siref, L.E. (2022). Prostate Cancer. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/#article-27833.s2>
9. Bolaños, P. & Chacón, C. (2017). Escala patológica de Gleason para el cáncer de próstata y sus modificaciones. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(1), 237-243.
10. Brawer M. K. (2001). The evolution of hormonal therapy for prostatic carcinoma. *Reviews in urology*, 3 Suppl 3(Suppl 3), S1–S9.
11. Chitty J.L., Filipe E.C., Lucas M.C., *et al.* (2018). Recent advances in understanding the complexities of metastasis. 7. DOI: 10.12688/f1000research.15064.2. PMID: 30135716; PMCID: PMC6073095.
12. Schlesinger, M. (2018). Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1). doi:10.1186/s13045-018-0669-2
13. Holinstat, M. (2017). Normal platelet function. *Cancer and Metastasis Reviews*, 36(2), 195–198. doi:10.1007/s10555-017-9677-x
14. Gonzalez-Villalva, A., Bizarro-Nevarés, P., Rojas-Lemus, M., López-Valdés, N., Ustarroz-Cano, M., Barbosa-Barrón, F., García-Gil, B., Albarrán-Alonso, J., Fortoul, T. (2019). The megakaryocyte: a very original cell. *Revista de la Facultad de Medicina*. 62. 6-18. 10.22201/fm.24484865e.2019.62.1.02.
15. Noetzli, L. J., French, S. L., & Machlus, K. R. (2019). New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39(7), 1288–1300. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312129>
16. Melchinger, H., Jain, K., Tyagi, T., & Hwa, J. (2019). Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6. doi:10.3389/fcvm.2019.00153
17. Lazar, S., & Goldfinger, L. E. (2021). Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer. *Blood*, 137(23), 3192–3200. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004119>
18. Zaslavsky, A., Baek, K.-H., Lynch, R. C., Short, S., Grillo, J., Folkman, J., Ryeom, S., *et al.* (2010). Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood*, 115(22), 4605–4613. doi:10.1182/blood-2009-09-242065
19. Sánchez-Herrero, E., Provincio, M., & Romero, A. (2020). Utilidad clínica de la biopsia líquida para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con

- CPNM y *EMLA-ALK*. *Advances in Laboratory Medicine*, 1(1), 20200007. <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0007>
20. In 't Veld, S. G. J. G., & Wurdinger, T. (2019). Tumor-educated platelets. *Blood*, blood–2018–12–852830. doi:10.1182/blood-2018-12-852830
  21. Gutiontov, S. I., Choe, K. S., Miller, J. L., & Liauw, S. L. (2020). Improved outcomes after radiotherapy for prostate cancer: Anticoagulation, antiplatelet therapy, and platelet count as key factors in disease progression. *Cancer Medicine*. doi:10.1002/cam4.3087
  22. Kerr B.A., Harris K.S., Shi L., Willey J.S., Soto-Pantoja D.R., Byzova T.V. (2021). Platelet TSP-1 controls prostate cancer-induced osteoclast differentiation and bone marrow-derived cell mobilization through TGF $\beta$ -1. *Am J Clin Exp Urol.*;9(1):18-31. PMID: 33816691; PMCID: PMC8012834.
  23. Marcolino, E., Siddiqui, Y. H., van den Bosch, M., Poole, A. W., Jayaraman, P.-S., & Gaston, K. (2020). Blood platelets stimulate cancer extravasation through TGF $\beta$ -mediated downregulation of PRH/HHEX. *Oncogenesis*, 9(2). doi:10.1038/s41389-020-0189-0
  24. Rudzinski, J. K., Govindasamy, N. P., Asgari, A., Saito, M. S., Lewis, J. D., & Jurasz, P. (2021). Preferential interaction of platelets with prostate cancer cells with stem cell markers. *Thrombosis Research*, 206, 42–51. doi:10.1016/j.thromres.2021.08.08
  25. Dhenge, A., Kuhikar, R., Kale, V., & Limaye, L. (2018). Regulation of differentiation of MEG01 to megakaryocytes and platelet-like particles by Valproic acid through Notch3 mediated actin polymerization. *Platelets*, 1–16. doi:10.1080/09537104.2018.1528344
  26. Schweinfurth, N., Hohmann, S., Deuschle, M., Lederbogen, F., & Schloss, P. (2010). Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01. *Platelets*, 21(8), 648–657. doi:10.3109/09537104.2010.513748
  27. Toyoda, T., Isobe, K., Tsujino, T., Koyata, Y., Ohyagi, F., Watanabe, T., Nakamura, M., Kitamura, Y., Okudera, H., Nakata, K., & Kawase, T. (2018). Direct activation of platelets by addition of CaCl<sub>2</sub> leads coagulation of platelet-rich plasma. *International journal of implant dentistry*, 4(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40729-018-0134-6>
  28. Varkey, J., & Nicolaidis, T. (2021). Tumor-Educated Platelets: A Review of Current and Potential Applications in Solid Tumors. *Cureus*, 13(11), e19189. <https://doi.org/10.7759/cureus.19189>
  29. Yan, M., & Jurasz, P. (2016). The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(3), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.008>
  30. Liu, B., Ohishi, K., Yamamura, K., Suzuki, K., Monma, F., Ino, K., ... Katayama, N. (2010). A potential activity of valproic acid in the stimulation of

- interleukin-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis. *Experimental Hematology*, 38(8), 685–695. doi:10.1016/j.exphem.2010.03.019
31. Waqar, W., Asghar, S., & Manzoor, S. (2021). Platelets' RNA as biomarker trove for differentiation of early-stage hepatocellular carcinoma from underlying cirrhotic nodules. *Plos one*, 16(9), e0256739.
  32. Zhang, Y., Wang, X., Lu, B., Gao, Y., Zhang, Y., Li, Y., Niu, H., Fan, L., Pang, Z., & Qiao, Y. (2021). Functional and binding studies of gallic acid showing platelet aggregation inhibitory effect as a thrombin inhibitor. *Chinese herbal medicines*, 14(2), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2021.09.001>
  33. Blair, T. A., & Frelinger, A. L. (2019). Platelet surface marker analysis by mass cytometry. *Platelets*, 1–8. doi:10.1080/09537104.2019.1668549
  34. Gaupel, A.C., Wang, W. L. W., Mordan-McCombs, S., Yu Lee, E.C., Tenniswood, M. (2013). Xenograft, Transgenic, and Knockout Models of Prostate Cancer. *Animal Models for the Study of Human Disease*, 973-995. doi: 10.1016/b978-0-12-415894-8.00039-7
  35. Rudzinski, J. K., Govindasamy, N. P., Lewis, J. D., & Jurasz, P. (2020). The Role of the Androgen Receptor in Prostate Cancer-induced Platelet Aggregation and Platelet-induced Invasion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. doi:10.1111/jth.15020
  36. Xu, B., Gao, L., Wang, L., Tang, G., He, M., Yu, Y., Ni, X., & Sun, Y. (2013). Effects of platelet-activating factor and its differential regulation by androgens and steroid hormones in prostate cancers. *British journal of cancer*, 109(5), 1279–1286. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.480>
  37. Guo, Y., Cui, W., Pei, Y., & Xu, D. (2019). Platelets promote invasion and induce epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells by TGF- $\beta$  signaling pathway. *Gynecologic oncology*, 153(3), 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.02.026>
  38. Heinhuis, K. M., In 't Veld, S. G. J. G., Dwarshuis, G., van den Broek, D., Sol, N., Best, M. G., ... Steeghs, N. (2020). RNA-Sequencing of Tumor-Educated Platelets, a Novel Biomarker for Blood-Based Sarcoma Diagnostics. *Cancers*, 12(6), 1372. doi:10.3390/cancers12061372

Vo. Bo.

Vo. Bo.



Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

Dr. José Francisco Miranda Hernández  
39246