



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LAS PLAQUETAS SOBRE LA
VIABILIDAD EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

MIGUEL VALENZUELA MAYÉN

ASESOR

DR. MAURICIO RODRIGUEZ DORANTES



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ORTEGA MUÑOZ RAQUEL**

VOCAL: **Profesor: COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA**

SECRETARIO: **Profesor: RODRÍGUEZ DORANTES MAURICIO**

1er. SUPLENTE: **Profesor: PLATA RAMOS MARÍA DEL CONSUELO**

2º SUPLENTE: **Profesor: GARCÍA LOZANO ALBERTO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE ONCOGENÓMICA
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Miguel Morales Pacheco

SUSTENTANTE:

Miguel Valenzuela Mayen

Agradecimientos

A la Facultad de Química y a la UNAM, que me permitieron desarrollarme tanto personal como profesionalmente a lo largo de todos estos años.

A mi supervisor técnico y ahora amigo, el M. en C. Miguel Morales Pacheco por su total apoyo y su infinita disposición a ayudarme y corregirme a lo largo del proceso de mi proyecto. Me has enseñado muchísimo y no puedo estar más que agradecido por eso.

A mis padres Verónica y Miguel, por todo su apoyo incondicional y por siempre creer en mí. Ustedes me hacen mejor persona siempre, deseo que nunca me falten. Gracias por estar conmigo siempre, en todas las venturas, en todas las adversidades.

A mi hermana Isabel, por siempre estar para mí y por siempre creer en mí. Por las risas y las infinitas canciones y pláticas de medianoche. Soy muy feliz de ser tu hermano, gracias por enseñarme tanto, gracias por ser mi confidente y gracias por ser la que siempre me acompaña.

A mis amigos siempre: Miguel Ángel, Carlos, Viridiana, Dulce, Alexa, Aldayr, Flor y Daniel, ustedes son mi segunda familia y agradezco tanto haber coincidido con ustedes en la vida. Gracias por las aventuras, las risas y el tiempo. Estoy consciente de que cualquier cosa que hagas en la vida no es tan legendaria a menos que estén tus amigos allí para verlo, y ustedes ahí para verlo.

A Marian, por todo su amor, ternura y apoyo incondicional. Por ser mi compañera de vida, por enseñarme tanto y por escucharme siempre. No sabes el impacto que has tenido en mí, siempre voy a agradecer por eso. Eres mi persona y espero seguir creciendo contigo por mucho tiempo más, juntos vamos por grandes cosas. Te quiero siempre.

A todas las personas que influyeron en mí y en mi desarrollo a lo largo del tiempo. Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. PRÓSTATA.....	2
1.1 Anatomía.....	3
1.2 Histología	4
1.3 Fisiología.....	7
1.4 Patologías de la próstata	9
1.4.1 Inflamación prostática.....	11
1.4.2 Hiperplasia benigna prostática (BPH).....	11
1.4.3 Atrofia focal	11
1.4.3 Neoplasia intraepitelial prostática (PIN).....	12
2. CÁNCER DE PRÓSTATA.....	13
2.1 Cáncer	13
2.2 Epidemiología del cáncer de próstata	14
2.3 Etiología y factores de riesgo.....	16
2.3.1 Edad.....	17
2.3.2 Origen étnico	17
2.3.3 Factores genéticos	17
2.3.4 Estilo de vida	18
2.4 Síntomas.....	18
2.5 Diagnóstico	19
2.6 Clasificación.....	21
2.7 Tratamiento.....	24
3. PLAQUETAS.....	26
3.3 Interacción célula tumoral-plaqueta	28
3.3.1 Fase de intravasación.....	29

3.3.2 Fase intravascular.....	30
3.3.3 Fase de extravasación.....	30
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	32
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	33
6. HIPÓTESIS.....	33
7. OBJETIVO GENERAL	33
7.1 Objetivos particulares.....	33
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
9. RESULTADOS	40
10. DISCUSIÓN.....	55
11. CONCLUSIONES.....	60
12. PERSPECTIVAS	60
13. REFERENCIAS	61

RESUMEN

El cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más frecuente y la quinta causa de muerte por cáncer en varones a nivel mundial. La principal causa de muerte en pacientes con cáncer está relacionada con el desarrollo de metástasis. Evidencia reciente sugiere que, durante la cascada metastásica, en la fase intravascular, las interacciones entre las células cancerígenas y las plaquetas podría favorecer la progresión tumoral. Las plaquetas son células sanguíneas que tiene como función principal la hemostasia, sin embargo, las plaquetas también pueden participar en otros procesos fisiológicos y fisiopatológicos, como el cáncer. Las plaquetas tienen un papel importante apoyando a la evasión del sistema inmunológico, brindando protección mecánica, asistiendo a la adhesión, extravasación e invasión de las células cancerígenas y, de esta manera, favoreciendo la progresión tumoral y la metástasis. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales se dan este tipo de interacciones célula-plaqueta que pueden favorecer la progresión tumoral y la metástasis no han sido explorados en cáncer de próstata debido a la falta de modelos.

En este trabajo se exploró el desarrollo de un modelo de cocultivo celular entre líneas celulares de cáncer de próstata y plaquetas. Para el desarrollo del modelo se tomaron en cuenta variables como la metodología de aislamiento de plaquetas, la caracterización celular y fisiológica de las plaquetas y, el efecto del Buffer HEPS (vehículo de resuspensión de plaquetas) sobre la viabilidad de las líneas de cáncer de próstata (LNCaP y PC3). Finalmente, se caracterizó el efecto que tienen las plaquetas sobre la viabilidad de las líneas celulares mostrando que LNCaP es más sensible a proporciones altas de plaquetas en comparación con PC3, promoviendo apoptosis tardía en LNCaP y apoptosis temprana en PC3. Estos hallazgos permitieron determinar que la proporción célula-plaqueta óptima es de 1:200. En esta proporción establecida se pudieron observar interacciones físicas entre las líneas celulares de cáncer de próstata y plaquetas.

Este estudio demostró ser un enfoque valioso para estudiar a futuro los mecanismos moleculares de las interacciones entre células de cáncer de próstata y plaquetas.

1. PRÓSTATA

La próstata es una glándula excretora túbulo-alveolar que forma parte del sistema reproductivo masculino y es la principal glándula reproductiva involucrada en la fertilidad del hombre pues tiene como función principal la formación del fluido prostático (Verze et al., 2016). Esta glándula tiene una conformación cónica descrita coloquialmente como “forma de nuez” y su tamaño incrementa conforme a la edad (Aaron et al., 2016; Toivanen & Shen, 2017). Su crecimiento normal y desarrollo está comprometido por los andrógenos. En condiciones normales, la próstata suele pesar entre 20 y 30 g midiendo alrededor de 3.5 cm en su base y aproximadamente 2.5 cm en sus dimensiones vertical y anteroposterior. La próstata se encuentra ubicada en la base de la vejiga y rodea la porción proximal de la uretra (Motrich et al., 2018) además de colindar directamente con el recto, lo que permite a la próstata ser palpada durante la examinación rectal (Aaron et al., 2016; James, 2014) **(Figura 1)**.

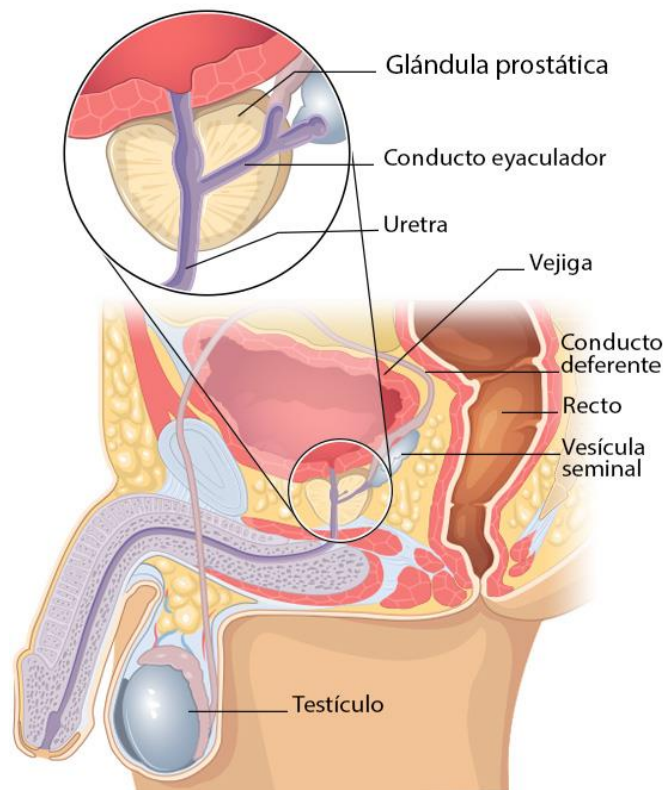


Figura 1. Localización anatómica de la próstata. Se ilustra la localización anatómica de la próstata. La próstata se encuentra ubicada en la base de la vejiga y rodea la porción proximal de la uretra, además de colindar directamente con el recto. Imagen modificada de (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, 2022).

1.1 Anatomía

A partir del trabajo de McNeal en 1993, se establecieron cuatro regiones anatómicas que conforman a la próstata: la zona central, la zona de transición, la zona estroma fibromuscular anterior y la zona periférica (Hermabessière & Taillandier, 2002a; McNeal, 1993) **(Figura 2)**.

Las cuatro regiones anatómicas se describen a continuación:

- Zona central: Esta zona rodea los conductos eyaculatorios y la uretra prostática. Anatómicamente, la zona central se encuentra rodeada por la zona periférica y frente a la zona de transición; aunque la zona central y la zona periférica se encuentran de una forma adyacente, estas presentan diferencias histológicas que indican diferencias importantes en sus funciones biológicas (McNeal, 1993; Selman, 2011). Esta zona constituye del 20 al 25% del volumen del tejido normal prostático, siendo el lugar de origen de aproximadamente el 5% de las neoplasias malignas de la próstata (Babinski et al., 2002; Toivanen & Shen, 2017).
- Zona de transición: Representa del 5 al 10% del tejido prostático, siendo la zona más pequeña de la glándula. Esta zona rodea la uretra proximal entre la vejiga y el utrículo prostático (McNeal, 1993). La zona de transición se agranda a lo largo de la vida y es aquí donde se desarrolla la hipertrofia prostática benigna (HPB) en la vejez (Hermabessière & Taillandier, 2002b; Selman, 2011; Toivanen & Shen, 2017). Aproximadamente el 10-15% de las neoplasias prostáticas se originan en esta zona (James, 2014).
- Zona periférica: Constituye aproximadamente el 70% del tejido glandular. (Toivanen & Shen, 2017) Anatómicamente, comprende un área que va desde el ápex hasta la base de la próstata. Forma un disco de tejido cuyos ductos rodean la uretra distal y lateral de forma radial (McNeal, 1993). Esta zona engloba casi todo el conjunto de la glándula (Hermabessière & Taillandier, 2002a). Esta zona es particularmente sensible al desarrollo de prostatitis crónica, atrofia pos-inflamatoria y cáncer (Selman, 2011;

Toivanen & Shen, 2017) lo que convierte a esta zona en una de las de mayor interés para el estudio de dichas patologías. Entre el 80-85% de las neoplasias prostáticas se originan en esta zona (Hermabessière & Taillandier, 2002c; McNeal, 1993).

Zona estroma fibromuscular anterior: Esta zona que carece de glándulas, forma por completo la cara anterior de la próstata (James, 2014). Esta zona cumple con un papel meramente anatómico protegiendo las demás zonas glandulares (zona central, zona periférica y zona de transición) y aparentemente carece de importancia funcional o patológica en la próstata (McNeal, 1993).

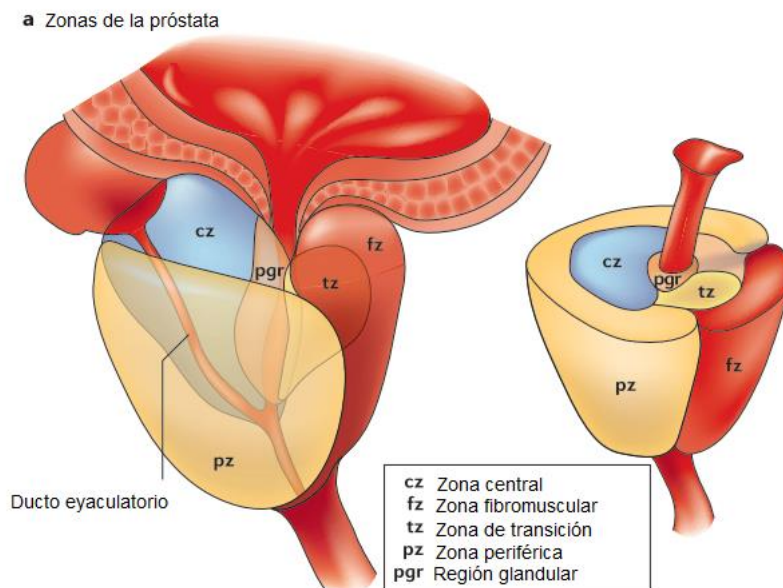


Figura 2. Anatomía por zonas de la próstata. Estructura general de la próstata. Se ilustran las cuatro zonas descritas por McNeal: zona central, zona de transición, zona periférica y zona estroma fibromuscular anterior. La zona central conforma del 20-25% del tejido prostático; la zona de transición conforma del 5 al 10% de la glándula; la zona periférica representa aproximadamente el 70% del tejido. La zona estroma fibromuscular anterior carece de glándulas y protege la cara anterior prostática. Imagen modificada de (Verze et al., 2016).

1.2 Histología

El tejido prostático está compuesto principalmente de un parénquima epitelial (epitelio glandular) y una matriz estromal (estroma fibromuscular) (Czyz et al., 2012; Verze et al., 2016). El epitelio se compone de dos capas histológicamente distintas. La capa luminal secretora está formada por células columnares altas

(células secretoras) que expresan receptor de andrógenos y dependen de los andrógenos para sobrevivir, además de ser responsables de la producción del antígeno prostático específico (PSA), fosfatasa ácida prostática y calicreína-2 (KLK2) humana, que se secretan como parte del líquido seminal. Esta capa de células está respaldada por una capa basal de células epiteliales cuboidales (células basales) que expresan niveles bajos del receptor de andrógenos; y células neuroendocrinas, las cuales no expresan receptor de andrógenos. Esta capa, a su vez, está revestida por una membrana basal que consiste en una matriz extracelular, que forma una división entre las células basales y el estroma (**Figura 3**) (Toivanen & Shen, 2017; Verze et al., 2016; Wang et al., 2018).

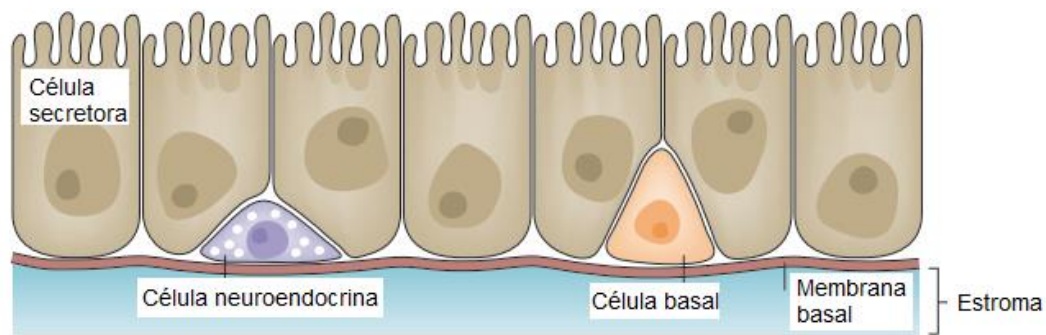


Figura 3. Esquema histológico del tejido prostático. Se observan los diferentes linajes que conforman la parte epitelial del tejido prostático. El epitelio está formado por tres subtipos de células: células luminales, células basales y células neuroendocrinas. El compartimento epitelial está delimitado por una membrana que lo separa del compartimento estromal. Imagen modificada de (Verze et al., 2016)

La matriz estromal a su vez, está formada por tejido conectivo, fibroblastos, células de músculo liso, y miofibroblastos (Humphrey, 2017; Toivanen & Shen, 2017), las cuales contribuyen a la secreción de proteínas de matriz extracelular, así como factores de crecimiento además de expresar receptor de andrógenos (Chiarugi et al., 2014). La función principal del estroma es asegurarse de que exista un microambiente apropiado para el buen desarrollo y funcionamiento del compartimento epitelial. El compartimento estromal provee señales de apoyo que favorecen la homeostasis en condiciones normales o durante procesos de regeneración. Además, evidencia sugiere que la matriz estromal podría tener un papel importante en procesos inflamatorios (Verze et al., 2016).

La proliferación de células epiteliales es estrictamente controlada por interacciones entre las mismas células epiteliales (comunicación autocrina), componentes de la matriz extracelular y células estromales; estas interacciones en equilibrio mantienen la homeostasis tisular (**Figura 4**). La transformación neoplásica de las células epiteliales conduce a un desequilibrio de la plétora de células estromales (Humphrey, 2017). La desorganización resultante de la arquitectura tisular normal desencadena la activación de las células del estroma, promoviendo y manteniendo así el crecimiento y malignidad de las células tumorales (Chiarugi et al., 2014).

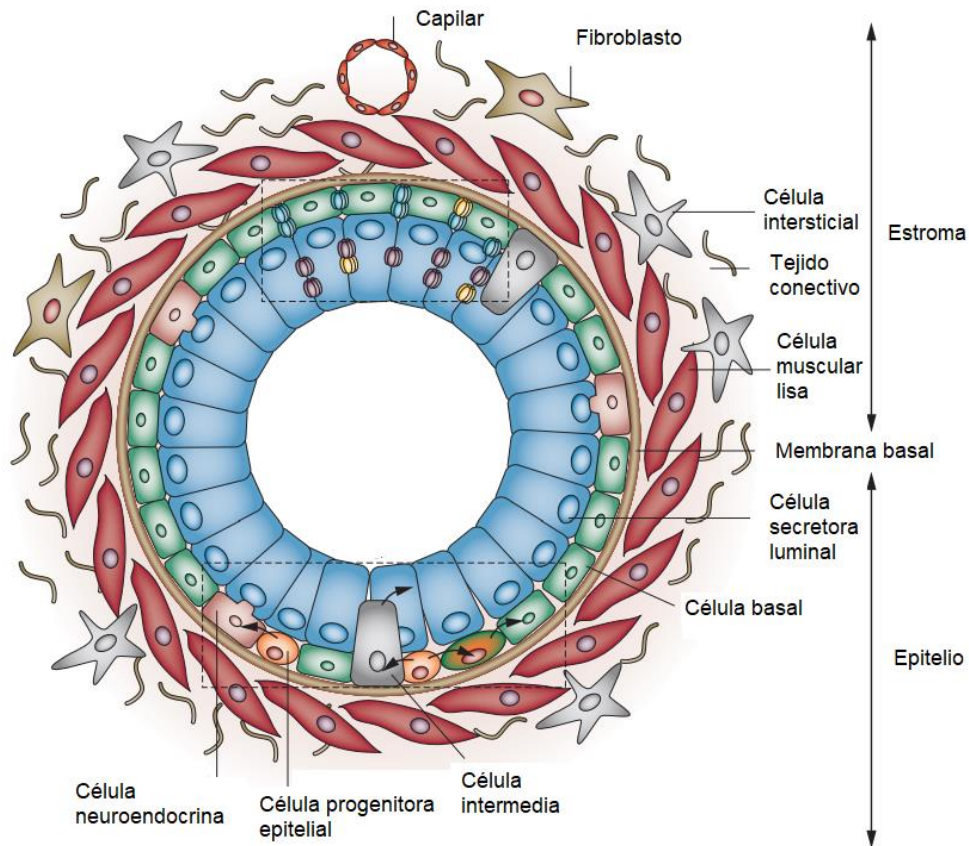


Figura 4. Interacción entre el compartimento epitelial y el compartimento estromal en el tejido prostático. Se observan los diferentes linajes que forman parte del compartimento epitelial y los diferentes linajes que conforman al compartimento estromal. Imagen modificada de (Czyz et al., 2012).

En el desarrollo del cáncer de próstata, el compartimento estromal representa un papel crucial en el desarrollo de la neoplasia debido a que las células que lo conforman son capaces de secretar factores que pueden promover el crecimiento, supervivencia y movilidad de las células cancerígenas. En un estado de enfermedad las poblaciones estromales se componen de: (1) células inmunológicas como linfocitos y macrófagos que, una vez activados mediante

citocinas liberadas por células tumorales, son capaces de promover la progresión del cáncer, angiogénesis y metástasis (Kumar et al., 2016); (2) células madre mesenquimales que pueden dar origen a células mesenquimales asociadas a tumor y a fibroblastos asociados a tumor y que contribuyen en la progresión del cáncer (Jung et al., 2013; Kalluri, 2016; Shi et al., 2016); (3) fibroblastos asociados a cáncer y miofibroblastos que son capaces de afectar y modificar a la matriz extracelular, producir metabolitos útiles para mantener la progresión del cáncer y citocinas que promueven la invasión, además de contribuir a la resistencia farmacológica (Kalluri, 2016); (4) células endoteliales que participan en la remodelación de la matriz extracelular así como en la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) (Chiarugi et al., 2014); (5) y células progenitoras de médula ósea (como plaquetas) que son reclutadas al sitio del tumor y contribuyen a incrementar al reservorio de los otros tipos de células estromales (Chiarugi et al., 2014; Wang et al., 2018). Todo este conjunto heterogéneo de células conforma el microambiente tumoral (Wang et al., 2018).

1.3 Fisiología

La principal función de la próstata es producir el fluido prostático el cual conforma entre el 25 al 30% del fluido seminal total, el remanente es producido por las vesículas seminales y los testículos. La fisiología de la próstata es dependiente de los andrógenos, cuyas secreciones son reguladas por el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (eje gonadal). El fluido prostático contiene una mezcla compleja de factores que ejercen funciones esenciales para la reproducción y además protege al espermatozoide durante su paso a través del tracto femenino (Motrich et al., 2018). Esta mezcla compleja está conformada, entre otros componentes, del antígeno prostático específico (PSA), ácido cítrico, calcio, zinc (Zn), lactoferrina, fosfatasa ácida y fibrinolisisina (Lawrentschuk & Ptasznik, 2021; Hermabessière & Taillandier, 2002b) En la **Tabla 1** se describen los componentes que conforman al fluido prostático.

Productos secretados	Funciones/Características
Seminogelina y fibronectina	Están involucradas en la coagulación post-eyaculatoria del semen, pues tras la eyaculación llevan a cabo la formación de un gel polimerizado (Hayward & Cunha, 2000).
Transglutaminasa	Ayuda a la formación del polímero necesario para la formación del gel formado por la seminogelina y la fibronectina (Hayward & Cunha, 2000).
PSA	Es una calicreína (serin-proteasa) que es secretada de 5 a 10 minutos después de la eyaculación. Ayuda a disolver el coágulo formado por la seminogelina y fibronectina. Es uno de los principales productos secretados por la próstata (Hermabessière & Taillandier, 2002b).
Lactoferrina	El rol de esta consiste en unirse al espermatozoide y formar parte de los antígenos de recubrimiento. También tiene actividad antimicrobiana (Reese et al., 1992; Thaler & Vanderpuye, 1990).
Citrato	Regula el pH del semen y nutre a los espermatozoides después de la eyaculación (Motrich et al., 2018).
Zinc	Juega diferentes roles cruciales en la fisiología prostática. 1) Actividad antimicrobiana esencial para la protección de los espermatozoides en el tracto vaginal. 2) Involucrado en la licuefacción del semen, liberación del esperma del coágulo seminal.

	<p>3) Las altas concentraciones de Zn en la próstata bloquea al ciclo de Krebs permitiendo que las células epiteliales produzcan energía a partir de la glucólisis y permite a la próstata liberar grandes cantidades de citrato (Motrich et al., 2018; Puerta-Suárez & Cardona-Maya, 2020).</p>
--	--

Tabla 1. Productos predominantes de la secreción prostática. Se describen las características de los principales productos predominantes secretados en el fluido prostático.

En resumen, el principal aporte del fluido prostático al fluido seminal es el de proporcionarle factores que son necesarios para controlar la eyaculación, regular los procesos de coagulación y licuefacción del semen, y activar y revestir a los espermatozoides de glicoproteínas que ayudan a evitar una respuesta inmune al estar en contacto con el moco cervical (Hayward & Cunha, 2000). El fluido prostático también es capaz de inducir cambios en el cuello uterino, el endometrio y en el sistema inmunológico materno con la finalidad de garantizar una implantación y un crecimiento embrionario exitoso (Motrich et al., 2018).

A pesar de que el fluido prostático no es necesario para una reproducción exitosa en humanos y en la mayoría de los animales, evidencia acumulada indica que la fertilidad masculina y el desarrollo fetal se ven comprometidos en la ausencia de la próstata y sus secreciones (Motrich et al., 2018; Toivanen & Shen, 2017).

1.4 Patologías de la próstata

Las patologías de la próstata suelen ser específicas de cada una de las zonas que conforman a la glándula (De Marzo et al., 2007; McNeal, 1993), siendo la zona periférica la zona donde más comúnmente se desarrolla el cáncer de próstata. En la **Figura 5** se muestran las patologías más comunes en las diferentes zonas de la próstata según (De Marzo et al., 2007).

	Zona de la próstata		
	Periférica	Transición	Central
Atrofia focal	Alta prevalencia	Prevalencia media-alta	Baja prevalencia
Inflamación aguda	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Inflamación crónica	Prevalencia media-alta	Prevalencia media-alta	Baja prevalencia
Hiperplasia benigna prostática	Ninguna	Alta prevalencia	Baja prevalencia
PIN de algo grado	Prevalencia media-alta	Baja prevalencia	Baja prevalencia
Carcinoma	Prevalencia media-alta	Baja prevalencia	Ninguna

 Alta prevalencia	 Baja prevalencia
 Prevalencia media-alta	 Ninguna

Figura 5. Patologías prostáticas con relación a la zona prostática. La atrofia focal se desarrolla principalmente en zona periférica y en la zona de transición; la hiperplasia benigna prostática se desarrolla prevalentemente en la zona de transición; la neoplasia prostática intraepitelial y el carcinoma tienen una alta prevalencia en la zona periférica. Imagen modificada de (De Marzo et al., 2007)

Existen además algunas otras patologías que pueden presentarse en la próstata, tales como la prostatitis aguda y crónica, el carcinoma tipo neoplasia intraepitelial prostática, el adenocarcinoma ductal y el carcinoma intraductal (Trabzonlu et al., 2019).

A continuación, se presentan y describen las patologías que pueden llevar al desarrollo del cáncer de próstata (**Figura 6**), a excepción de la hiperplasia benigna prostática (BPH).

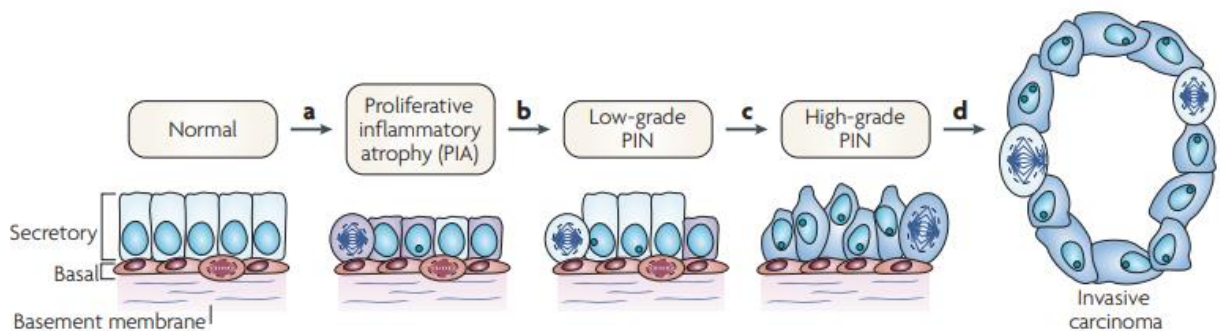


Figura 6. Modelo de progresión de la neoplasia prostática. Se ilustra el modelo de progresión de la neoplasia prostática: tejido epitelial normal, atrofia inflamatoria proliferativa (PIA), neoplasia intraepitelial proliferativa (PIN) y carcinoma invasivo. Imagen modificada y extraída de (De Marzo et al., 2007).

1.4.1 Inflamación prostática

En la mayoría de los casos, la causa de la inflamación prostática es poco clara. Existen varias fuentes potenciales que pueden desencadenar el evento inflamatorio, entre los que se encuentran las infecciones, el reflujo de orina, la inducción de un trauma físico o químico, los factores dietéticos, los estrógenos, o una combinación de dos o más de estos factores. Además, cualquiera de estos podría conducir a una ruptura en la tolerancia inmunológica y el desarrollo de una reacción autoinmune a la próstata que llevaría a un estado de inflamación (De Marzo et al., 2007).

1.4.2 Hiperplasia benigna prostática (BPH)

La hiperplasia benigna prostática es la neoplasia benigna más común en hombres de edad avanzada y está presente en aproximadamente el 8% de los hombres en la cuarta década de la vida y hasta el 90% de los hombres en la cuarta década de su vida (Langan, 2019). Resultado del agrandamiento benigno de la próstata debido al crecimiento hiperplásico no regulado del epitelio y tejidos fibromusculares (Devlin et al., 2021), esta neoplasia suele presentar sintomatología denominada síntomas del tracto urinario inferior. Esta neoplasia se desarrolla preferentemente en la zona de transición de la próstata y suele presentar un marcado aumento de células inflamatorias crónicas y un epitelio atrófico con zonas de PIA de transición (De Marzo et al., 1999, 2007).

1.4.3 Atrofia focal

Histológicamente, la mayoría de las lesiones que presentan infiltrados provenientes de una inflamación aguda o crónica están asociados con una atrofia epitelial focal y está también asociada con una próstata envejecida. La atrofia focal se ha presentado como un precursor potencial del cáncer de próstata y de la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), además de estar asociada estrechamente con inflamación crónica, infecciones y exposición a carcinógenos (Rosenberg et al., 2010). Esta lesión suele localizarse principalmente en la zona periférica de la

glándula prostática (zona donde suele desarrollarse con más frecuencia el cáncer de próstata) y una de sus características es la alta tasa de proliferación que presentan sus células epiteliales en comparación con aquellas del epitelio de apariencia normal (Benedetti-Padrón, I. & Reyes, 2013; Y. Zhang et al., 2019), razón por la cual en 1999 fue acuñado el término "atrofia inflamatoria proliferativa" (PIA) por De Marzo, para designar focos de proliferación epitelio-glandular para la mayoría de las lesiones atróficas (De Marzo et al., 1999, 2007; Y. Zhang et al., 2019).

1.4.3 Neoplasia intraepitelial prostática (PIN)

Es considerada la lesión precursora del cáncer de próstata (De Marzo et al., 2007). Dentro de las características de esta patología se encuentra la proliferación de las células epiteliales de la glándula prostática, las cuales muestran atipia citológica significativa dentro de los límites de los conductos prostáticos y acinos (Trabzonlu et al., 2019). Comúnmente, la neoplasia suele desarrollarse en la zona periférica de la glándula prostática, aunque también tiene prevalencia en la zona de transición.

2. CÁNCER DE PRÓSTATA

2.1 Cáncer

Se entiende por cáncer al crecimiento descontrolado y anormal de células (Roy & Saikia, 2016). El cáncer en sí no es una enfermedad, sino un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo y ser capaz de invadir órganos que se encuentren de una forma adyacente o de una forma distal al origen del tumor (Roy & Saikia, 2016). Conforme la neoplasia avanza a un estadio más grave de la enfermedad, comienzan a desarrollarse características que tienen en común todos los tipos de cáncer como lo son proliferación sostenida, evasión del sistema inmunológico, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, mutaciones e inestabilidad genómica, desregulación metabólica, capacidad de generar angiogénesis, invasión y metástasis (**Figura 7**) (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

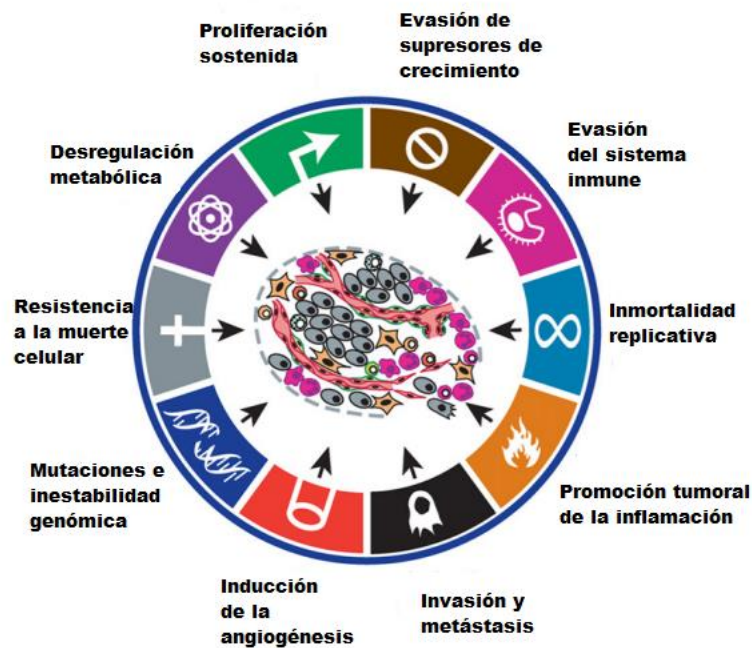


Figura 7. Características en común de las neoplasias malignas. Se muestran las características en común que tienen las neoplasias malignas. Entre ellas: proliferación sostenida, evasión del sistema inmunológico, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, mutaciones e inestabilidad genómica, desregulación metabólica, capacidad de generar angiogénesis, invasión y metástasis. Imagen obtenida y modificada de (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.2 Epidemiología del cáncer de próstata

El cáncer de próstata es uno de los tipos de cáncer más comunes alrededor del mundo según la International Agency for Research on Cancer. Con un estimado de 1.4 millones de nuevos casos y 375,000 muertes en 2020, el cáncer de próstata representa la segunda neoplasia más común en hombres en el mundo y es la quinta causa de mortalidad con relación al cáncer (International Agency for Research on Cancer, 2022) (**Figura 8**).

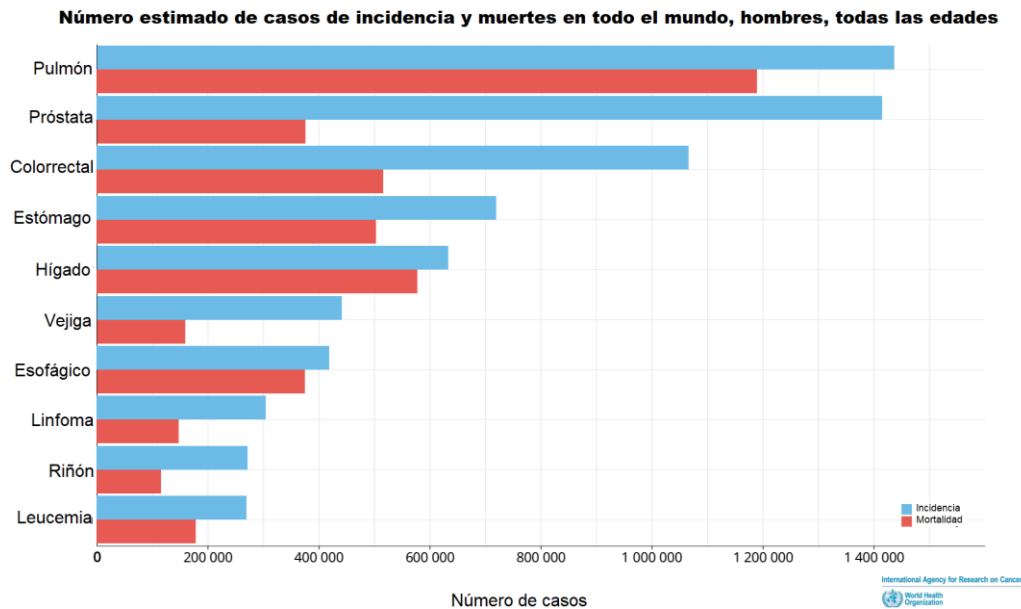


Figura 8. Incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer. Se observa la incidencia y la mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en varones de todas las edades. El cáncer de próstata ocupa el puesto número dos en incidencia y el puesto número cinco en mortalidad alrededor del mundo. Imagen modificada de (GLOBOCAN, 2020)

Hay una notable diferencia entre la incidencia y mortalidad del cáncer de próstata entre países desarrollados y países semidesarrollados, atribuido probablemente a la mejora de herramientas de diagnóstico de la patología. En el norte y este de Europa, el Caribe, Nueva Zelanda, América del Norte y el Sur de África la incidencia es mucho más alta a comparación de territorios como Asia y el Norte de África. Por otro lado, la mortalidad en el Caribe, algunas regiones de África y partes de América del sur suelen ser notoriamente más altas que en otras regiones (**Figura 9**) (International Agency for Research on Cancer, 2022).

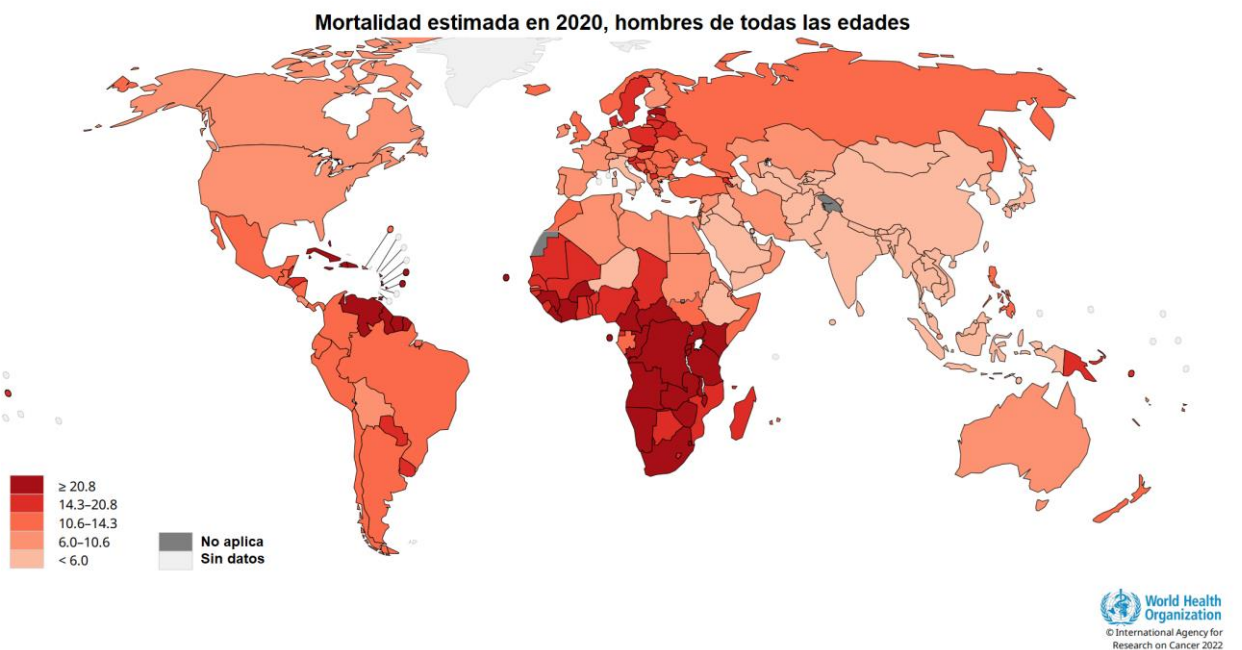
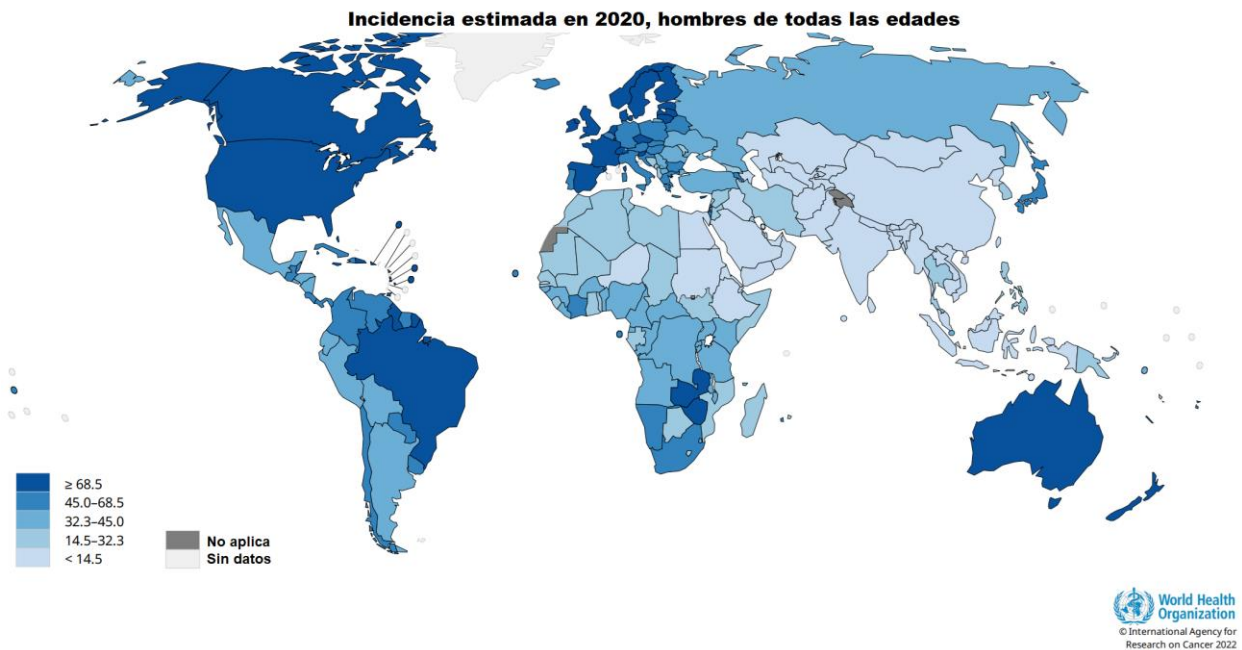


Figura 9. Incidencia y mortalidad del cáncer de próstata alrededor del mundo. Se observa la incidencia y la mortalidad del cáncer de próstata alrededor del mundo en varones de todas las edades. El cáncer de próstata tiene una mayor incidencia en regiones de países desarrollados, pero una mortalidad menor, a diferencia de los países en vías de desarrollo que presentan una baja incidencia pero una mayor mortalidad en la misma patología. Imagen modificada de (GLOBOCAN, 2022)

En México, con 480,838 casos nuevos y 102,064 muertes en el 2020, el cáncer de próstata se sitúa como la segunda neoplasia con mayor incidencia en toda la población y la primera en hombres, además de ser la segunda causa de mortalidad por cáncer en la población por debajo del cáncer de mama (**Figura 10**) (International Agency for Research on Cancer, 2022).

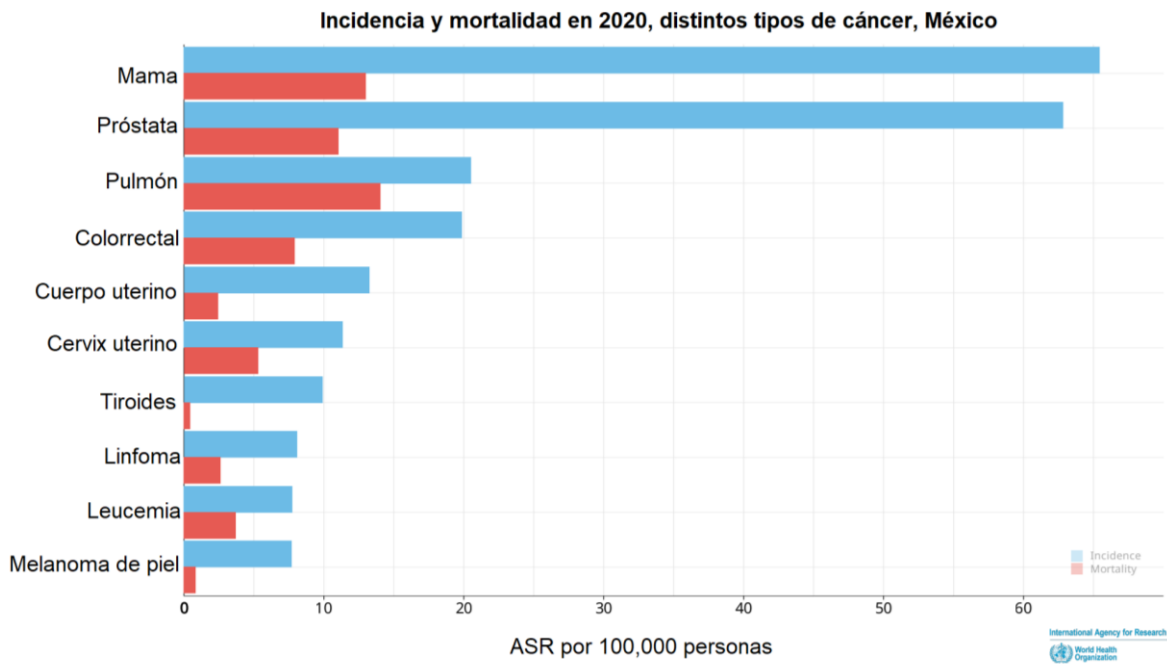


Figura 10. Incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer en México. Se observa la incidencia y la mortalidad de diferentes tipos de cáncer en México en ambos sexos. El cáncer de próstata ocupa el puesto número dos en incidencia y en mortalidad en México. Imagen modificada y extraída de (GLOBOCAN, 2022).

2.3 Etiología y factores de riesgo

La etiología del cáncer de próstata es sujeto de numerosos estudios y sigue siendo desconocido en gran medida (Rawla, 2019). Como en otros tipos de cáncer, el cáncer de próstata se desarrolla a través de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos, que dan como resultado la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes. Existe evidencia que indica que la inestabilidad genética facilita la progresión tumoral. Aunque esos cambios genéticos y epigenéticos pueden ayudar a explicar el “cómo” se desarrolla el cáncer de próstata, la pregunta clave del “porqué” surge esta patología sigue siendo objeto de estudio (De Marzo et al., 2007). Entre los factores de riesgo más consistentes para el desarrollo del cáncer de próstata se encuentra la edad avanzada, el origen étnico, los factores genéticos y los antecedentes familiares, la dieta, la obesidad junto con la inactividad física, la inflamación, la hiperglicemia, infecciones y exposición ambiental a productos químicos y radiación ionizante (De Marzo et al., 2007; Rawla, 2019).

2.3.1 Edad

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más comúnmente diagnosticada entre hombres de edad avanzada. Su diagnóstico no es común en hombres menores a 55 años (Hussein et al., 2015), sin embargo, se ha observado que el riesgo al desarrollo de cáncer de próstata incrementa a partir de los 50 años, siendo los 65 años la edad media de diagnóstico; por lo tanto, a mayor edad el riesgo a desarrollar cáncer de próstata incrementa (Grozescu T, Popa F, 2017; Rawla, 2019). De hecho, mientras mayor sea la edad el riesgo a ser diagnosticado con cáncer de próstata de alto riesgo aumenta y la tasa de supervivencia de los pacientes disminuye (Perdana et al., 2016).

2.3.2 Origen étnico

La prevalencia del cáncer de próstata varía mucho entre los diferentes grupos étnicos. Esta variabilidad ha sido asociada tanto a condiciones socioeconómicas como a factores biológicos. Los hombres afroamericanos tienen una mayor incidencia y mortalidad de desarrollar esta neoplasia a comparación con su contraparte caucásica. Diferentes estudios han asociado a las variantes del cromosoma 8q24 y a las variaciones en genes como *EphB2* y *BCL2* como factores de predisposición genética en afroamericanos para desarrollar cáncer de próstata de alto riesgo. Por otra parte, en hombres con descendencia asiática se observa una menor incidencia, asociada no solo con predisposición genética sino también con la dieta, el estilo de vida y los factores ambientales (Perdana et al., 2016; Rawla, 2019).

2.3.3 Factores genéticos

Datos epidemiológicos muestran que los antecedentes familiares de cáncer de próstata aumentan significativamente el riesgo de que se pueda desarrollar la patología. Cerca del 5-10% de los casos de cáncer de próstata son hereditarios y muestran un patrón de herencia mendeliano (Hussein et al., 2015). Se ha propuesto que puede existir un componente hereditario para el desarrollo de esta neoplasia, pudiendo atribuirse hasta un 40% de los casos a factores genéticos (Perdana et al., 2016).

2.3.4 Estilo de vida

Una dieta alta en grasas saturadas, carnes rojas, calcio, vitamina D, productos lácteos, y bajos niveles de antioxidantes se han relacionado con un aumento en el riesgo para el desarrollo del cáncer de próstata (Rawla, 2019). Por otro lado, el consumo de tomates (como fuente de licopenos), soya, té verde y vitamina E ha presentado una asociación inversa entre su consumo y el riesgo a desarrollar cáncer de próstata (Dehm & Tindall, 2019); en general, una dieta mediterránea se ha relacionado con una menor incidencia en el desarrollo del cáncer de próstata y del cáncer de próstata de alto riesgo (Schneider et al., 2019). Asimismo, se ha establecido una asociación entre la obesidad y el desarrollo del cáncer de próstata, debido principalmente a la baja prognosis y a su dificultad para ser detectado (los hombres obesos presentan un menor nivel de PSA) (Perdana et al., 2016). Por otro lado, aunque no existe evidencia clara de cómo el tabaquismo pudiese favorecer el desarrollo del cáncer de próstata, este se ha vinculado con una mayor mortalidad para este tipo de cáncer (Huncharek et al., 2010; Rawla, 2019). Por último, se ha reportado que hay relación significativa entre el consumo de alcohol y el desarrollo de cáncer de próstata de alto riesgo (Fillmore et al., 2009; Rota et al., 2012).

2.4 Síntomas

Los síntomas del cáncer de próstata, descritos previamente como síntomas del tracto urinario inferior, pueden incluir disfunción eréctil, sangre en el semen, dolor en la parte baja de la espalda o la cadera, problemas urinarios o agrandamiento de la próstata. El agrandamiento de la próstata puede provocar obstrucción con flujo reducido, dificultad para un vaciado completo de la vejiga, goteo posterior a la micción o incluso retención, sangrado en la orina o el semen, dolor al orinar o infección (Merriel et al., 2018). Es importante señalar que muchos hombres con cáncer de próstata son asintomáticos hasta que el tumor ha progresado, y los síntomas comunes tienen un cruce significativo con condiciones benignas que afectan la próstata como lo es la BPH y prostatitis, así como otros trastornos que surgen de otras partes del sistema urinario por lo que es necesario realizar

exámenes y pruebas estándar para hacer un diagnóstico más apropiado (James, 2014; Merriel et al., 2018).

2.5 Diagnóstico

El diagnóstico del cáncer de próstata no puede ser realizado con una sola prueba. Los métodos de diagnóstico actuales se basan principalmente en el análisis de sangre del PSA como test de detección temprana, complementado mediante el tacto rectal y seguido de una biopsia guiada por ecografía transversal (TRUS) (Litwin & Tan, 2017; Merriel et al., 2018). Sin embargo, el diagnóstico definitivo es hecho después de realizar una biopsia y un estudio histológico (Nguyen-Nielsen & Borre, 2016). El diagnóstico de cáncer de próstata se realiza a pacientes que presenten síntomas del tracto urinario inferior o en pacientes después de una prueba de detección de PSA (Merriel et al., 2018).

El PSA es el único biomarcador utilizado hoy en día en la detección y el diagnóstico del cáncer de próstata, así como en el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la eficacia del tratamiento (Nguyen-Nielsen & Borre, 2016). Los valores típicos de PSA pueden variar según la edad y otros factores individuales, pero generalmente, niveles de PSA por debajo de 4 ng/mL se consideran normales mientras que niveles de PSA por encima de 4 ng/mL pueden ser indicativos de CaP, sin embargo, estos valores no son definitivos por sí mismos (Uhr et al., 2020). Cuando los niveles de PSA están en lo que se conoce como la "zona gris", es decir, entre 4 y 10 ng/mL, el diagnóstico suele ser ambiguo e inespecífico, ya que no hay una correlación que determine si el aumento del PSA se debe a condiciones benignas (BPH, prostatitis, eyaculación) o a la presencia de CaP (Merriel et al., 2018). De hecho, se estima que el PSA es incapaz de detectar alrededor de un 25-30% de pacientes con cáncer de próstata con PSA entre 2.6 y 4.0 ng/mL, además de que este método de detección no es lo suficientemente sensible para detectar el cáncer de próstata en un estadio temprano y algunos tumores agresivos (Savón Moiran, 2019).

A pesar de todas las limitaciones mencionadas anteriormente, el PSA sigue siendo una herramienta válida para la detección del cáncer de próstata junto con otras herramientas como el tacto rectal digital, que combinadas, son consideradas el

pilar de la práctica clínica (Naji et al., 2018). El examen de tacto rectal consiste en la exploración física de la próstata con la finalidad de buscar anomalías en la zona al detectar bultos, ensanchamientos o cambios en la rigidez de la próstata asociado a cáncer de próstata (James, 2014). Al igual que el examen de PSA, el tacto rectal también tiene sus limitaciones pues este presenta una sensibilidad y especificidad baja para el diagnóstico del cáncer de próstata (Savón Moiran, 2019) lo que conduce a pruebas diagnósticas invasivas innecesarias como las biopsias, que pueden provocar dolor, disfunción eréctil e incontinencia urinaria, así como el sobrediagnóstico y el sobretratamiento del cáncer de próstata (Naji et al., 2018). A pesar de las limitaciones, un examen de tacto rectal puede indicar si se recomienda una biopsia de próstata a un paciente, especialmente en los casos más agresivos (James, 2014).

Una vez teniendo la sospecha de cáncer de próstata evidenciado por una prueba de PSA elevado y un tacto rectal anormal suele realizarse una biopsia de la glándula prostática. La biopsia transrectal guiada por ecografía es considerada el estándar para el diagnóstico de esta enfermedad (Litwin & Tan, 2017). A través de los videos e imágenes generados por la ecografía es posible localizar el sitio del tumor y extraer una parte de tejido específicamente sospechoso que posteriormente será analizado mediante pruebas patológicas (James, 2014). Es importante recalcar que este método puede causar efectos secundarios que incluyen sangrado, dolor e infección, entre otros (Ahmed et al., 2017). En conjunto, una biopsia combinada con ecografía transrectal permite establecer el diagnóstico del cáncer de próstata, el grado de tumor y pronóstico de la enfermedad.

Además, existen otras técnicas que pueden ser utilizadas para apoyar al diagnóstico del cáncer de próstata previo a la realización de una biopsia como lo es la resonancia magnética multiparamétrica (mpMRI) (James, 2014). Este método permite obtener imágenes en diferentes ángulos de la próstata que proporcionan información sobre la anatomía del tejido, características de este, volumen prostático, celularidad y vascularización sin la necesidad de una biopsia previa. El uso de múltiples secuencias (imágenes) de resonancia magnética en la próstata permite una estimación más precisa del riesgo de enfermedad

clínicamente significativa, reduciendo el sobrediagnóstico de la enfermedad y el uso de biopsias innecesarias (Ahmed et al., 2017; James, 2014).

Además del PSA, existen otros exámenes de detección temprana que continúan en investigación como phi y 4Kscore (biomarcadores derivados del PSA) que contemplan y combinan los resultados del PSA sérico total, PSA libre, proPSA y la calicreína humana 2 (KLK2). También se encuentran los exámenes donde se evalúa el antígeno prostático 3 (PCA3) o el gen de fusión TMPRSS2-ERG. Estos últimos exámenes son evaluados en muestras de orina recolectadas después de un examen rectal digital, ya que algunas células de la próstata se desprenden y se liberan en la orina durante el examen (Schatten, 2018).

Estas nuevas tecnologías, lejos de excluir a las ya existentes (como el PSA o el tacto rectal digital), pueden ayudar a brindar al médico un mejor perfil sobre la enfermedad, lo que permite llevar a cabo un diagnóstico más certero y tener un mejor pronóstico brindando mejores opciones terapéuticas al paciente.

2.6 Clasificación

El esquema de clasificación más ampliamente aceptado para el adenocarcinoma de próstata es el desarrollado por Donald Gleason entre los años 1966 y 1974 (Helpap & Egevad, 2009; Shah & Zhou, 2016). Este sistema de clasificación ha sufrido modificaciones a lo largo de los años, siendo la última modificación en el año 2014 por la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) (Shah & Zhou, 2016).

En general, el método consiste en clasificar los patrones histológicos por el grado de diferenciación glandular y el patrón de crecimiento del tumor en el estroma prostático. El grado Gleason establece cinco patrones histológicos nombrados del 1 al 5. Por convención, el proceso consiste en realizar una biopsia prostática con ayuda de una ecografía transversal para obtener de 10 a 12 muestras de tejido (Litwin & Tan, 2017). Un patólogo examina estas muestras y dado que en el análisis histológico generalmente abarca dos o más patrones Gleason, el clínico emite un grado Gleason primario para el patrón histológico predominante y un grado secundario para el patrón más prevalente después del predominante. Finalmente, estos patrones son sumados para obtener el valor final que es

denominado puntaje Gleason. En aquellos casos con un solo patrón, este se multiplica por dos para obtener el puntaje Gleason (Chen & Zhou, 2016).

A continuación, se describe brevemente la asignación de los patrones descritos por Gleason y se representan en la **Figura 12** (Humphrey, 2004).

- Gleason 1: Este es un patrón raro de crecimiento caracterizado por acinos redondos u ovalados muy bien diferenciados de tamaño mediano, uniformes y compactos.
- Gleason 2: Este patrón bien diferenciado forma masas menos definidas que no están tan circunscritas como el patrón 1. Hay una mayor presencia de estroma que separa los acinos y estos son menos redondeados.
- Gleason 3: Este es el patrón de crecimiento más común del adenocarcinoma prostático. Se distingue por tener una extensión irregular, acinos pequeños a muy pequeños y formaciones glandulares alargadas, grandes y angulares. Este patrón a su vez se compone de subpatrones: 3A, 3B, 3C. 3A se caracteriza por glándulas individuales infiltrantes de tamaño mediano, de forma y espaciamiento irregular, generalmente con separación estromal amplia; 3B es prácticamente igual a 3A excepto por que las glándulas son de tamaño menor; 3C se compone de cilindros o conductos expandidos con masas de tumor cribiforme o papilar. Debido a que no se ha demostrado una diferencia en la agresividad de estos tres subpatrones no es necesario diferenciarlos durante el análisis histológico, no obstante, la presencia de estos subpatrones ayuda al reconocimiento del patrón 3 en general.
- Gleason 4: Este patrón es considerado un crecimiento de carcinoma de alto grado y muy poco diferenciado, con masas irregulares infiltrantes. Los arreglos celulares pueden fusionarse en forma microacinar, cribiforme o papilar.
- Gleason 5: Este es el patrón de crecimiento menos diferenciado. Puede presentarse en dos formas: 5A y 5B. No hay necesidad de diferenciar entre el patrón 5A o 5B, la distinción es únicamente para el propósito del

reconocimiento del patrón 5 en el diagnóstico. 5A contiene masas lisas redondeadas, cordones o cilindros de carcinoma con necrosis típicamente central rodeada de masas papilares cribiformes o sólidas de carcinoma. 5B se compone de masas y láminas irregulares de células de adenocarcinoma anaplásico, con muy poca diferenciación.

Aunque se puede obtener un valor de puntaje Gleason entre 2 y 5, estos no se asignan y, de hecho, los patrones 1 y 2 son muy poco prácticos en la clínica debido a la ambigüedad del tejido por lo que el patrón de Gleason en la práctica contemporánea comienza con el patrón 3 y el puntaje de Gleason en el valor 6 (Shah & Zhou, 2016). Según el nuevo sistema de clasificación Gleason propuesto en 2014, un puntaje 6 abarca tumores de grado 1, el puntaje 7 (3+4=7) es grado 2, el puntaje 7 (4+3=7) es grado 3, el puntaje Gleason 8 es grado 4 y los puntajes Gleason 9 o 10 son grado 5 (Chen & Zhou, 2016).

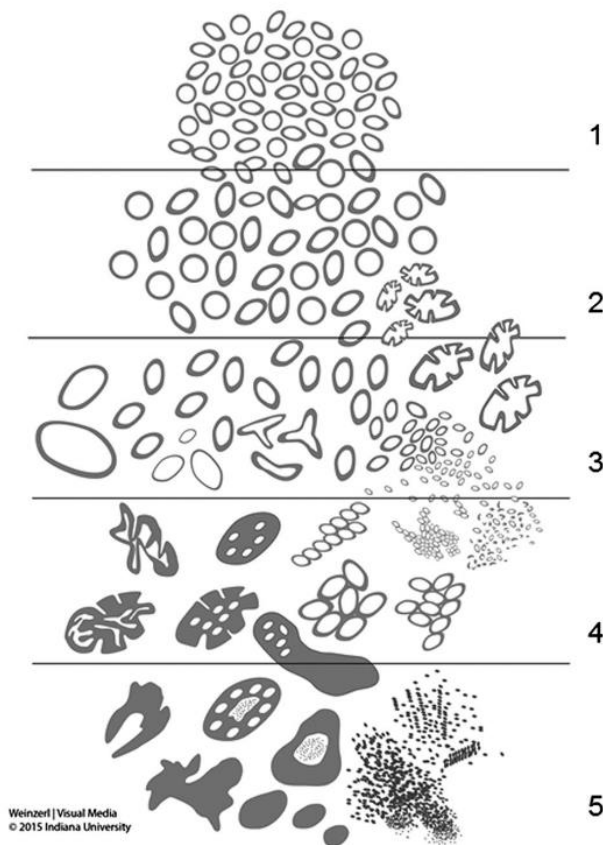


Figura 12. Esquema de clasificación Gleason para el cáncer de próstata. Se representan los cinco patrones de crecimiento descritos por Gleason en 1966. Imagen extraída de (Shah & Zhou, 2016).

2.7 Tratamiento

El tratamiento del cáncer de próstata depende del grado del tumor, el estadio y la edad. El tratamiento puede variar desde la vigilancia activa hasta una combinación de cirugía, quimioterapia, radiación y/o terapia de privación de andrógenos. En pacientes diagnosticados con enfermedad localizada y de bajo riesgo, el abordaje de elección es la vigilancia activa, la cual consiste en la realización periódica de pruebas de PSA, exámenes físicos, biopsias de próstata o una combinación de estos para monitorear la progresión de la enfermedad, con la finalidad de realizar una intervención mayor en aquellos que desarrollen una enfermedad significativa (Litwin & Tan, 2017). El manejo con vigilancia activa puede ser una alternativa para reducir la frecuencia de resultados adversos que representa el tratamiento activo inmediato para hombres con cáncer de próstata de bajo riesgo que probablemente nunca experimenten síntomas relacionados con el cáncer (Garisto & Klotz, 2017; Tosoian et al., 2011).

El tratamiento de la enfermedad localmente avanzada y de alto riesgo consiste en cirugía, que incluye prostatectomía radical seguida de linfadenectomía pélvica. Este método puede ayudar a reducir la mortalidad, riesgo de metástasis y la progresión local de cáncer de próstata (F. Chen & Zhao, 2013). Como terapia posterior a la prostatectomía radical se utilizan diferentes tipos de radioterapia. La braquiterapia es un tipo de radioterapia que está indicada en pacientes con enfermedad de bajo riesgo o riesgo intermedio, mientras que la radioterapia de haz externo generalmente es utilizada en pacientes con enfermedad local de alto grado (Evans, 2018).

Los pacientes que recaen después de la prostatectomía son sometidos a una terapia de privación de andrógenos para la recaída local, o a una terapia de privación de andrógenos combinada con quimioterapia o nuevos agentes dirigidos a la señalización de andrógenos para la recaída sistémica (Nordeen et al., 2021). Los andrógenos, en particular la testosterona y la dihidrotestosterona, son hormonas masculinas capaces de unirse al receptor de andrógenos (AR), mecanismo esencial de mantenimiento de la fisiología de la próstata. En el cáncer, la unión de los andrógenos al AR promueve la supervivencia y crecimiento de las células del cáncer de próstata, por lo que la supresión en la síntesis o señalización

de los andrógenos (bloqueo del receptor) representan una terapia de gran utilidad para este tipo de cáncer (C. Dai et al., 2017). Los fármacos utilizados en la terapia de privación de andrógenos suelen ser análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (agonistas de la hormona liberadora luteinizante (LHRH), antagonistas de LHRH e inhibidores del citocromo p450) y antiandrógenos, que bloquean la señalización androgénica (Evans, 2018).

La quimioterapia no es el tratamiento principal para el cáncer de próstata, a diferencia de la mayoría de los tumores sólidos, sin embargo, esta ha demostrado eficacia mediante el uso de docetaxel y cabazitaxel. Estos fármacos actúan previniendo la despolimerización de la tubulina logrando una disminución en la división celular y finalmente muerte celular (Nevedomskaya et al., 2018; Quinn et al., 2017).

A pesar de los esfuerzos por describir los mecanismos que conllevan al desarrollo y progresión de la enfermedad, se conoce poco sobre el papel de los componentes del microambiente tumoral como las plaquetas.

3. PLAQUETAS

3.1 Generalidades

Las plaquetas o trombocitos son células sanguíneas anucleadas que derivan de los megacariocitos, tienen forma de disco biconvexo y un tamaño de entre 2 a 4 μm . Estas células tienen como función principal el mantenimiento de la hemostasis (Holinstat, 2017). Las plaquetas representan el segundo tipo celular más abundante en la sangre después de los eritrocitos y provienen principalmente de los megacariocitos de médula espinal (Grasso et al., 2020; Holinstat, 2017; Maurer & Ferrari de Andrade, 2020; Melchinger et al., 2019a), sin embargo, se ha reportado que los megacariocitos de pulmón también pueden producir plaquetas, aunque aún se desconoce por qué se producen en este último órgano o si su producción ahí tiene alguna función en específico (Lefrançois et al., 2017).

En circulación las plaquetas tienen una vida media de 7 a 10 días y un adulto sano tiene un recuento plaquetario en un rango de 150,000-450,000 plaquetas por microlitro de sangre, aunque estos valores varían con la edad y el estado de salud (Anvari et al., 2021; Melchinger et al., 2019b). Estudios estiman que las plaquetas son renovadas a una velocidad de 35,000 plaquetas por microlitro por día y que un megacariocito es capaz de producir 1000 plaquetas aproximadamente (Melchinger et al., 2019b; Rodriguez-Martinez et al., 2022).

Las plaquetas presentan en su citoplasma tres tipos de gránulos de secreción heredados de su célula precursora: gránulos densos, gránulos α y lisosomas. Los gránulos densos contienen en su interior ADP, ATP, fosfato inorgánico, polifosfatos, serotonina y calcio, entre otros elementos (Yun et al., 2016). Los gránulos α son reservorios de proteínas que van desde factores de crecimiento y citocinas hasta moléculas de adhesión (P-selectina) o receptores que utiliza la plaqueta para interactuar con otras células (GP IIb/IIIa) (Schlesinger, 2018). Los lisosomas contienen elastasas y otras proteínas que facilitan la degradación de la matriz extracelular, además de crear un ambiente ácido que favorecerá la acción de estas enzimas (Holinstat, 2017). Además de dichos gránulos de secreción, las plaquetas contienen mitocondrias, diferentes tipos de RNA (rRNA, mRNA, miRNA), un espliceosoma y una maquinaria de traducción de proteínas. Estos

componentes son precargados del megacariocito a la plaqueta durante la biogénesis plaquetaria y son necesarios para la integridad celular (González-Villalva et al., 2019; Varkey & Nicolaidis, 2021; Yun et al., 2016).

Históricamente las plaquetas fueron ignoradas y denominadas por mucho tiempo “polvo celular” (Garraud & Cognasse, 2015), no obstante, el estudio de las plaquetas ha emergido recientemente y ha ganado interés debido a su participación en otros procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluido el cáncer (Holinstat, 2017; van der Meijden & Heemskerk, 2019; Varkey & Nicolaidis, 2021).

3.2 Plaquetas y cáncer

Las plaquetas tienen un papel activo en la biología del cáncer y a su vez, estas son afectadas por el cáncer. La interacción entre plaquetas y cáncer fue observada por primera vez por Trousseau en 1868 cuando describió que la coagulación espontánea es común en pacientes con cáncer, lo que indicaba que las plaquetas circulantes se veían afectadas por el cáncer (Anvari et al., 2021; Varkey & Nicolaidis, 2021; Victor & Rose, 1882). Más tarde, en 1877, Billroth describió trombos que contenían elementos tumorales y células tumorales malignas, apoyando la hipótesis de que los trombos eran elementos clave para la metástasis (In 'T Veld & Wurdinger, 2019). Estas dos primeras observaciones han sido fundamentales para describir los hallazgos que hasta hoy en día se han realizado y que apoyan el fortalecimiento del vínculo bidireccional entre plaquetas y cáncer.

En 2010, Zaslavsky y su grupo de investigación demostró que el número de megacariocitos en la médula ósea aumentaba en respuesta a cáncer, hallazgo que fue observado también en el conteo plaquetario. Este aumento en el conteo de megacariocitos y de plaquetas era considerado hasta entonces una respuesta sistemática para suprimir la respuesta tumoral (Zaslavsky et al., 2010), sin embargo, ahora se conoce que las células cancerígenas pueden secretar diversos factores que estimulan e incrementan la producción de plaquetas lo que lleva al desarrollo de trombocitemia, o el aumento del número plaquetario (Anvari et al., 2021; Maurer & Ferrari de Andrade, 2020). Por otro lado, algunos estudios

sugieren que las plaquetas son capaces de secuestrar proteínas derivadas de tumor y almacenarlas dentro de su citoplasma (Klement et al., 2009), teniendo un papel importante en la comunicación celular local y distal (Kerr et al., 2014; Klement et al., 2009). Este mismo fenómeno se ha descrito con miRNAs y mRNAs, los cuales pueden ser almacenados dentro de vesículas plaquetarias y ser exportados cuando las plaquetas son activadas (Liang et al., 2015; Mantini et al., 2021). Dado estos hallazgos, en recientes años se ha acuñado el término “plaquetas educadas por tumor” a aquellas plaquetas que han estado en contacto con células cancerígenas y han modificado su transcriptoma o proteoma (Best et al., 2015; In 'T Veld & Wurdinger, 2019). El contacto entre plaquetas y células cancerígenas tiene lugar en el torrente sanguíneo una vez que el cáncer ha comenzado a propagarse (cascada metastásica).

3.3 Interacción célula tumoral-plaqueta

El contacto directo entre las plaquetas y las células cancerígenas en circulación puede desencadenar la activación de vías de señalización en las células cancerígenas, lo cual podría favorecer la transición epitelio-mesénquima, el crecimiento tumoral y la metástasis en algunos tipos de cáncer (Gay & Felding-Habermann, 2011; Labelle et al., 2014; Maurer & Ferrari de Andrade, 2020). La metástasis es el proceso de propagación del cáncer y comprende tres etapas principales (cascada metastásica): la fase de intravasación, la fase intravascular y la fase de extravasación. Se ha sugerido que las plaquetas son capaces de promover la progresión tumoral en todas las etapas de la metástasis (Gay & Felding-Habermann, 2011; Johnson et al., 2019; Varkey & Nicolaidis, 2021) **(Figura 14)**.

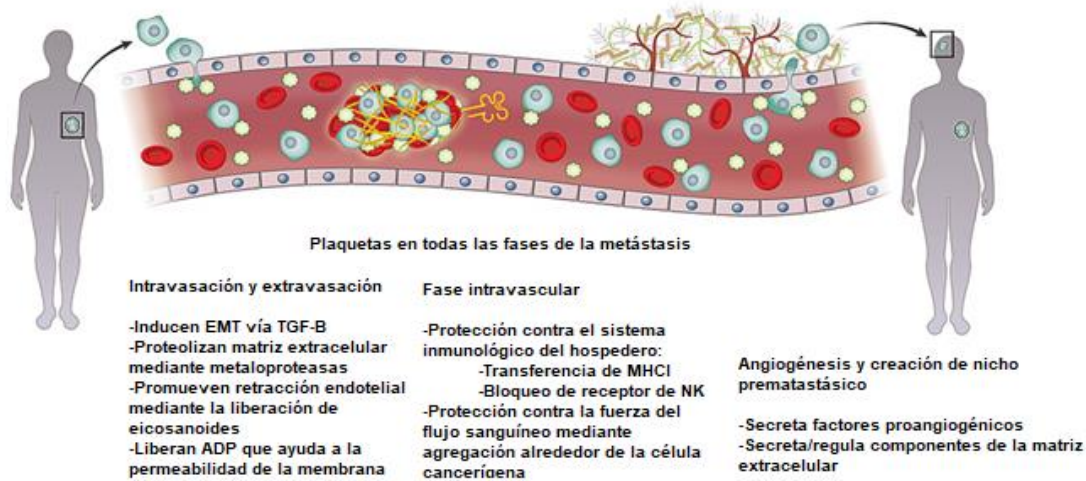


Figura 14. Cascada metastásica mediada por plaquetas. La cascada metastásica comprende generalmente de tres etapas: la fase de intravasación donde las células tumorales entran al vaso sanguíneo con ayuda de moléculas liberadas por las plaquetas; la fase intravascular donde las plaquetas se unen a células cancerígenas mediante diferentes moléculas de superficie para conferirles protección mecánica y protección contra el sistema inmunológico del hospedero; y finalmente la fase de extravasación donde las células cancerígenas son capaces de salir del vaso sanguíneo con ayuda de moléculas liberadas tanto por ellas mismas como por plaquetas. Imagen obtenida y modificada de (Varkey & Nicolaidis, 2021).

3.3.1 Fase de intravasación

Algunos autores sugieren que las plaquetas promueven la invasión de células tumorales hacia los vasos sanguíneos locales mediante la liberación de factores de crecimiento (como TGF- β o IL-8), los cuales pueden inducir la transición epitelio-mesénquima y permitir la adhesión de células cancerígenas. La matriz extracelular es entonces degradada mediante la acción de las metaloproteasas que pueden ser liberadas tanto por células cancerígenas como plaquetas lo cual permite la entrada de células cancerígenas al vaso sanguíneo (Varkey & Nicolaidis, 2021). Esta degradación en la matriz extracelular es acompañada de la liberación de metabolitos eicosanoicos (tromboxanos, prostaglandinas) por parte de las plaquetas activadas, los cuales facilitan la retracción de células endoteliales creando aberturas a través de las cuales las células tumorales pueden pasar. En adición, el ADP que es liberado a partir de los gránulos de secreción plaquetarios contribuyen aumentando la permeabilidad de la membrana basal (Varkey & Nicolaidis, 2021).

3.3.2 Fase intravascular

En circulación, se ha sugerido que las plaquetas ayudan y se unen a las células cancerígenas brindando protección mecánica y, ayudando a la evasión del sistema inmunológico del hospedero mediante múltiples mecanismos. Estudios sugieren que las plaquetas son capaces de unirse a las células cancerígenas mediante moléculas de superficie como el factor tisular, los ligandos de P-selectina o las integrinas GPIIb/IIIa lo que desencadena una cascada de activación plaquetaria y la formación de un trombo que ayuda a las células cancerígenas a soportar la fuerza mecánica del torrente sanguíneo. Se cree que una vez unidas y activadas, las plaquetas pueden proteger a las células cancerígenas de las células Natural Killer (NK) a través de 1) la transferencia del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I hacia las células cancerígenas por trogocitosis, lo que lleva a las células cancerígenas a pasar desapercibidas por el sistema inmunológico al reconocerse como "propias" (Cluxton et al., 2019; Placke et al., 2012) y 2) a través de la liberación o secreción de diferentes citocinas como TGF β 1 o TNF que pueden modular la expresión de NKG2D, CD96 y CD226 en células NK, receptores que son capaces de reconocer células cancerígenas (Cluxton et al., 2019; Kopp et al., 2009). El TGF- β que es secretado por las plaquetas activadas también se cree puede limitar la actividad y las funciones de las células CD4⁺ y CD8⁺ (Varkey & Nicolaidis, 2021; Yu et al., 2021).

3.3.3 Fase de extravasación

En la fase de extravasación las células cancerígenas salen del torrente sanguíneo. Se ha sugerido que las plaquetas llevan a cabo un mecanismo similar al que llevan en la fase de intravasación. Las plaquetas pueden liberar elementos como TGF- β y ADP para permitir que las células cancerígenas se adhieran al endotelio vascular. Cuando las células cancerígenas se unen al endotelio vascular pueden degradar la matriz extracelular con ayuda de metaloproteasas liberadas tanto por las mismas células cancerígenas como por las plaquetas activadas y la liberación de eicosanoides por parte de las plaquetas puede facilitar que las células cancerígenas pasen través del endotelio vascular. Estos mecanismos pueden

permitir que las células cancerígenas continúen con su proceso metastásico ahora en algún tejido distal al tumor primario (Varkey & Nicolaides, 2021).

Debido a la importancia en el estudio de las plaquetas en cáncer, es necesario dirigir la atención al establecimiento de modelos que permitan estudiar los mecanismos que median la interacción entre plaquetas y células cancerígenas, con el fin de entender cómo las plaquetas pueden ayudar a promover el cáncer y la metástasis y a su vez entender cómo las plaquetas son influenciadas y modificadas por las células cancerígenas.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata es una de las neoplasias más comunes que afectan a los varones en el mundo entero y en México. A pesar de que hoy en día el cáncer de próstata está bien caracterizado surgen nuevas interrogantes a los mecanismos que llevan al desarrollo del cáncer y la metástasis, entre ellas, el papel de los componentes del microambiente tumoral como las plaquetas.

Las plaquetas son células sanguíneas que tienen como función principal el mantenimiento de la hemostasia. Sin embargo, se sabe que las interacciones entre células cancerígenas y plaquetas juegan un papel importante en la protección de las células cancerígenas del sistema inmunológico del hospedero. Por otro lado, evidencia sugiere que las plaquetas pueden favorecer la proliferación, la propagación e invasión celular, así como favorecer la transición epitelio-mesénquima en algunos tipos de cáncer como mama, páncreas, ovario y próstata. Sin embargo, los mecanismos moleculares (entre ellos las interacciones célula-plaqueta) que llevan a la progresión tumoral en cáncer de próstata no han sido totalmente explorados.

La falta de información sobre la interacción entre plaquetas y células de cáncer de próstata se debe a la falta de modelos que permitan estudiar estas interacciones físicas. Por lo tanto, el presente trabajo busca desarrollar un modelo de cocultivo celular para poder estudiar a futuro las interacciones físicas entre plaquetas y células de cáncer de próstata y de esta manera estudiar los mecanismos que llevan a la progresión del cáncer de próstata y la metástasis.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se puede desarrollar un modelo de cocultivo celular entre líneas celulares de cáncer de próstata y plaquetas sin que se vea afectada la viabilidad de las células cancerígenas?

6. HIPÓTESIS

Las plaquetas no alterarán la viabilidad celular, lo que permitiría el establecimiento de un cocultivo con líneas celulares de cáncer de próstata.

7. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y estandarizar un modelo de cocultivo celular entre líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP y PC3) y plaquetas.

7.1 Objetivos particulares

- Obtener las condiciones óptimas para el aislamiento y la purificación de plaquetas a partir de muestras sanguíneas de individuos sanos, donde la muestra presente la mayor cantidad de plaquetas sin comprometer su pureza (contaminación con células sanguíneas).
- Caracterizar a las plaquetas morfológica y fisiológicamente
- Obtener la concentración adecuada de plaquetas para establecer el cocultivo celular sin comprometer la viabilidad celular de las células tumorales.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se utilizaron líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP (ATCC® CRL-1740™) y PC3 (ATCC® CRL-1435™) obtenidas de ATCC (The American Type Culture Collection). El cultivo se estableció en frascos de 25 cm² mantenido con medio RPMI 1640 (Corning® 10-040-CM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco® 16000044). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Las características de las líneas celulares utilizadas se describen a continuación:

- LNCaP (ATCC® CRL-1740™): Células epiteliales adherentes derivadas a partir de una lesión metastásica a nódulo linfático de adenocarcinoma prostático humano. Receptor de andrógenos positivo, sensible a andrógenos.
- PC-3 (ATCC® CRL-1435™): Células epiteliales adherentes derivadas a partir de metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático de alto grado. Receptor de andrógenos negativo, independiente de andrógenos.

Estandarización del aislamiento de plaquetas

Se extrajeron 6 mL de sangre por venopunción en tubos con EDTA (BD Vacutainer® EDTA 10.8mg). Se probaron diferentes condiciones de aislamiento reportados previamente en la literatura, variando el tiempo de centrifugado y la fuerza g. La centrifugación diferencial permitió separar a la sangre en fases: fase plasmática (que a su vez contiene plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas), fase blanca y fase roja (**Figura 15**). El plasma rico en plaquetas fue la fracción plasmática de interés para el estudio.

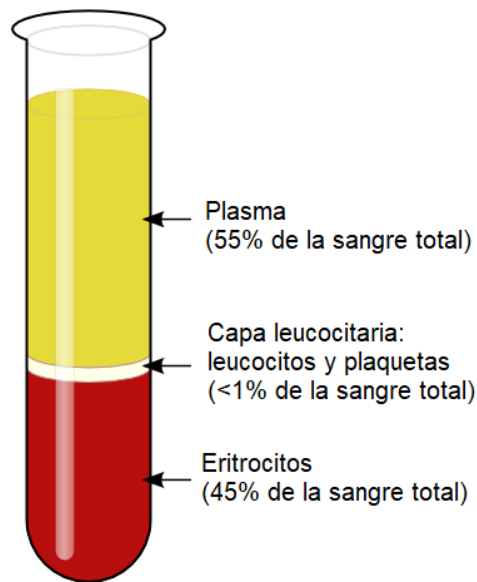


Figura 15. Fases obtenidas tras la centrifugación de sangre anticoagulada. Las fases que se forman tras la centrifugación de la sangre son tres: fracción plasmática que a su vez se compone de plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas; fracción blanca donde se encuentran leucocitos y plaquetas; y fracción roja donde se encuentran los eritrocitos.

Se realizaron dos pasos de centrifugación. El primer paso de centrifugado se realizó para formar las fases de la sangre y poder extraer el plasma rico en plaquetas que se encuentra justo por encima de la fase blanca. El plasma rico en plaquetas se traspasó a un tubo de 15 mL en condiciones de esterilidad y posteriormente se llevó a cabo el segundo paso de centrifugado, el cual se realizó para sedimentar a las plaquetas y formar el pellet plaquetario. El pellet generado se resuspendió en 1 mL de buffer HEPS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3.8 mM HEPES, 5 mM EDTA, pH 7.3). Se realizó el conteo plaquetario mediante cámara de Neubauer y posteriormente se realizó el registro fotográfico.

Los criterios para elegir el método fueron el conteo plaquetario (mayor cantidad de plaquetas) y la pureza de las muestras de plaquetas (de 1 a 5 células sanguíneas por cada millón de plaquetas (Best et al., 2015)).

Frotis sanguíneo y tinción de Wright

Se colocaron 4 μ L de la muestra (sangre total, plasma rico en plaquetas con eritrocitos o plaquetas aisladas) en un portaobjetos para realizar el frotis sanguíneo. Se dejó secar el frotis durante 3 minutos y se procedió a realizar la

tinción de Wright. Para fijar a las células se adicionó metanol (SigmaAldrich® HPLC Plus, $\geq 99.9\%$) al 100% durante 3 minutos y se retiró. Seguido, se adicionó azul de metileno cubriendo todo el portaobjetos durante 30 segundos y se retiró. Posteriormente, se adicionó eosina Y cubriendo el portaobjetos durante 1 minuto y se retiró. Finalmente, se lavó con abundante agua MQ cuidando de no despegar el frotis. Se dejó secar y se realizó el registro fotográfico de cada una de las muestras analizadas.

Caracterización de plaquetas por marcador de superficie

Se extrajeron 6 mL de sangre por venopunción en un tubo con EDTA (BD Vacutainer® EDTA 10.8mg). Se aislaron las plaquetas según el método seleccionado previamente (200 g/15 min - 1,000 g/10 min) y se resuspendieron en 1000 μ L de buffer HEPS.

En un portaobjetos previamente adicionado con poli-L-lisina (SigmaAldrich® P4707) se agregó en una dilución 1:20 las plaquetas resuspendidas en buffer HEPS durante 30 minutos. Seguido, se lavó dos veces con PBS y se adicionó el anticuerpo primario α -CD41 (abcam® ab134131) en un título de 1:100 durante 30 minutos. Nuevamente se lavó dos veces con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario α -Alexa488 (abcam® ab150077) en un título de 1:1000 durante 60 minutos. Finalmente se lavó dos veces con PBS. El registro fotográfico fue realizado en microscopio de fluorescencia (EVOS® FLc).

Caracterización funcional de plaquetas mediante adición de CaCl_2 (Prueba de agregación plaquetaria)

Se extrajeron 6 mL de sangre por venopunción en un tubo con EDTA (BD Vacutainer® EDTA 10.8 mg). Se aislaron las plaquetas según el método seleccionado previamente y el volumen obtenido de plaquetas se distribuyó en 5 microtubos. Se realizó una curva a diferentes concentraciones de CaCl_2 : 0.01, 0.02, 0.025 y 0.03 M. La curva de concentraciones se dejó reposar durante 15 minutos y se realizó el registro fotográfico. El protocolo realizado fue similar al ya reportado por (Toyoda et al., 2018).

Ensayos de viabilidad con buffer HEPS

En placas de 96 se sembraron 20,000 células LNCaP por pozo y 8,000 células PC3 por pozo con medio RPMI 1640 sin rojo de fenol adicionado con SFB al 10%. Para evaluar el efecto de la exposición a buffer HEPS se les reemplazó el medio de cultivo por RPMI 1640 sin rojo de fenol suplementado con 0.1% de Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum (CS-FBS) (Gibco™,12676029) veinticuatro horas previas al tratamiento. Bajo estas condiciones se realizó el tratamiento con buffer HEPS a diferentes concentraciones para ambas líneas celulares: 1, 5 y 10%. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium] (abcam® ab211091) a diferentes tiempos: 6, 24, 48 y 72 h. Para los ensayos se utilizó una concentración de MTT al 50% para cada concentración y cada tiempo y DMSO al 10% como control negativo. El medio fue reemplazado por 50 µL de medio sin suero y 50 µL de MTT por 3 horas a 37°C. Posteriormente, se añadieron 100 µL de SDS para solubilizar los cristales de formazán formados. La absorbancia se leyó a 590 nm en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (Biotek, Microplate Spectrophotometer).

Cocultivo celular

Los cocultivos celulares se establecieron en placas de 6 pozos. En cada pozo se sembraron 200,000 células LNCaP y 45,000 células PC3 y se dejaron crecer durante 120 h para alcanzar una confluencia del 60%. Cuando las células alcanzaron la confluencia, el medio fue reemplazado con RPMI 1640 con 0.1% de CS-FBS con la finalidad de inhibir la proliferación celular. Posteriormente, se aplicó la exposición a diferentes concentraciones de plaquetas resuspendidas en buffer HEPS. La cantidad de plaquetas por célula tumoral siguieron las siguientes proporciones:

Célula tumoral	Plaquetas
1	100
1	200

1	300
1	400
1	500

Los cocultivos establecidos se realizaron a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 h. Como control positivo se utilizó SFB al 10% y como control negativo DMSO al 10%.

Evaluación de la viabilidad celular en los cocultivos mediante citometría de flujo

Una vez establecidos los cocultivos y transcurrido el tiempo de exposición entre plaquetas y células tumorales se procedió a evaluar la viabilidad de las células tumorales en los cocultivos mediante citometría de flujo. Para la preparación de la muestra se recolectó el medio por separado de cada uno de los seis pozos de la placa en tubos de 15 mL; importante no desechar dicho medio pues en él van resuspendidas células no viables que servirán para evaluar la viabilidad celular. Seguido, se lavó cada uno de los pozos con PBS 1X para retirar exceso de suero y se traspasó a los tubos donde se recolectó el medio. Las células se separaron de la placa mediante tripsina y se transfirieron a su tubo correspondiente. Los tubos con las células y el medio recolectado se centrifugaron a 80 g durante 3 minutos a temperatura ambiente y se deshechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 mL de PBS 1X adicionado de SFB al 2%. Se realizó otro paso de centrifugación a las mismas condiciones (80 g durante 3 minutos) y el pellet formado se resuspendió en 600-700 μ L de PBS 1X adicionado SFB al 2%, el cual fue transferido a tubos de citometría (Corning™352235, 5 mL). Finalmente, se adicionó yoduro de propidio para una concentración final de 10 μ g/mL y se dejó incubando en hielo y oscuridad durante 15 min. Se realizaron las lecturas de las muestras en citómetro.

Inmunofluorescencia del cocultivo

Para realizar la inmunofluorescencia se trató una placa de 6 pozos con poli-L-lisina (SigmaAldrich® P4707) previo al establecimiento del cocultivo. Para el cocultivo se

sembraron 200,000 células LNCaP y 45,000 células PC3 y se dejaron crecer durante 120 h para alcanzar una confluencia del 60%. Cuando las células alcanzaron la confluencia, el medio fue reemplazado con RPMI 1640 con 0.1% de CS-FBS. Posteriormente las células se trataron con una concentración de plaquetas por célula tumoral de 100 y 24 h de exposición. Tras el tiempo de exposición se lavó dos veces con PBS y se adicionó α -CD41 (abcam® ab134131) en un título de 1:100 durante 30 minutos. Nuevamente se lavó dos veces con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario α -Alexa488 (abcam® ab150077) en un título de 1:1000 durante 60 minutos. Finalmente, se lavó dos veces con PBS y se adicionó DAPI (Invitrogen™ D1306) en una concentración de 5 μ M durante 20 min. Se realizó el registro fotográfico en microscopio de fluorescencia (EVOS® FLc).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada ensayo fueron analizados en el software GraphPad Prism 7 (Software GraphPad, Versión 5.01, La Jolla, CA, EE. UU.). El análisis estadístico de los ensayos de viabilidad celular tanto por MTT como por citometría de flujo se realizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnet. 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.

9. RESULTADOS

Estandarización del método de aislamiento de plaquetas

Para la estandarización del método de aislamiento de plaquetas se recabaron y evaluaron distintos métodos reportados previamente en la literatura mostrados en la **Tabla 2**. El método de elección fue aquel que permitió la obtención de plaquetas en mayor número y mayor pureza, este último criterio contempla la presencia de no más de cuatro células por cada millón de plaquetas (Best et al., 2015). En general, el procedimiento que se siguió para evaluar cada uno de los métodos recabados fue similar y sólo se describirán a continuación los resultados del método seleccionado.

El método seleccionado comprende dos pasos de centrifugación, el primero a 200 x g durante 15 minutos con la finalidad de separar a la sangre en fases (**Figura 16A-16B**) y el segundo a 1000 x g durante 10 minutos para obtener el pellet plaquetario a partir de la fase plasmática donde se encuentra el plasma rico en plaquetas (**Figura 16C-16D**). Este método permitió aislar la mayor cantidad de plaquetas individuales en comparación con los otros métodos evaluados, como se observa en el rectángulo rojo de la **Tabla 2**.

Métodos de aislamiento de plaquetas

Primera centrifugación		Segunda centrifugación		Número de plaquetas	
RFC	tiempo (minutos)	RFC	tiempo (minutos)	media	DE
120	20	360	20	602167	337729
150	20	900	10	569167	281855
200	10	1550	10	499000	203500
200	15	1000	10	618833	314812
280	10	380	10	381000	88115
350	20	2000	10	556167	235755

RFC: fuerza centrífuga relativa o fuerza g.

DE: desviación estándar

Tabla 2. Métodos de aislamiento de plaquetas reportados en literatura. Se muestran los diferentes métodos utilizados para la estandarización del método de aislamiento de plaquetas. El recuadro rojo indica el método seleccionado.

Proceso de obtención de plaquetas

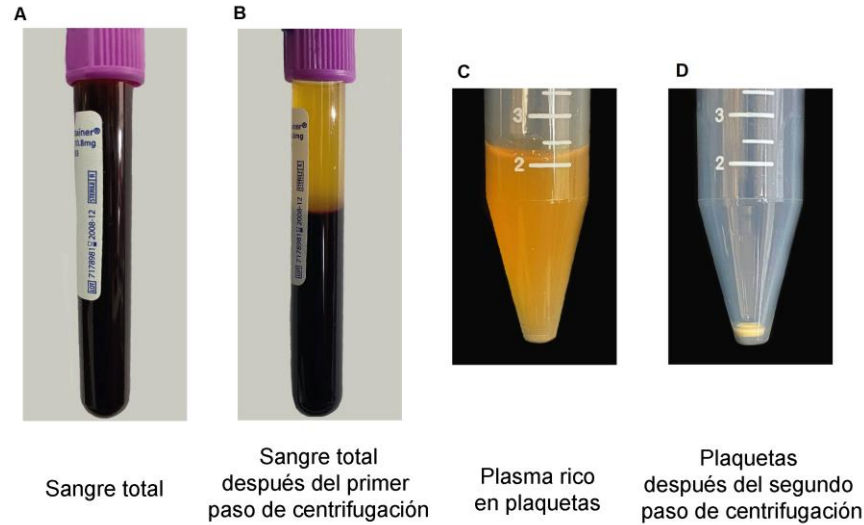


Figura 16. Aislamiento de plaquetas a partir de sangre total. Imágenes representativas del proceso de aislamiento de plaquetas. **(A)** Sangre total obtenida por venopunción en tubos de 6 mL con EDTA. **(B)** Sangre total después del primer paso de centrifugación. **(C)** Plasma rico en plaquetas extraído de la fase plasmática. **(D)** Plaquetas aisladas después del segundo paso de centrifugación (formación del pellet plaquetario).

Evaluación de la pureza plaquetaria

Para confirmar la pureza plaquetaria después del tercer paso de centrifugación del método seleccionado (**Tabla 2**), se observó una muestra de las plaquetas aisladas al microscopio a 40X y se comparó con una muestra de la fase plasmática obtenida después del primer paso de centrifugación observada también al microscopio a 40X. Los resultados indicaron la ausencia de células nucleadas y eritrocitos en la muestra plaquetaria (**Figura 17A**) cumpliendo con el criterio de pureza de no más de 4 células por cada 10 millones de plaquetas (Best et al., 2015), además de observarse plaquetas en abundancia. Por otro lado, los resultados de la muestra de la fase plasmática mostraron la presencia de células nucleadas y eritrocitos (**Figura 17B**), como se esperaba.

En conjunto, los resultados obtenidos confirmaron que el método de aislamiento seleccionado fue el adecuado para la obtención de plaquetas en mayor número y en mayor pureza.

Plaquetas



Plaquetas con células sanguíneas

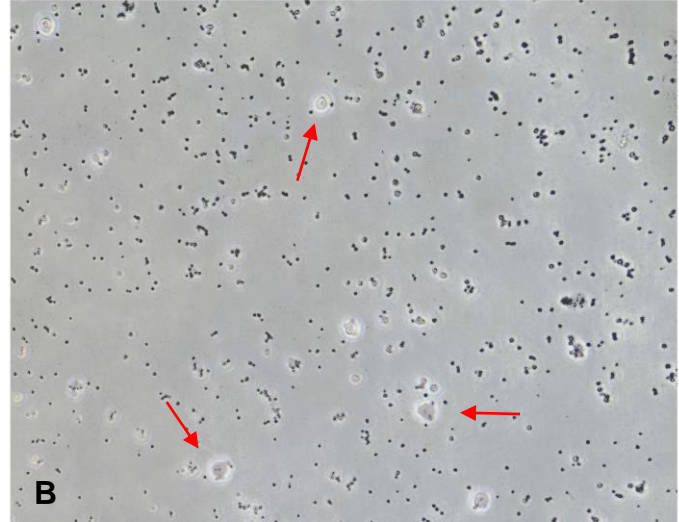


Figura 17. Pureza plaquetaria. (A) Observación al microscopio a 40x de una muestra de plaquetas aisladas a partir del método seleccionado. Se observa que la muestra de plaquetas no presenta contaminación con algún otro tipo de célula sanguínea (B) Observación al microscopio a 40x de una muestra de plaquetas contaminadas con células sanguíneas (flechas rojas) obtenidas después del primer paso de centrifugación del método. Se observa contaminación aparentemente con eritrocitos y leucocitos.

Frotis sanguíneo y tinción de Wright

Con el objetivo de identificar los componentes celulares de la sangre, en particular de las plaquetas y a manera de caracterización citológica, se realizó un frotis sanguíneo a partir de sangre total. El frotis fue teñido mediante una tinción de Wright, una tinción tipo Romanowsky que permite distinguir la forma, tamaño y contorno de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como el núcleo, citoplasma y gránulos de las distintas células presentes en la sangre.

Con la tinción fue posible identificar algunos de los diferentes tipos de células presentes en la sangre como se muestra en la **Figura 17**. Se observaron leucocitos cuyo núcleo y gránulos estaban teñidos de color púrpura, eritrocitos teñidos de color rosa en su totalidad y plaquetas teñidas de color púrpura. Además, fue notable una diferencia entre la densidad celular de eritrocitos presentes en la muestra de sangre total en comparación con la densidad de leucocitos y de plaquetas, colocando a estas últimas como el segundo tipo celular de mayor densidad presente en los dos campos observados del frotis sanguíneo, observación que coincide con lo descrito en la literatura. Estos resultados en

conjunto indicaron la presencia de plaquetas en las muestras sanguíneas y permitieron, al menos a nivel de análisis citológico, una primera caracterización.

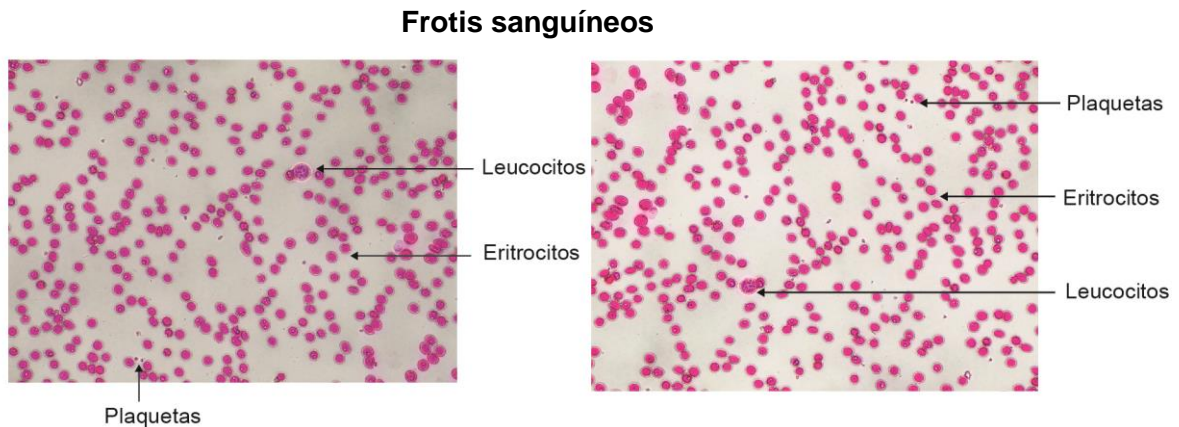


Figura 18. Frotis sanguíneos a partir de sangre total. Observación al microscopio a 40X de dos campos diferentes de un mismo frotis sanguíneo de sangre total teñido con colorante de Wright (azul de metileno y eosina Y). Las flechas negras indican los diferentes componentes celulares encontrados: eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Caracterización de plaquetas por marcador de superficie CD41

Una vez aisladas las plaquetas era necesario caracterizarlas mediante algún marcador de superficie que permitiera confirmar que los componentes aislados eran en realidad plaquetas. Entre los marcadores de superficie más utilizados reportados en literatura se encuentra la integrina GPIIb (antígeno CD41). Esta proteína está involucrada en procesos de activación plaquetaria y funge como receptor de fibrinógeno soluble y del factor de Von Willebrand cuando se asocia de forma no covalente y forma un complejo con otro receptor de superficie, la integrina GPIIIa (antígeno CD61). El antígeno CD41 es la proteína transmembranal más abundante de megacariocitos y plaquetas, por lo tanto, fue el marcador de superficie utilizado para la caracterización plaquetaria mediante microscopia de fluorescencia (**Figura 19**).

Las **Figuras 19A-C** muestran un acercamiento con el objetivo de 60x de una muestra de plaquetas marcadas mediante el marcador de superficie CD41. Las flechas blancas indican la distribución del marcador de superficie CD41 a lo largo

de la membrana citoplasmática de las plaquetas. Posteriormente, se realizó otro acercamiento extra a la toma de 60x (recuadro punteado e imágenes inferiores, (**Figuras 19 D-F**)) y se observó de una manera más detallada cómo el marcador CD41 se distribuía alrededor de las plaquetas (flechas blancas). Estos resultados permitieron caracterizar las plaquetas aisladas a partir de muestras sanguíneas obtenidas por venopunción.

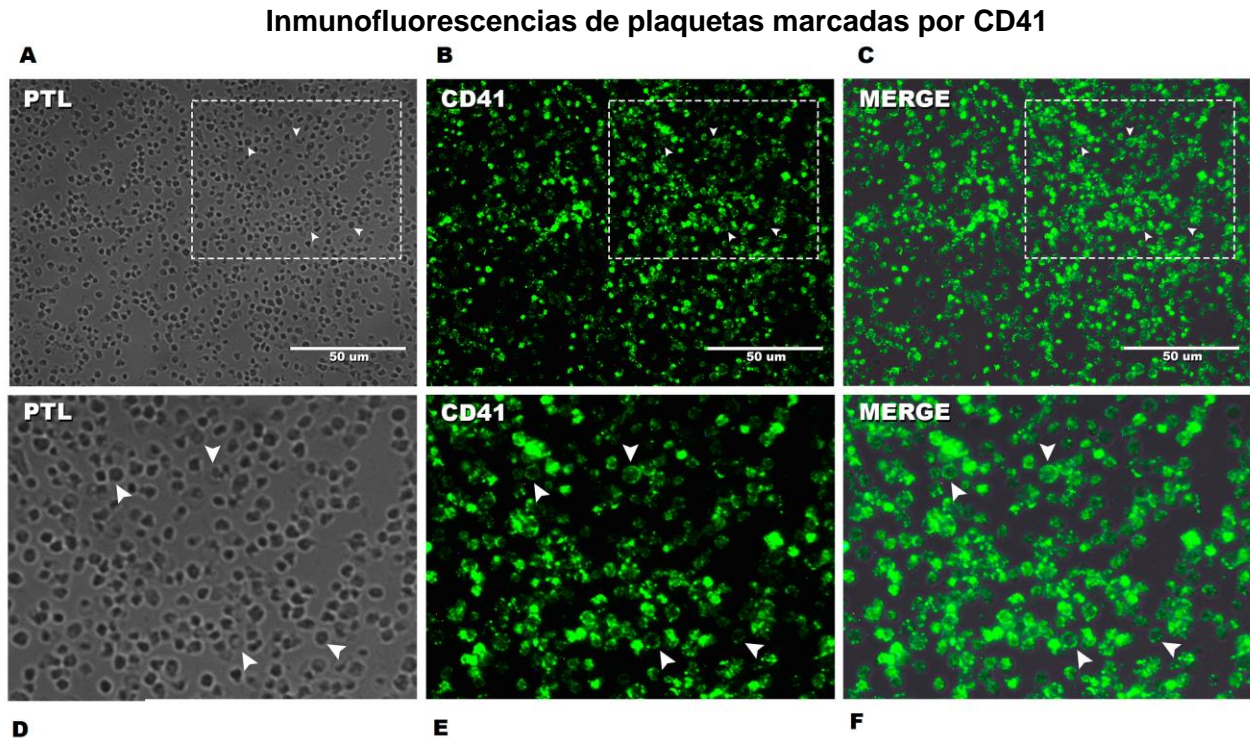


Figura 19. Caracterización de plaquetas por marcador de superficie CD41. Se preparó una muestra de plaquetas aisladas con el protocolo seleccionado y se realizó la inmunofluorescencia con marcador de superficie CD41. (**A-C**) Observación con el objetivo de 60x a una muestra de plaquetas marcadas con el marcador de superficie CD41. Las flechas blancas indican los sitios en donde el marcador CD41 se distribuye a lo largo de la membrana citoplasmática. (**A**) Toma en campo claro. (**B**) Plaquetas marcadas con CD41. (**C**) muestra la co-localización de las plaquetas con el marcador de superficie CD41. (**D-F**) Aumento del recuadro punteado en las imágenes A-C. Las flechas blancas indican los sitios en donde el marcador CD41 se distribuye a lo largo de la membrana citoplasmática. (**D**) Toma en campo claro. (**E**) Plaquetas marcadas con CD41. (**F**) Colocalización de las plaquetas con el marcador de superficie CD41.

Caracterización funcional de las plaquetas

Para confirmar que las plaquetas aisladas seguían siendo funcionales se realizó una prueba de agregación plaquetaria con diferentes concentraciones de CaCl_2 . Se observó la formación de un trombo plaquetario desde la concentración más

baja de 10 mM. Cabe mencionar que para esta prueba de agregación plaquetaria no se utilizó buffer HEPS para resuspender a las plaquetas pues este inhibe la activación plaquetaria; en esta ocasión las plaquetas fueron resuspendidas en PBS 1X. La presencia de agregación plaquetaria desde los 10nM hasta la concentración máxima utilizada (30 nM) indica una funcionalidad fisiológica por parte de las plaquetas. En conjunto, estos resultados confirmaron que las plaquetas siguen siendo activas fisiológicamente después de aislarlas por el método seleccionado.

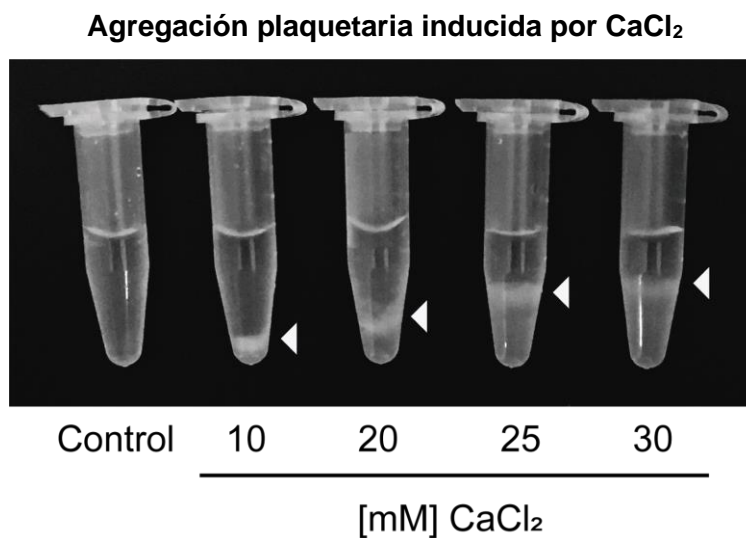


Figura 20. Prueba de agregación plaquetaria. Imagen representativa de una curva de concentraciones de CaCl₂ (10, 20, 25 y 30 mM). El CaCl₂ fue adicionado a aproximadamente 1x10⁸ plaquetas por concentración. Las flechas blancas indican la formación del trombo plaquetario. El ensayo muestra que las plaquetas aisladas son funcionales.

Efecto de Buffer HEPS sobre la viabilidad en líneas celulares de cáncer de próstata

Para determinar si el buffer HEPS, utilizado para resuspender a las plaquetas, tenía algún efecto sobre la viabilidad de las líneas celulares en estudio (LNCaP y PC3), estas se expusieron a diferentes concentraciones del buffer y se evaluó la viabilidad celular a diferentes tiempos mediante ensayos de MTT. Como se observa en la **Figura 21** y **Figura 22** el buffer HEPS no mostró tener algún efecto en la viabilidad de ambas líneas tumorales comparado con el control positivo y control negativo.

Finalmente, la concentración elegida fue la de una concentración de buffer HEPS al 5% debido a que a esta concentración en cualquier tiempo y en ambas líneas tumorales no mostró tener algún efecto en la viabilidad celular. Por lo tanto, de aquí en adelante el buffer HEPS se utilizó a una concentración máxima del 5%.

Viabilidad de la línea celular LNCaP expuesta a buffer HEPS durante 72 h

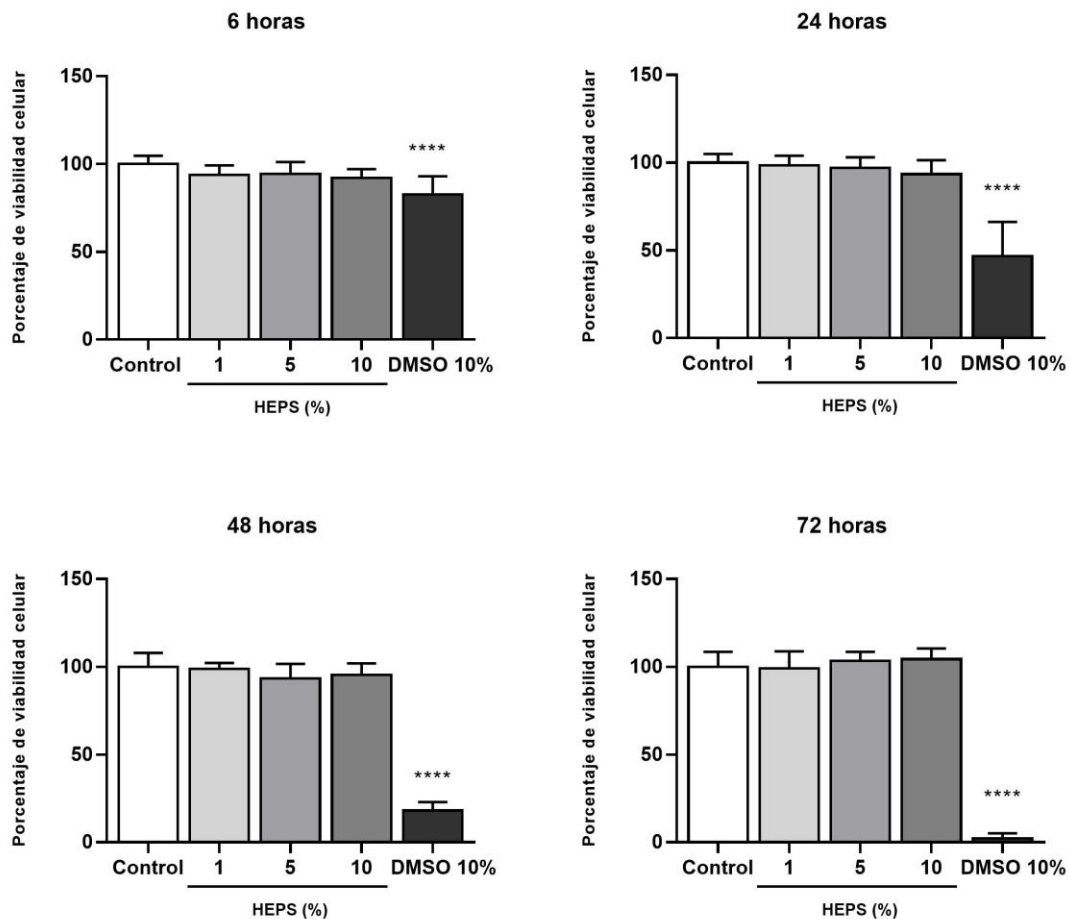


Figura 21. Viabilidad de células LNCaP en exposición a Buffer HEPS. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de Buffer HEPS (1, 5, 10%) por 6-72 horas sobre la viabilidad celular por ensayo de MTT. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde RPMI + SFB 0.1%. Como control negativo se utilizó DMSO 10%.

Viabilidad de la línea celular PC3 expuesta a buffer HEPS durante 72 h

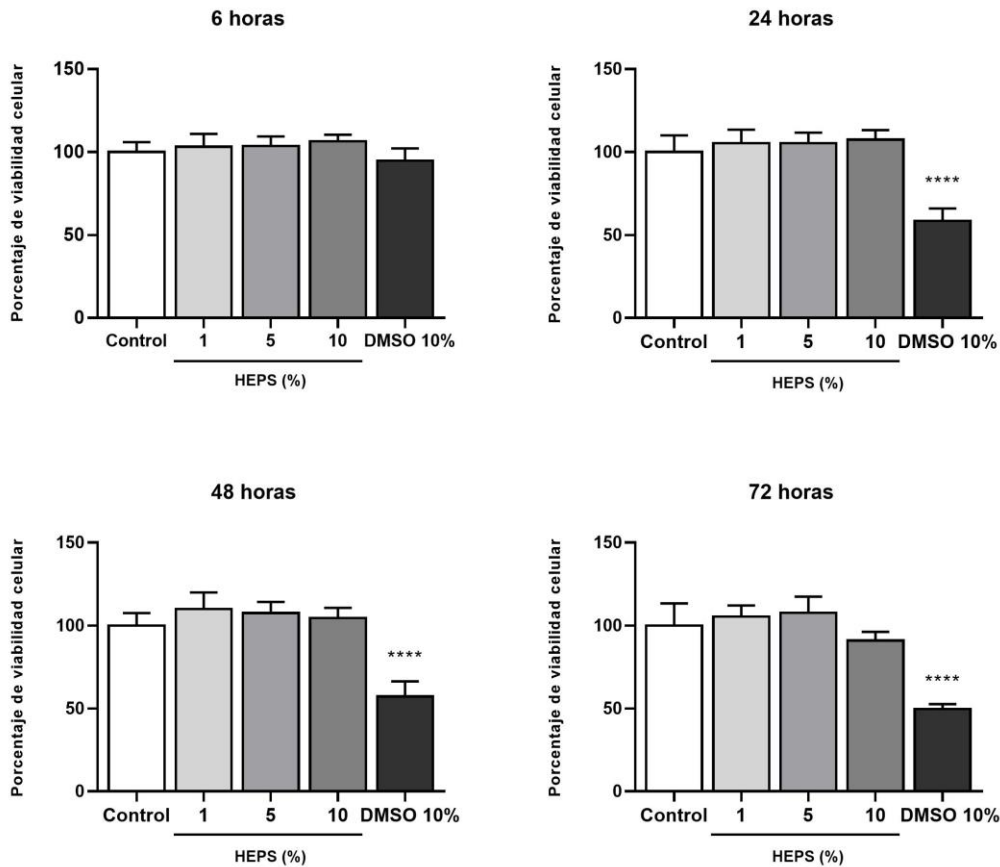


Figura 22. Viabilidad de células PC3 en exposición a Buffer HEPS. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de Buffer HEPS (1, 5, 10%) por 6-72 horas sobre la viabilidad celular por ensayo de MTT. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde RPMI + SFB 0.1%. Como control negativo se utilizó DMSO 10%.

Evaluación de la viabilidad celular en los cocultivos mediante citometría de flujo

Para evaluar la viabilidad celular de las líneas celulares expuestas a plaquetas se realizaron ensayos de citometría de flujo. No se midió la viabilidad celular mediante MTT debido a que, al activarse, las plaquetas quedan adheridas a las células y a los pozos donde se sembraron las células, y no se pueden retirar en su totalidad. Esto representa un problema técnico en la medición debido a que las

plaquetas contienen mitocondrias funcionales que pueden reducir la sal de tetrazolio (sal de MTT) en formazán (compuesto final color violeta) e interferir en las lecturas de viabilidad de las líneas celulares. Por lo tanto, fue necesario buscar otras metodologías como la citometría de flujo.

Se trataron las líneas celulares LNCaP y PC3 con diferentes cantidades de plaquetas resuspendidas en un máximo de 10% de HEPS durante 24, 48 y 72h y se analizó la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Las proporciones célula-plaqueta utilizados para ambas líneas celulares fueron establecidos a partir de la literatura consultada y a partir de las concentraciones fisiológicas de plaquetas de un individuo sano (150 a 450,000 plaquetas por microlitro). Las proporciones célula-plaqueta establecidas fueron 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 y 1:500, para ambas líneas celulares.

Como se observa en la **Figura 23**, a partir de las proporciones célula-plaqueta 1:300 se observó un efecto sobre la viabilidad de la línea celular LNCaP, teniendo un cambio significativo en la proporción 1:400 y 1:500. La línea celular PC3 se mantuvo viable a lo largo de todos los ratios célula-plaqueta (**Figura 24**), sin embargo, los gráficos de citometría de flujo mostraron que existía otra subpoblación celular a partir de la proporción 1:300 hasta la proporción 1:500 a las 24h (**Figura 25A**) que, según la literatura, podría deberse a que las células se encontraban en un proceso de apoptosis temprana. Por lo tanto, para confirmar esta observación se realizaron ensayos de apoptosis en la línea celular PC3 expuestas a plaquetas durante 24h. Como se muestra en la **Figura 25B**, se observa que a proporciones altas de plaquetas (a partir de la proporción célula-plaqueta 1:300) las células PC3 se encontraban en un proceso de apoptosis temprana, sugiriendo que las plaquetas a altas concentraciones también tienen un efecto en la viabilidad celular de células PC3. Estos resultados permitieron determinar la proporción óptima célula-plaqueta de 1:200 para el establecimiento del cocultivo.

Viabilidad de la línea celular LNCaP expuesta a diferentes proporciones de plaquetas

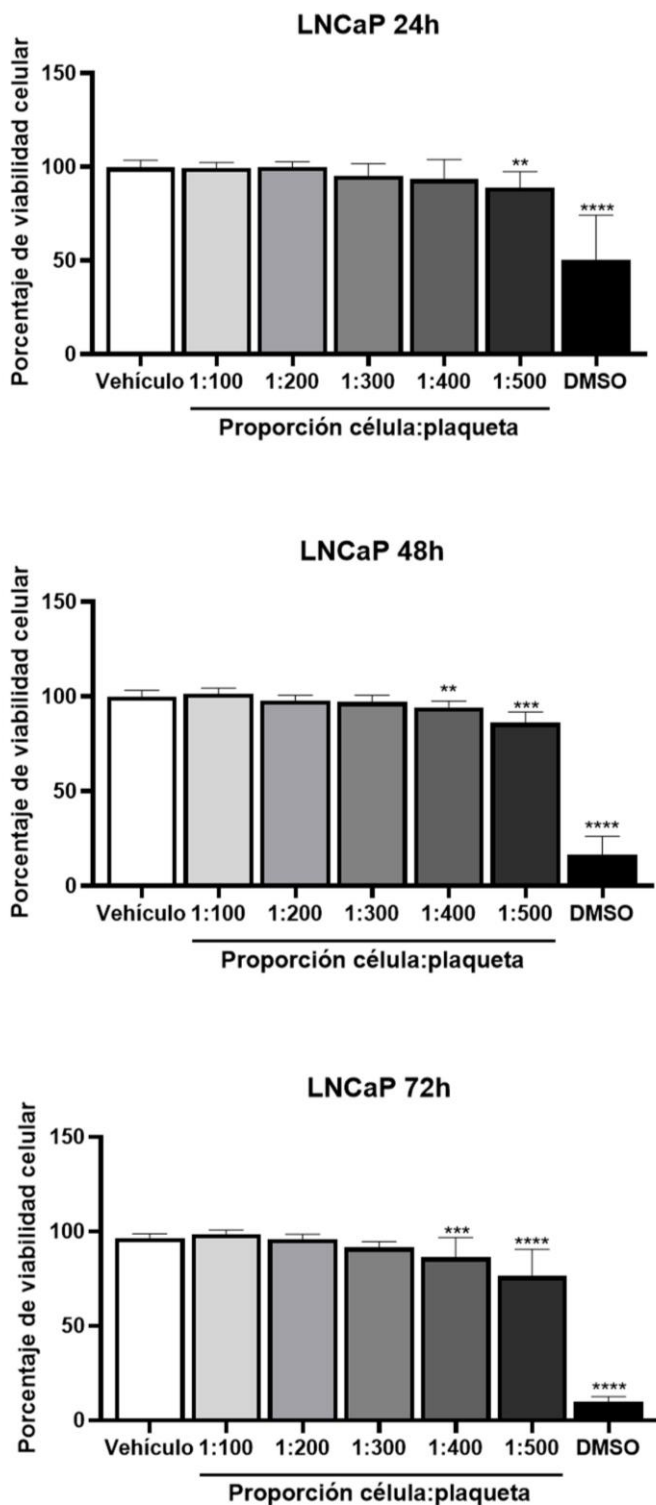


Figura 23. Viabilidad celular de células LNCaP expuestas a plaquetas. Se muestra el efecto sobre la viabilidad celular de células LNCaP expuestas a diferentes proporciones de plaquetas durante 24, 48 y 72h. Se utilizó como vehículo Buffer HEPS al 10% y como control negativo DMSO. Se observa una disminución en la viabilidad celular dependiente del tiempo y de la proporción célula-plaqueta.

Viabilidad de la línea celular PC3 expuesta a diferentes proporciones de plaquetas

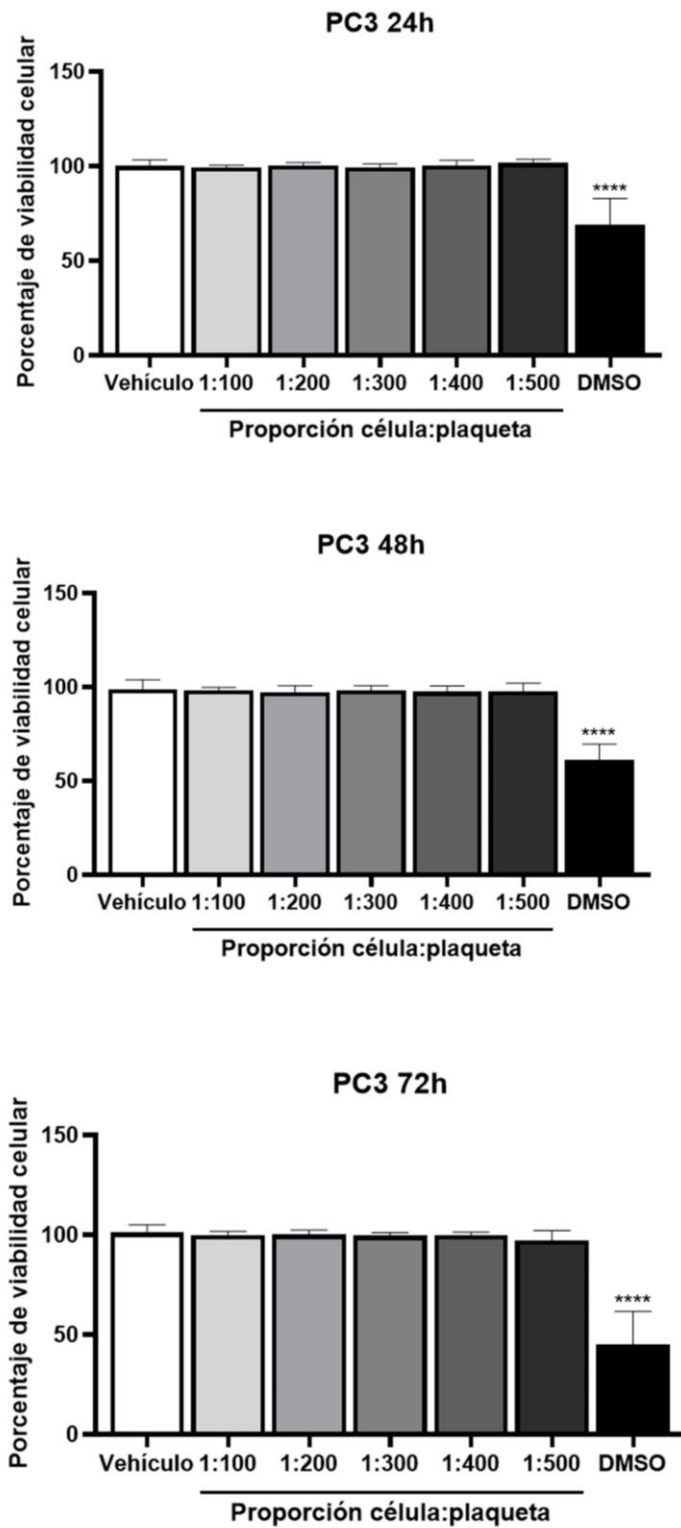
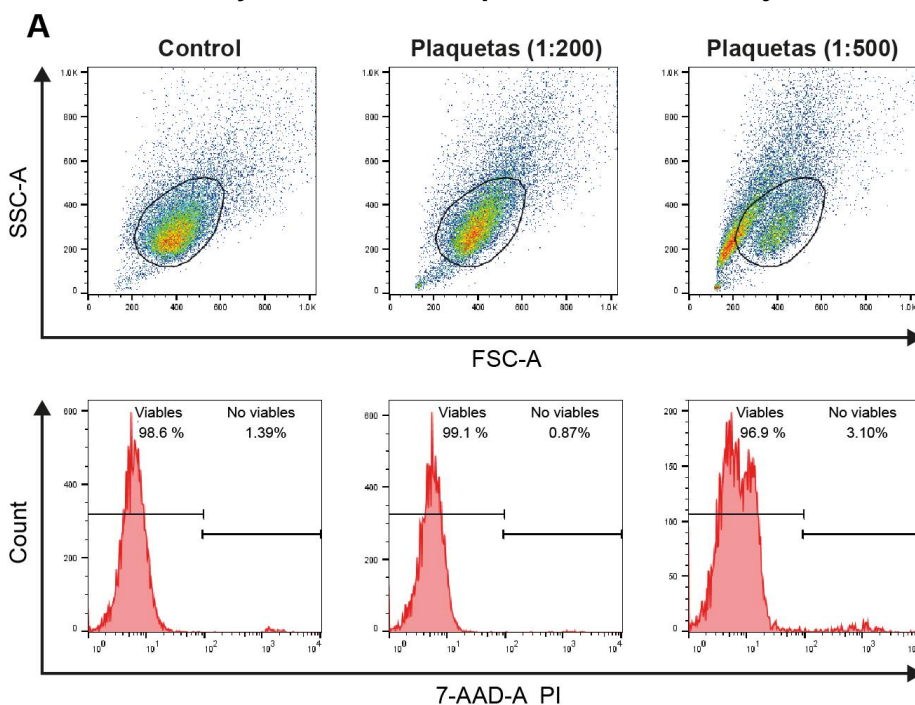


Figura 24. Viabilidad celular de células PC3 expuestas a plaquetas. Se muestra el efecto sobre la viabilidad celular de células PC3 expuestas a diferentes ratios de plaquetas durante 24, 48 y 72h. Se utilizó como vehículo Buffer HEPS al 10% y como control negativo DMSO. No se observa un descenso en la viabilidad celular en ningún tiempo ni en ninguna concentración evaluada.

Ensayos de viabilidad por citometría de flujo



B

Ensayos de apoptosis por citometría de flujo

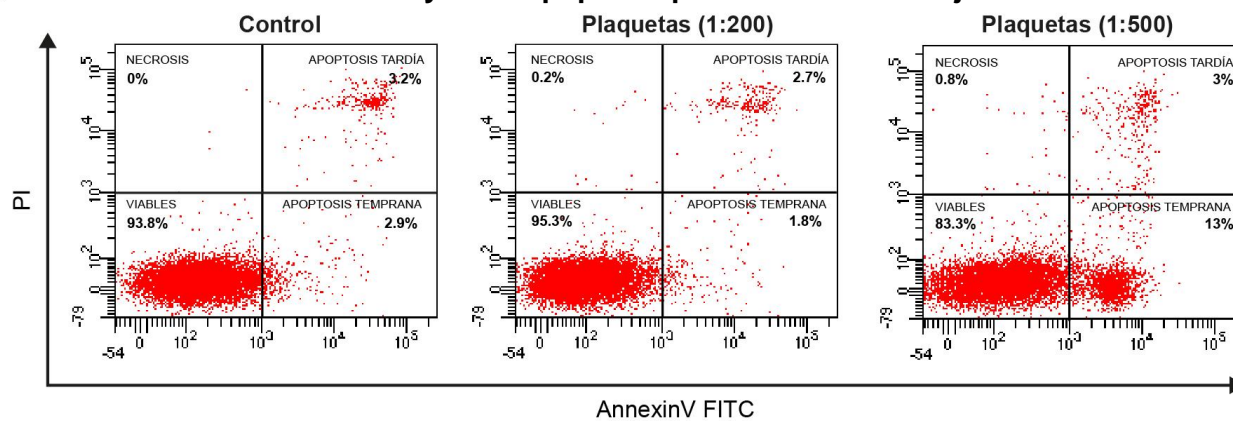


Figura 25. Las plaquetas inducen apoptosis temprana en células PC3. (A) Gráfico de citometría de flujo que muestra la formación de una subpoblación celular (recuadro negro) en la proporción célula-plaqueta de 1:500, lo que aparentemente podría estar indicando apoptosis temprana en las células PC3 expuestas a plaquetas. **(B)** Ensayos de apoptosis en células PC3 que muestra que en la proporción célula-plaqueta 1:500 existe apoptosis temprana en células PC3 expuestas a plaquetas durante 24h.

Inmunofluorescencia del cocultivo de plaquetas con líneas celulares de cáncer de próstata

Una vez establecido el cocultivo celular se realizaron inmunofluorescencias del cocultivo con el fin de poder observar las interacciones entre las plaquetas y las células tumorales en estudio (células LNCaP y PC3). Según la literatura, las plaquetas se unen a las células tumorales a través de receptores de superficie brindándoles protección mecánica contra el flujo sanguíneo y protección contra el sistema inmunológico del hospedero. Esta interacción y unión entre plaquetas y células pudo observarse en el cocultivo establecido a partir de las 24 h en una concentración de 100 plaquetas por cada célula tumoral. La interacción se dio tanto en células LNCaP como en células PC3 (**Figura 26**; **Figura 27**)

En la **Figura 26A** se observa la imagen del cocultivo de células tumorales LNCaP y plaquetas. En esta se observan algunas plaquetas adheridas a la superficie de la membrana citoplasmática de las células tumorales (flechas blancas), como lo reportado en la literatura. En la **Figura 26B** se observan los núcleos de las células LNCaP teñidas con DAPI. En la **Figura 26C** se observan las plaquetas marcadas con el anticuerpo anti-CD41 que coincide con aquella inmunofluorescencia realizada para la caracterización plaquetaria (**Figura 19**). Finalmente, en la **Figura 26D** se observa la colocalización de las tres imágenes tomadas con diferentes longitudes de onda. Como se puede observar, las plaquetas rodean a la célula cancerígena y se unen a ella mediante su membrana citoplasmática (flechas blancas). Estos datos muestran evidencia de que existe una interacción directa y física entre las células cancerígenas y las plaquetas.

Inmunofluorescencias de cocultivos entre células LNCaP y plaquetas

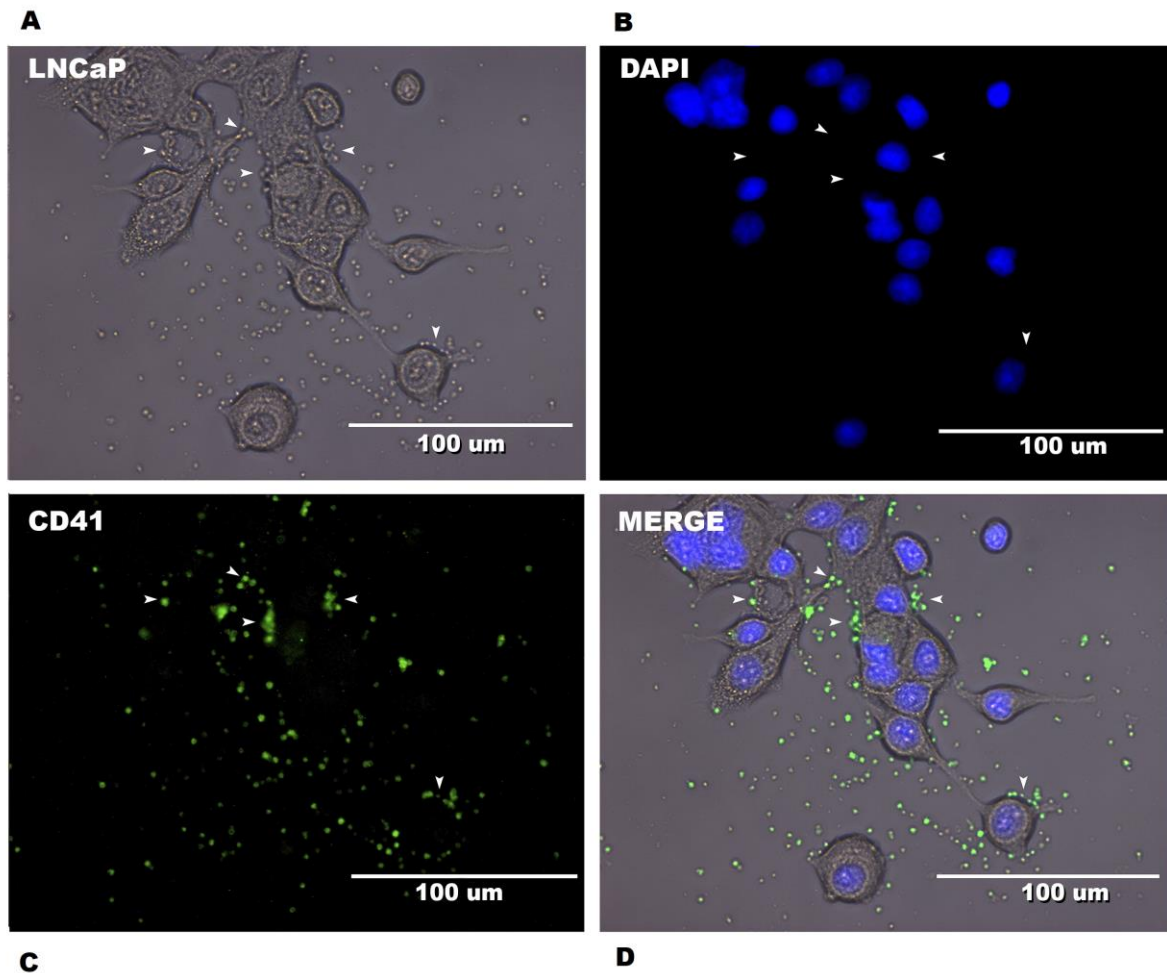


Figura 26. Inmunofluorescencia del cocultivo entre células LNCaP y plaquetas. Se realizó la inmunofluorescencia de un cocultivo con células LNCaP y plaquetas. Las células tumorales fueron marcadas con DAPI mientras que las plaquetas fueron marcadas a través del marcador de superficie membranaral CD41. Las fotos fueron tomadas en una escala de 100 um. Las flechas blancas indican las interacciones físicas de las plaquetas con las células tumorales.

Resultados similares se observaron en el cocultivo establecido para células PC3 (**Figura 27**). En la **Figura 27A** la imagen obtenida mediante luz visible muestra ya cómo las plaquetas se unen a la membrana citoplasmática de las células cancerígenas. Esta afirmación se hace más notoria en la **Figura 27D** donde se muestra la misma interacción con las plaquetas marcadas por su antígeno de superficie CD41 y los núcleos de las células marcados con DAPI. Además, es importante observar que, al menos en las imágenes obtenidas, hay mayor cantidad de plaquetas unidas a células PC3 en comparación a plaquetas unidas a LNCaP. Las líneas tumorales LNCaP y PC3 provienen de estadios diferentes de la enfermedad, siendo LNCaP aquella línea celular que presenta aún receptor de

andrógenos y PC3 aquella que lo ha perdido. El receptor de andrógenos podría estar jugando un papel importante en la activación plaquetaria y en la unión de estas a la membrana citoplasmática de las células en cuestión. Sin embargo, es necesario mayor investigación para poder confirmar que el receptor de andrógenos presenta un papel en la activación plaquetaria.

Immunofluorescencias de cocultivos entre células PC3 y plaquetas

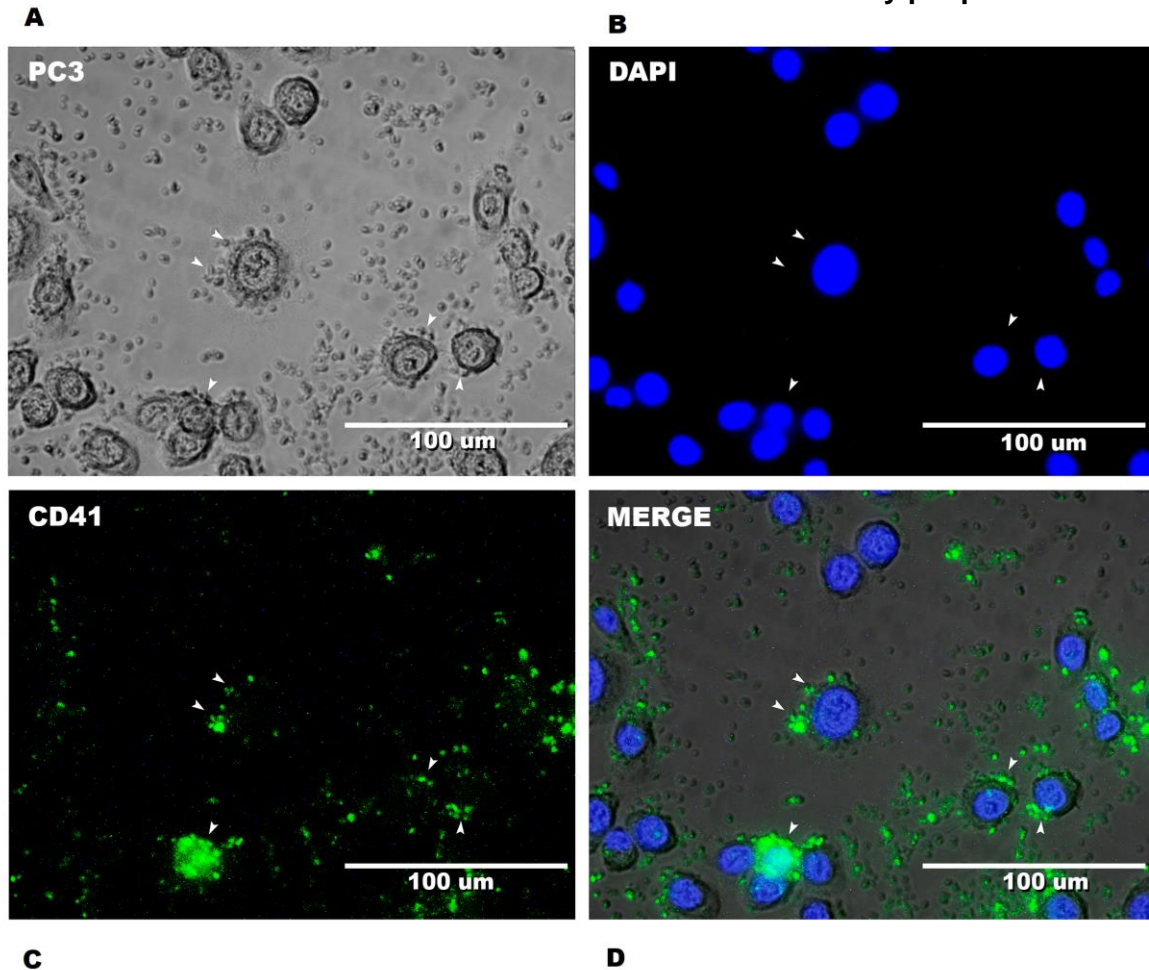


Figura 27. Inmunofluorescencia del cocultivo entre células PC3 y plaquetas. Se realizó la inmunofluorescencia de un cocultivo con células LNCaP y plaquetas. Las células tumorales fueron marcadas con DAPI mientras que las plaquetas fueron marcadas con el marcador de superficie membranar CD41. Las fotos fueron tomadas en una escala de 100 µm. Las flechas blancas indican las interacciones físicas de las plaquetas con las células tumorales.

10.DISCUSIÓN

En este estudio se desarrolló y se estandarizó un modelo de cocultivo celular entre líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP y PC3) y plaquetas. En años recientes las plaquetas han ganado gran interés en el campo del cáncer y de la metástasis. Se ha sugerido que las interacciones entre las plaquetas y las células cancerígenas circulantes pueden promover la metástasis en diferentes tipos de cáncer (Best et al., 2015; Díaz-Blancas et al., 2022; Johnson et al., 2019; Yang et al., 2024). A pesar de la importancia de las plaquetas en el cáncer, el desarrollo de modelos que permitan estudiar las interacciones de las células cancerígenas con plaquetas ha sido poco explorado, siendo este trabajo uno de los primeros en abordar el desarrollo de un modelo para el estudio de las interacciones plaqueta-célula en cáncer de próstata.

Para el desarrollo del modelo de cocultivo se tomaron en cuenta variables como el aislamiento de plaquetas, la caracterización morfológica y fisiológica de las plaquetas y, el efecto sobre la viabilidad de las líneas celulares en exposición al vehículo en donde las plaquetas son resuspendidas (buffer HEPS).

El aislamiento de plaquetas se realizó mediante centrifugación diferencial debido a que es el método mayormente reportado para este fin (Best et al., 2015; Garofano et al., 2023; Jin et al., 2023; Levoux et al., 2021; Rodriguez-Martinez et al., 2022). El uso de esta metodología permite separar los componentes sanguíneos y permite obtener el plasma rico en plaquetas. Si bien los resultados obtenidos muestran una cantidad similar de plaquetas aisladas (**Tabla 2**), nuestros criterios de elección del método de centrifugación se basaron en lo reportado por (Best et al., 2015), en donde la contaminación por otras células sanguíneas en las muestra de plaquetas aisladas es de solo 4 células sanguíneas por cada millón de plaquetas. Además, nuestra elección del método de centrifugación para el aislamiento de plaquetas está en línea con los métodos reportados en otros trabajos donde se estudian las interacciones de las plaquetas con otros tipos celulares (Levoux et al., 2021), incluidas células cancerígenas (Garofano et al., 2023; Rodriguez-Martinez et al., 2022).

La caracterización de las plaquetas se realizó para validar la presencia de plaquetas en las muestras sanguíneas. Algunos trabajos como el de (Rodríguez-Martínez et al., 2022) reportan el aislamiento y posterior marcaje de plaquetas con Vybrant™ DiO Cell-Labeling Solution, un colorante capaz de unirse a los lípidos de membrana de cualquier célula permitiendo visualizar a las plaquetas mediante microscopia de fluorescencia o microscopia confocal. Otros trabajos como el de (Toragall et al., 2023) utilizan CellTracker™ Green para el marcaje de la membrana lipídica de las plaquetas, permitiendo visualizarlas por técnicas de microscopia. Sin embargo, el marcaje con estas moléculas de unión a lípidos no valida la presencia de plaquetas ya que puede unirse a los lípidos de cualquier célula, por lo cual, similar a Lee et al. 2023, en nuestro estudio se utilizó un anticuerpo dirigido contra la integrina CD41, la cual es una proteína de superficie que se expresa exclusivamente en la membrana de plaquetas y de megacariocitos (Yun et al., 2016). Este anticuerpo nos permitió visualizar plaquetas mediante microscopia de fluorescencia, concordando con lo visualizado en otros trabajos descritos arriba. Los resultados de estas fluorescencias a través del anticuerpo dirigido contra CD41 respaldan el protocolo seleccionado de aislamiento de plaquetas.

Por otro lado, fue necesario validar que las plaquetas aisladas eran funcionalmente activas. En el presente trabajo se utilizó CaCl_2 para promover la activación y agregación plaquetaria. Similar a (Toyoda et al., 2018)., en este trabajo se utilizaron un rango de concentraciones de CaCl_2 para promover la activación plaquetaria. Durante la activación plaquetaria, el CaCl_2 es liberado al citoplasma plaquetario y actúa como segundo mensajero promoviendo la segregación de gránulos que son necesarios para llevar a cabo una hemostasia primaria (Cheung, H. Y. F. et al., 2023). Este proceso sucede en aquellas plaquetas que son fisiológicamente funcionales. Nuestros resultados demuestran que las plaquetas aisladas son capaces de agregarse a diferentes concentraciones de CaCl_2 , por lo tanto, son plaquetas funcionales.

En el desarrollo de un modelo es necesario tomar en cuenta las variables que podrían alterar el modelo. Como se mencionó anteriormente, entre esas variables se encuentra el vehículo utilizado para resuspender a las plaquetas (buffer HEPS).

A diferencia de nuestro modelo, los modelos de cocultivo reportados en algunos trabajos no describen las variables que pudieran interferir en su modelo de cocultivo. En nuestro modelo, se caracterizó el efecto que tiene el buffer HEPS sobre la viabilidad de las células cancerígenas ya que, finalmente el vehículo también está en contacto con las células cancerígenas. Los ensayos de viabilidad por MTT mostraron que el buffer HEPS no tiene un efecto sobre la viabilidad a lo largo del rango de concentraciones propuesto, independientemente de la línea celular. Por lo tanto, seleccionamos una concentración intermedia de buffer HEPS de los rangos utilizados.

Uno de los principales objetivos del desarrollo del modelo de cocultivo fue determinar si las plaquetas tenían un efecto sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de próstata. En algunos trabajos donde se presentan modelos de cocultivo entre plaquetas y líneas celulares (incluidas células cancerígenas) no reportan cuáles son las proporciones célula-plaqueta utilizados para su estudio ni tampoco si estos ratios tienen algún efecto sobre la viabilidad celular (Garofano et al., 2023; Rodriguez-Martinez et al., 2022; W. Zhang et al., 2023). En este estudio, se determinó el ratio óptimo de plaquetas para establecer el modelo de cocultivo entre plaquetas y células de cáncer de próstata y, además, se determinó el efecto sobre la viabilidad de las células cancerígenas. Se utilizaron diferentes proporciones de plaquetas por cada célula cancerígena variando entre 100, 200, 300, 400 y 500 plaquetas. Estas proporciones fueron determinadas a partir de la concentración fisiológica normal de plaquetas de una persona sana que oscila entre las 150,000 y las 450,000 plaquetas por microlitro de sangre (Yun et al., 2016). Las proporciones utilizadas de plaquetas van en línea con las proporciones reportadas en algunos estudios donde sí reportan las proporciones célula-plaqueta, como el de (W. Zhang et al., 2023) en osteosarcoma y el de (Garofano et al., 2023) en cáncer de próstata.

Nuestros resultados de ensayos de viabilidad por citometría de flujo mostraron que las proporciones de plaquetas superiores a 300 tienen un efecto negativo sobre la viabilidad celular en LNCaP y no así para PC3. En un principio se creyó que quizás estas diferencias en la viabilidad celular estaban relacionadas con las características de las líneas celulares utilizadas. Por un lado, la líneas celular

LNCaP representa estadios tempranos de la enfermedad y es sensible a los andrógenos (Abate-Shen & de Almeida, 2022), por otro lado, PC3 representan estadios avanzados de la enfermedad y es independiente de los andrógenos (Kaighn, M. E. et al., 1979). Estos datos pueden relacionarse con un estudio en donde se describe que la línea celular PC3 es capaz de promover la agregación plaquetaria (TCIPA) mientras que LNCaP no, a menos que el receptor de andrógenos sea bloqueado con bicalutamida. Ese trabajo sugiere que el fenómeno de TCIPA observado en PC3 podría deberse a la presencia o ausencia del receptor de andrógenos (Rudzinski et al., 2020), sin embargo, aunque en nuestro trabajo se haya observado que posiblemente la diferencia en la viabilidad de las dos líneas celulares utilizadas expuestas a plaquetas se deba a las características de las líneas, es necesaria más investigación para poder afirmar esta hipótesis. En un futuro, este modelo de cocultivo podría ayudar a elucidar las diferencias observadas hasta ahora entre estas dos líneas celulares las cuales representan estadios diferentes de la enfermedad.

Debido a lo observado en la línea celular LNCaP, se decidió en un principio establecer una relación de célula:plaqueta de 1:200, sin embargo, los gráficos de citometría de flujo de la línea celular PC3 expuestas a los radios más altos de plaquetas mostraban la presencia de otra subpoblación celular. Se sabe que la metodología utilizada para medir viabilidad celular por citometría de flujo con yoduro de propidio es capaz de medir sólo apoptosis tardía y la presencia de otra subpoblación celular apuntó a que quizás la metodología utilizada no estaba siendo la adecuada así que, realizamos ensayos de apoptosis con anexina y yoduro de propidio para poder diferenciar entre apoptosis temprana y apoptosis tardía. Los datos de apoptosis mostraron que a partir de la proporción de célula-plaqueta de 1:300, la línea celular PC3 experimentaba un proceso de apoptosis temprana. Estos hallazgos terminaron por confirmar que la proporción de célula-plaqueta 1:200 era el adecuado para establecer el modelo de cocultivo, en donde la viabilidad celular en función a la exposición de plaquetas no se ve comprometida. La proporción célula-plaqueta establecida de 1:200 concuerda en la proporción célula-plaqueta de algunos otros estudios (Rodriguez-Martinez et al., 2022; W. Zhang et al., 2023).

Se ha sugerido que las plaquetas pueden interactuar físicamente con las células cancerígenas, además, se ha sugerido que estas interacciones físicas entre las células cancerígenas y las plaquetas pueden promover la metástasis en algunos tipos de cáncer (Anvari et al., 2021; In 'T Veld & Wurdinger, 2019; Oncul & Cho, 2023). Como se esperaba, se observó una mayor interacción entre la línea celular PC3 y plaquetas, que podría deberse nuevamente a las características intrínsecas de la célula. Estos resultados son similares a los presentados por (Rodriguez-Martinez et al., 2022), en donde se observa la formación de agregados plaquetarios alrededor de las líneas celulares de cáncer de próstata que son diferentes a las utilizadas en este estudio. Los agregados plaquetarios alrededor de las células cancerígenas se han observado también en cáncer de mama (Johnson et al., 2019), cáncer de páncreas (Díaz-Blancas et al., 2022) y osteosarcoma (W. Zhang et al., 2023). Debido a que el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un modelo de cocultivo celular entre plaquetas y líneas celulares de cáncer de próstata, no se buscó determinar qué receptores están involucrados en la interacción física célula-plaqueta como sí lo hace el trabajo de (Toragall et al., 2023) en líneas celulares de cáncer de mama, en donde se sugiere que el receptor de tromboxano podría ser el que se une a las células cancerígenas.

Con el desarrollo de este trabajo se busca poder estudiar a futuro estas interacciones físicas entre plaquetas y células de cáncer de próstata, estudiar cuáles son los receptores involucrados en la interacción y si algún tratamiento farmacológico, como el uso de antiagregantes plaquetarios, podría mitigar estas interacciones, similar al trabajo de Johnson et al. en donde demuestran que la aspirina es capaz de inhibir las interacciones entre líneas celulares de cáncer de ovario y plaquetas e inhibir el proceso prometastásico inducido por las plaquetas (Johnson et al., 2019). Recientemente se ha acuñado un término denominado “plaquetas educadas por tumor” que son aquellas plaquetas que han estado en contacto con células cancerígenas y han modificado su transcriptoma o proteoma; este modelo de cocultivo celular desarrollado podría ayudar a estudiar los proceso de educación de plaquetas con el fin de entender cómo están siendo afectadas las plaquetas por las células cancerígenas e incluso, determinar si las plaquetas educadas por tumor podrían ser utilizadas como herramientas de diagnóstico.

Finalmente, hay que reconocer las limitaciones de este modelo. Al ser este un modelo *in vitro*, no se contemplan muchas variables que pudiesen ocurrir en el organismo por lo cual, el modelo no representa en su totalidad lo que sucede fisiológicamente. Por tal motivo, es necesario realizar más investigaciones con el fin de desarrollar nuevas metodologías que puedan ayudar a estudiar de una mejor manera las interacciones célula-plaqueta.

11.CONCLUSIONES

Se estableció un modelo de cocultivo celular entre líneas celulares de cáncer de próstata y plaquetas en una proporción 1:200 (una célula tumoral por cada 200 plaquetas).

La exposición a altas concentraciones de plaquetas tiene efectos sobre la viabilidad de líneas celulares de cáncer de próstata, sin embargo, no se conocen los mecanismos que pueden llevar a este resultado.

Aparentemente, las plaquetas interactúan físicamente con las líneas celulares de cáncer de próstata estudiadas.

Se necesita más investigación para el desarrollo de modelos que estudien las interacciones de las plaquetas con células cancerígenas.

12. PERSPECTIVAS

Con este modelo se estudiarán las interacciones entre las líneas celulares de cáncer de próstata y plaquetas con el fin de elucidar mecanismos de interacción célula-plaqueta en cáncer de próstata. Analizar las interacciones físicas entre líneas celulares de cáncer de próstata y plaquetas en presencia de antiagregantes plaquetarios con el fin de observar si los antiagregantes pudieran disminuir la interacción célula-plaqueta en cáncer de próstata.

13. REFERENCIAS

- Aaron, L. T., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.012>
- Abate-Shen, C., & de Almeida, F. N. (2022). Establishment of the LNCaP Cell Line – The Dawn of an Era for Prostate Cancer Research. *Cancer Research*, 82(9), 1689–1691. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-1065>
- Ahmed, H. U., El-Shater Bosaily, A., Brown, L. C., Gabe, R., Kaplan, R., Parmar, M. K., Collaco-Moraes, Y., Ward, K., Hindley, R. G., Freeman, A., Kirkham, A. P., Oldroyd, R., Parker, C., & Emberton, M. (2017). Diagnostic accuracy of multi-parametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study. *The Lancet*, 389(10071), 815–822. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32401-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32401-1)
- Anvari, S., Osei, E., & Maftoon, N. (2021). Interactions of platelets with circulating tumor cells contribute to cancer metastasis. *Scientific Reports*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94735-y>
- Babinski, M. A., Chagas, M. A., Costa, W. S. &, & Pereira, M. J. (2002). Morphology and areal fraction of the glandular lumen of transition zone in the human prostate. *Revista Chilena de Anatomía*, 20. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-98682002000300004>
- Benedetti-Padrón, I. & Reyes, N. (2013). Atrofia Inflamatoria Proliferativa: Potencial Lesión Precursora De Adenocarcinoma Prostático. *Revista Ciencias Biomédicas*, 5.
- Best, M. G., Sol, N., Kooi, I., Tannous, J., Westerman, B. A., Rustenburg, F., Schellen, P., Verschueren, H., Post, E., Koster, J., Ylstra, B., Ameziane, N., Dorsman, J., Smit, E. F., Verheul, H. M., Noske, D. P., Reijneveld, J. C., Nilsson, R. J. A., Tannous, B. A., ... Wurdinger, T. (2015). RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*, 28(5), 666–676. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.018>
- Chen, N., & Zhou, Q. (2016). The evolving gleason grading system. *Chinese Journal of Cancer Research*, 28(1), 58–64. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.04>
- Chiarugi, P., Paoli, P., & Cirri, P. (2014). Tumor microenvironment and metabolism in prostate cancer. *Seminars in Oncology*, 41(2), 267–280. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.03.004>
- Cluxton, C. D., Spillane, C., O’Toole, S. A., Sheils, O., Gardiner, C. M., & O’Leary, J. J. (2019). Suppression of Natural Killer cell NKG2D and CD226 anti-tumour cascades by platelet cloaked cancer cells: Implications for the metastatic cascade. *PLoS ONE*, 14(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211538>
- Czyz, J., Szpak, K., & Madeja, Z. (2012). The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nature Reviews Urology*, 9(5), 274–282. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.14>
- De Marzo, A. M., Marchi, V. L., Epstein, J. I., & Nelson, W. G. (1999). Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: Implications for prostatic carcinogenesis. *American Journal of Pathology*, 155(6), 1985–1992. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65517-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65517-4)
- De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., & Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 256–269. <https://doi.org/10.1038/nrc2090>
- Dehm, S. M., & Tindall, D. J. (2019). Advances in Experimental Medicine and Biology. In

- Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1210).
https://doi.org/10.1007/978-3-030-32656-2_9
- Devlin, C. M., Simms, M. S., & Maitland, N. J. (2021). Benign prostatic hyperplasia – what do we know? *BJU International*, *127*(4), 389–399. <https://doi.org/10.1111/bju.15229>
- Díaz-Blancas, J. Y., Dominguez-Rosado, I., Chan-Núñez, C., Melendez-Zajgla, J., & Maldonado, V. (2022). Pancreatic Cancer Cells Induce MicroRNA Deregulation in Platelets. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19).
<https://doi.org/10.3390/ijms231911438>
- Fillmore, K. M., Chikritzhs, T., Stockwell, T., Bostrom, A., & Pascal, R. (2009). Alcohol use and prostate cancer: A meta-analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, *53*(2), 240–255. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800122>
- Garofano, K., Rashid, K., Smith, M., Brantner, C., Suwunnakorn, S., Diemert, D., Gordon, O., Horvath, A., Khan, S., Popratiloff, A., Rhim, J., Sidahmed, A., Maggirwar, S. B., O'Brien, T. J., Perera, M. A., & Lee, N. H. (2023). Prostate cancer cell-platelet bidirectional signaling promotes calcium mobilization, invasion and apoptotic resistance via distinct receptor-ligand pairs. *Scientific Reports*, *13*(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-29450-x>
- Garraud, O., & Cognasse, F. (2015). Are platelets cells? And if yes, are they immune cells? *Frontiers in Immunology*, *6*(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00070>
- Gay, L. J., & Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nature Reviews Cancer*, *11*(2), 123–134. <https://doi.org/10.1038/nrc3004>
- González-Villalva, A., Bizarro-N, & Evaras, P. (2019). *El megacariocito : una célula muy original*.
- Grasso, D., Zampieri, L. X., Capelôa, T., Van De Velde, J. A., & Sonveaux, P. (2020). Mitochondria in cancer. *Cell Stress*, *4*(6), 114–146.
<https://doi.org/10.15698/cst2020.06.221>
- Grozescu T, Popa F, C. D. (2017). Prostate cancer between prognosis and adequate / proper therapy Epidemiologic data Data collected by Cancer Research , UK [2]. *Journal of Medicine and Life*, *10*(1), 5–12.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hayward, S. W., & Cunha, G. R. (2000). The prostate: Development and physiology. *Radiologic Clinics of North America*, *38*(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0033-8389\(05\)70146-9](https://doi.org/10.1016/S0033-8389(05)70146-9)
- Helpap, B., & Egevad, L. (2009). Modified gleason grading. An updated review. *Histology and Histopathology*, *24*(5), 661–666.
- Hermabessière, J., & Taillandier, J. (2002a). Fisiología de la próstata. *EMC - Urología*, *34*(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s1761-3310\(02\)72340-2](https://doi.org/10.1016/s1761-3310(02)72340-2)
- Hermabessière, J., & Taillandier, J. (2002b). Fisiología de la próstata. *EMC - Urología*, *34*(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s1761-3310\(02\)72340-2](https://doi.org/10.1016/s1761-3310(02)72340-2)
- Hermabessière, J., & Taillandier, J. (2002c). Fisiología de la próstata. *EMC - Urología*, *34*(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s1761-3310\(02\)72340-2](https://doi.org/10.1016/s1761-3310(02)72340-2)
- Holinstat, M. (2017). Normal platelet function. *Cancer and Metastasis Reviews*, *36*(2), 195–198. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9677-x>
- Humphrey, P. A. (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology*, *17*(3), 292–306.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.3800054>

- Humphrey, P. A. (2017). Histopathology of prostate cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(10), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030411>
- Huncharek, M., Sue Haddock, K., Reid, R., & Kupelnick, B. (2010). Smoking as a risk factor for prostate cancer: A meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American Journal of Public Health*, 100(4), 693–701. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2008.150508>
- Hussein, S., Satturwar, S., & Van Der Kwast, T. (2015). Young-age prostate cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 68(7), 511–515. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202993>
- In 'T Veld, S. G. J. G., & Wurdinger, T. (2019). Tumor-educated platelets. *Blood*, 133(22), 2359–2364. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-12-852830>
- James, N. (2014). Primer on prostate cancer. *Primer on Prostate Cancer*, 1–50. <https://doi.org/10.1007/978-1-907673-82-5>
- Jin, P., Pan, Q., Lin, Y., Dong, Y., Zhu, J., Liu, T., Zhu, W., & Cheng, B. (2023). Platelets Facilitate Wound Healing by Mitochondrial Transfer and Reducing Oxidative Stress in Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/2345279>
- Johnson, K. E., Ceglowski, J. R., Roweth, H. G., Forward, J. A., Tippy, M. D., El-Husayni, S., Kulenthirarajan, R., Malloy, M. W., Machlus, K. R., Chen, W. Y., Italiano, J. E., & Battinelli, E. M. (2019). Aspirin inhibits platelets from reprogramming breast tumor cells and promoting metastasis. *Blood Advances*, 3(2), 198–211. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018026161>
- Jung, Y., Kim, J. K., Shiozawa, Y., Wang, J., Mishra, A., Joseph, J., Berry, J. E., McGee, S., Lee, E., Sun, H., Wang, J., Jin, T., Zhang, H., Dai, J., Krebsbach, P. H., Keller, E. T., Pienta, K. J., & Taichman, R. S. (2013). Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nature Communications*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms2766>
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., & Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*, 17(1), 16–23
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
- Kerr, B. A., McCabe, N. P., Feng, W., & Byzova, T. V. (2014). Platelets govern pre-metastatic tumor communication to bone. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.447.Platelets>
- Klement, G. L., Yip, T. T., Cassiola, F., Kikuchi, L., Cervi, D., Podust, V., Italiano, J. E., Wheatley, E., Abou-Slaybi, A., Bender, E., Almog, N., Kieran, M. W., & Folkman, J. (2009). Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood*, 113(12), 2835–2842. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-159541>
- Kopp, H. G., Placke, T., & Salih, H. R. (2009). Platelet-derived transforming growth factor- β down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Research*, 69(19), 7775–7783. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2123>
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gaborilovich, D. I. (2016). The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology*, 37(3), 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
- Labelle, M., Begum, S., & Hynes, R. O. (2014). Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.1411082111>

- Langan, R. C. (2019). Benign Prostatic Hyperplasia. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 46(2), 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2019.02.003>
- Lefrançois, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D. M., Thornton, E. E., Headley, M. B., David, T., Coughlin, S. R., Krummel, M. F., Leavitt, A. D., Passegué, E., & Looney, M. R. (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*, 544(7648), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature21706>
- Levoux, J., Prola, A., Lafuste, P., Gervais, M., Chevallier, N., Koumaiha, Z., Kefi, K., Braud, L., Schmitt, A., Yacia, A., Schirmann, A., Hersant, B., Sid-Ahmed, M., Ben Larbi, S., Komrskova, K., Rohlena, J., Relaix, F., Neuzil, J., & Rodriguez, A. M. (2021). Platelets Facilitate the Wound-Healing Capability of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer and Metabolic Reprogramming. *Cell Metabolism*, 33(2), 283–299.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.12.006>
- Liang, H., Yan, X., Pan, Y., Wang, Y., Wang, N., Li, L., Liu, Y., Chen, X., Zhang, C. Y., Gu, H., & Zen, K. (2015). MicroRNA-223 delivered by platelet-derived microvesicles promotes lung cancer cell invasion via targeting tumor suppressor EPB41L3. *Molecular Cancer*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0327-z>
- Litwin, M. S., & Tan, H. J. (2017). The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 317(24), 2532–2542. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>
- Mantini, G., Meijer, L. L., Glogovitis, I., In ‘T Veld, S. G. J. G., Paleckyte, R., Capula, M., Le Large, T. Y. S., Morelli, L., Pham, T. V., Piersma, S. R., Frampton, A. E., Jimenez, C. R., Kazemier, G., Koppers-Lalic, D., Wurdinger, T., & Giovannetti, E. (2021). Omics analysis of educated platelets in cancer and benign disease of the pancreas. *Cancers*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers13010066>
- Maurer, S., & Ferrari de Andrade, L. (2020). NK Cell Interaction With Platelets and Myeloid Cells in the Tumor Milieu. *Frontiers in Immunology*, 11(December), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608849>
- McNeal, J. E. (1993). The zonal anatomy of the prostate. *Magyar Urologia*, 5(4), 317–325.
- Melchinger, H., Jain, K., Tyagi, T., & Hwa, J. (2019a). Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00153>
- Melchinger, H., Jain, K., Tyagi, T., & Hwa, J. (2019b). Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00153>
- Merriel, S. W. D., Funston, G., & Hamilton, W. (2018). Prostate Cancer in Primary Care. *Advances in Therapy*, 35(9), 1285–1294. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0766-1>
- Motrich, R. D., Salazar, F. C., Breser, M. L., Mackern-Oberti, J. P., Godoy, G. J., Olivera, C., Paira, D. A., & Rivero, V. E. (2018). Implications of prostate inflammation on male fertility. *Andrologia*, 50(11), 1–7. <https://doi.org/10.1111/and.13093>
- Naji, L., Randhawa, H., Sohani, Z., Dennis, B., Lautenbach, D., Kavanagh, O., Bawor, M., Banfield, L., & Profetto, J. (2018). Digital rectal examination for prostate cancer screening in primary care: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Family Medicine*, 16(2), 149–154. <https://doi.org/10.1370/afm.2205>
- Nguyen-Nielsen, M., & Borre, M. (2016). Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. *Seminars in Nuclear Medicine*, 46(6), 484–490. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.07.002>
- Oncul, S., & Cho, M. S. (2023). Interactions between Platelets and Tumor Microenvironment Components in Ovarian Cancer and Their Implications for

- Treatment and Clinical Outcomes. *Cancers*, 15(4).
<https://doi.org/10.3390/cancers15041282>
- Perdana, N. R., Mochtar, C. A., Umbas, R., & Hamid, A. R. A. (2016). the Risk Factor of Prostate Cancer and Its Prevention. *Acta Medica Indonesiana*, 48(3), 228–238.
- Placke, T., Örgel, M., Schaller, M., Jung, G., Rammensee, H. G., Kopp, H. G., & Salih, H. R. (2012). Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Research*, 72(2), 440–448. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1872>
- Puerta-Suárez, J., & Cardona-Maya, W. D. (2020). *La próstata desde una perspectiva inmunológica Introducción*. 13–35.
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 32(1), 2–4. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2007.11.003>
- Reese, J. H., McNeal, J. E., Redwine, E. A., Sellers, R. G., & Goldenberg, S. L. (1992). Distribution of lactoferrin in the normal and inflamed human prostate: An immunohistochemical study. *The Prostate*, 20(1), 73–85.
<https://doi.org/10.1002/pros.2990200109>
- Rodriguez-Martinez, A., Simon-Saez, I., Perales, S., Garrido-Navas, C., Russo, A., de Miguel-Perez, D., Puche-Sanz, I., Alaminos, C., Ceron, J., Lorente, J. A., Molina, M. P., Gonzalez, C., Cristofanilli, M., Ortigosa-Palomo, A., Real, P. J., Rolfo, C., & Serrano, M. J. (2022). Exchange of cellular components between platelets and tumor cells: impact on tumor cells behavior. *Theranostics*, 12(5), 2150–2161.
<https://doi.org/10.7150/thno.64252>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02541.x>
- Rota, M., Scotti, L., Turati, F., Tramacere, I., Islami, F., Bellocco, R., Negri, E., Corrao, G., Boffetta, P., La Vecchia, C., & Bagnardi, V. (2012). Alcohol consumption and prostate cancer risk: A meta-analysis of the dose-risk relation. *European Journal of Cancer Prevention*, 21(4), 350–359. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e32834dbc11>
- 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*, 18(11), 2976–2986.
<https://doi.org/10.1111/jth.15020>
- Savón Moiran, L. (2019). Cáncer de próstata: actualización. *Revista Información Científica*, 98(1), 117–126. <http://scielo.sld.cu/pdf/ric/v98n1/1028-9933-ric-98-01-117.pdf>
- Schatten, H. (2018). Brief overview of prostate cancer statistics, grading, diagnosis and treatment strategies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1095, 1–14.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-95693-0_1
- Schlesinger, M. (2018). Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Journal of Hematology and Oncology*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0669-2>
- Selman, S. H. (2011). The McNeal prostate: A review. *Urology*, 78(6), 1224–1228.
<https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.07.1395>
- Shah, R. B., & Zhou, M. (2016). Recent advances in prostate cancer pathology: Gleason grading and beyond. *Pathology International*, 66(5), 260–272.
<https://doi.org/10.1111/pin.12398>
- Shi, Y., Du, L., Lin, L., & Wang, Y. (2016). Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: Emerging therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(1), 35–52.

- <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.193>
- Thaler, J., & Vanderpuye, A. (1990). *Molecules in Human were*. 717, 712–717.
- Toivanen, R., & Shen, M. M. (2017). Prostate organogenesis: Tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development (Cambridge)*, *144*(8), 1382–1398. <https://doi.org/10.1242/dev.148270>
- Toragall, V., Hale, E. J., Hulugalla, K. R., & Werfel, T. A. (2023). Microscopy and Plate Reader–based Methods for Monitoring the Interaction of Platelets and Tumor Cells in vitro. *Bio-Protocol*, *13*(20), 1–13. <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.4856>
- 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 CaCl₂ leads coagulation of platelet-rich plasma. *International Journal of Implant Dentistry*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/s40729-018-0134-6>
- Trabzonlu, L., Kulac, I., Zheng, Q., Hicks, J. L., Haffner, M. C., Nelson, W. G., Sfanos, K. S., Ertunc, O., Lotan, T. L., Heaphy, C. M., Meeker, A. K., Yegnasubramanian, S., & De Marzo, A. M. (2019). Molecular pathology of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: Challenges and opportunities. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *9*(4), 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030403>
- Uhr, A., Glick, L., & Gomella, L. G. (2020). An overview of biomarkers in the diagnosis and management of prostate cancer. *The Canadian Journal of Urology*, *27*(S3), 24–27.
- van der Meijden, P. E. J., & Heemskerk, J. W. M. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, *16*(3), 166–179. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>
- Varkey, J., & Nicolaidis, T. (2021). Tumor-Educated Platelets: A Review of Current and Potential Applications in Solid Tumors. *Cureus*, *13*(11), 1–8. <https://doi.org/10.7759/cureus.19189>
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, *13*(7), 379–386. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>
- Victor, P. V. P., & Rose, J. (1882). *Lectures on clinical medicine at the Hotel-Dieu, Paris / by A. Trousseau ; translated and edited with notes and appendices by P. Victor Bazire. Contributors*. 44(0).
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & Depinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes and Development*, *32*(17–18), 1105–1140. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>
- Yang, J., Shu, G., Chen, T., Dong, A., Dong, C., Li, W., Sun, X., Zhou, Y., Li, D., & Zhou, J. (2024). ESM1 Interacts with c-Met to Promote Gastric Cancer Peritoneal Metastasis by Inducing Angiogenesis. *Cancers*, *16*(1). <https://doi.org/10.3390/cancers16010194>
- Yu, L., Guo, Y., Chang, Z., Zhang, D., Zhang, S., Pei, H., Pang, J., Zhao, Z. J., & Chen, Y. (2021). Bidirectional Interaction Between Cancer Cells and Platelets Provides Potential Strategies for Cancer Therapies. *Frontiers in Oncology*, *11*(October), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.764119>
- Yun, S. H., Sim, E. H., Goh, R. Y., Park, J. I., & Han, J. Y. (2016). Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *BioMed Research International*, *2016*, 10–15. <https://doi.org/10.1155/2016/9060143>
- Zaslavsky, A., Baek, K. H., Lynch, R. C., Short, S., Grillo, J., Folkman, J., Italiano, J. E., & Ryeom, S. (2010). Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood*, *115*(22), 4605–4613. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-242065>
- Zhang, W., Zhou, H., Li, H., Mou, H., Yinwang, E., Xue, Y., Wang, S., Zhang, Y., Wang,

Z., Chen, T., Sun, H., Wang, F., Zhang, J., Chai, X., Chen, S., Li, B., Zhang, C., Gao, J., & Ye, Z. (2023). Cancer cells reprogram to metastatic state through the acquisition of platelet mitochondria. *Cell Reports*, *42*(9), 113147.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113147>

Zhang, Y., Zhou, C. K., Rencsok, E. M., Fall, K., Lotan, T. L., Loda, M., Giunchi, F., Platz, E. A., De Marzo, A. M., Mucci, L. A., Fiorentino, M., & Ebot, E. M. (2019). A prospective study of intraprostatic inflammation, focal atrophy, and progression to lethal prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *28*(12), 2047–2054. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0713>