



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

“Estudio en la duda. Acción en la fe”

División Académica Multidisciplinaria de Comalcalco



PRODUCCIÓN DE PLAQUETAS IN VITRO A PARTIR DE LÍNEA CELULAR MEG-01 PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER: MODELO DE PLAQUETAS EDUCADAS POR TUMOR

TRABAJO RECEPCIONAL BAJO LA MODALIDAD DE TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN MÉDICO CIRUJANO

PRESENTA:

Erika Kristhell Sánchez García

DIRECTORES:

Dra. En C. Nancy Patricia Gómez Crisóstomo
Dr. En C. Jorge Yassén Blancas Díaz

COLABORADORES:

Dra. En C. Vilma A. Maldonado Lagunas

Reporte de similitud de Software Antiplagio

Producción de plaquetas in vitro a partir de línea celular MEG-01 para el estudio del cáncer: Modelo de plaquetas educadas por tumor

Por ERIKA KRISTELL SÁNCHEZ GARCÍA

Producción de plaquetas in vitro a partir de línea celular MEG-01 para el estudio del cáncer: Modelo de plaquetas educadas por tumor

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA
MULTIDISCIPLINARIA
DE COMALCALCO**



Comalcalco, Tabasco a 04 de agosto de 2023
Oficio N° DAMC-1290/22

Asunto: Autorización de impresión de
Trabajo Recepcional por Tesis.

**C. ERIKA KRISTHELL SÁNCHEZ GARCÍA
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN MÉDICO CIRUJANO
PRESENTE**

Por medio del presente y en cumplimiento a lo establecido en el Capítulo IV art. 85 del Reglamento de Titulación de los Planes y Programas de Estudio de Licenciatura y Técnico Superior Universitario, vigente, me permito informarle que se autoriza la impresión del Trabajo Recepcional bajo la Modalidad de Tesis "Producción de Plaquetas in Vitro a Partir de Línea Celular MEG-01 para el Estudio del Cáncer: Modelo de Plaquetas Educadas por Tumor" para sustentar su Examen Profesional de la Licenciatura en Médico Cirujano, asesorada por la Dra. Nancy Patricia Gómez Crisóstomo.

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

ATENTAMENTE

[Firma manuscrita]



**M. A. P. HUGO ADRIÁN BARJAU MADRUGA
DIRECTOR**

C.c.p. Archivo

L.C.E. Fátima Montserrat Mayo León
Responsable de Titulación

TITULACIÓN, SEGUIMIENTO DE EGRESADOS Y MERCADO LABORAL

Facebook: @DamcUjatMx Instagram: @damcujatmx Twitter: @DamcUjatMx YouTube: DAMC UJAT

www.ujat.mx



UNIDAD DE CALIDAD Y SERVICIO AL USUARIO



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA
MULTIDISCIPLINARIA
DE COMALCALCO**



El día 31 de julio de 2023, en la ciudad de Comalcalco, Tabasco, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora designada para examinar el Trabajo Recepcional de Tesis de Licenciatura titulado:

"Producción de Plaquetas In Vitro a partir de Línea Celular MEG-01 para el Estudio del Cáncer: Modelo de Plaquetas Educadas por Tumor"

Presentado por la egresada:

Erika Kristhell Sánchez García

Con matrícula 152P4125

Aspirante al título de:

Médico Cirujano

Después de haber revisado el Trabajo Recepcional los integrantes de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN** y **LIBERACIÓN** de dicho trabajo para continuar con el procedimiento de titulación, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

DIRECTORES DE TRABAJO

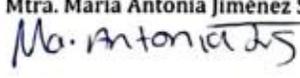

Dra. Nancy Patricia Gomez Crisóstomo

LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Erick A. de la Cruz Hernández


Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla


Dr. Juan Gabriel Tejas Juárez


Mtra. María Antonia Jiménez Santos


Dr. Eduardo Martínez Abundis

TITULACIÓN, SEGUIMIENTO DE EGRESADOS Y MERCADO LABORAL

 @DamcUjatMx  damcujatmx  @DamcUjatMx  DAMC UJAT

www.ujat.mx





UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA
MULTIDISCIPLINARIA
DE COMALCALCO



CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional denominado **"Producción de Plaquetas in Vitro a Partir de Línea Celular MEG-01 para el Estudio del Cáncer: Modelo de Plaquetas Educadas por Tumor"**, del cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco del Trabajo Recepcional antes mencionado, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Comalcalco, Tabasco a los 07 días del mes de agosto del año 2023.

AUTORIZÓ

Erika Kristhell Sánchez García

DEDICATORIA

A mi familia, esto es por y para ustedes. Por dejarme soñar y hacer todo lo posible por cumplir mis deseos. Las letras no alcanzan para entregarles tanto amor.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi familia por siempre estar presentes, por los consejos, la paciencia y el amor, espero que la vida me alcance para devolverles todo lo que me han dado;

A mi abuelita Aura y mi abuelito Santiago, por inundarme de amor, por cada día que me han consentido y cada fin de semana que me salvaron del internado.

A madre, Mafe, Pao; por hacer mi vida más feliz y divertida, y por cuidar a mi perrhija durante mis estancias, servicio social e internado.

A Yobani, por ser y estar, por pintar de amarillo los días grises, por la comprensión, el amor y el tiempo. Por cuidar de nuestra Fifí en mi ausencia y por siempre ser el mejor ser humano. Los amo.

Agradezco a quienes han sido parte fundamental de mi formación académica;

Al laboratorio de Investigación en Enfermedades Metabólicas e Infecciosas de la DAMC-UJAT, por abrir sus puertas y adoptarme como parte de él durante 5 años.

Al doctor Erick de la Cruz, por haberme permitido aprender tanto de él, por los consejos y la motivación para mejorar.

A la doctora Nancy Gómez, por alentarme aún en los días más oscuros, por su apoyo en todos los aspectos, por toda la sabiduría compartida durante estos años de universidad y de amistad. Por abrirme las puertas de su hogar.

Al doctor Eduardo Martínez, por la enseñanza dentro y fuera del aula, por el apoyo y por abrirme las puertas de su hogar.

A la doctora Vilma Maldonado, por permitirme ser parte de su laboratorio, por la confianza y la enseñanza.

Al doctor Jorge Yassén, por la paciencia hacia mi personalidad y mi necesidad de rapidez, por la confianza y la complicidad.

Al laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica, por la amistad, el aprendizaje y las colaboraciones; a las doctoras Karla, Floria, Magali, Gis. A mis amigos por hacer los días más maravillosos; Olivia, Alex, Jorge, Dani, Manu, Benja.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	1
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
MARCO TEÓRICO.....	13
CÉLULAS INMORTALIZADAS	13
<i>Consideraciones éticas de las líneas celulares</i>	13
CÁNCER	14
<i>Marcadores del cáncer</i>	15
1. <i>Señalización sostenida de proliferación</i>	16
2. <i>Evasión de supresores de crecimiento</i>	17
3. <i>Activación, invasión y metástasis</i>	18
4. <i>Habilidad replicativa, inmortalidad</i>	19
5. <i>Inducción de angiogénesis</i>	19
6. <i>Resistencia a la muerte celular</i>	19
<i>Dediferenciación y transdiferenciación</i>	20
I. <i>Inestabilidad genómica y mutación</i>	20
II. <i>Estado inflamatorio persistente</i>	21
a) <i>Desregulación energética celular</i>	21
b) <i>Evasión de la respuesta inmune</i>	22
TROMBOPOYESIS Y MÉDULA ÓSEA	23
<i>Megacariocitos</i>	25
<i>Receptor MPL</i>	27
<i>Trombopoyetina</i>	27
PLAQUETAS	28
<i>Activación de las plaquetas</i>	29

<i>Plaquetas y su asociación con cáncer</i>	31
ANTECEDENTES	33
MODELOS DE PLAQUETAS EDUCADAS POR TUMOR	33
PRODUCCIÓN DE PLAQUETAS <i>IN VITRO</i>	33
<i>Células MEG-01</i>	34
OTROS INDUCTORES DE TROMBOPOYESIS	34
<i>Inhibidores de las histonas desacetilasas</i>	34
<i>Ácido valproico</i>	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
JUSTIFICACIÓN	38
OBJETIVOS	39
<i>Objetivo general</i>	39
<i>Objetivos específicos</i>	39
MATERIAL Y MÉTODOS	41
<i>Cultivo celular de mantenimiento</i>	41
<i>Inducción de producción de plaquetas <i>in vitro</i></i>	41
<i>Aislamiento y conteo de partículas tipo plaquetas</i>	42
<i>Ensayo de formación de trombo de plaquetas derivadas de MEG-01</i>	42
<i>Ensayos de caracterización de plaquetas CD41+ por citometría de flujo</i>	43
<i>Ensayo de co-cultivo para modelo de Plaquetas Educadas por Tumor (PET)</i>	44
<i>Cuantificación de megacariocitos maduros</i>	44
<i>Análisis estadístico</i>	45
RESULTADOS	46
<i>Cuantificación de partículas tipo plaquetas por condición</i>	46
<i>Cuantificación de partículas tipo plaquetas por cada megacariocito sembrado</i>	47
<i>Megacariocitos maduros por condición</i>	48
<i>Caracterización de células CD41+ mediante citometría de flujo</i>	49
<i>Pruebas de agregación de partículas tipo plaquetas</i>	51

Análisis de troncalidad de células de cáncer de páncreas entrenadas por plaquetas 52

DISCUSIÓN 54

CONCLUSIÓN 58

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES 59

GLOSARIO 60

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61

ANEXOS 68

ÍNDICE DE FIGURAS 68

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

ARN: Ácido ribonucleico

ARNc: RNA circular

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

AVP: Ácido Valproico

cADN: ADN complementario

CAPIR: *Circulation, Accumulation, Penetration, Internalization, and Release*, por sus siglas en inglés

CD41: Integrina alfa-IIb, glicoproteína GPIIb

CD42: Glicoproteína GPIb

CD61: Glicoproteína GPIIIa

CD62: Familia de Selectinas: CD62L, Selectina-L; CD62P, Selectina-P; CD62E, Selectina-E

c-MPL: Receptor de trombopoyetina

CXCL12: Factor 1 derivado del estroma

FGF4: Factor de crecimiento de fibroblastos

FvW: Factor de Von Willebrand

GPIIB/IIIa: Complejo de integrinas proagregantes

H3K56ac: Modificación epigenética (acetilación) del residuo de la lisina 56 en la histona 3

HDAC: Histona desacetilasa

LAMP: Proteínas de membrana asociadas a lisosomas

LEF1: *Lymphoid enhancer binding factor 1*, por sus siglas en inglés

lncARN: ARN largo no codificante

miARN: micro ARN

MO: Médula Ósea

P16: Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina

P65: Componente del complejo NFkB.

PTP: Partículas tipo plaquetas

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, por sus siglas en inglés

THPO: Gen codificante de la proteína Trombopoyetina

TPA: 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato

TPO: Trombopoyetina

TXA2: Tromboxano A2

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VPH: Virus del Papiloma Humano

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

RESUMEN

El cáncer es una entidad etiopatogénica compleja en la que diversos procesos de daño celular se conjuntan, ocurre por un crecimiento anormal y acelerado de un tipo celular en el individuo. Este crecimiento acelerado puede ser producto de mutaciones, inestabilidad cromosómica y diversos factores que contribuyen al daño celular, pero aún hay muchas preguntas sobre los mecanismos implicados, es por ello que nace la necesidad de crear nuevos modelos de estudio que nos permitan conocer los mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo del cáncer y de este modo generar mejores diagnósticos, pronósticos y tratamientos basados en medicina de precisión.

En este trabajo se aborda principalmente el papel de las plaquetas, células pequeñas y anucleadas pero fundamentales para el desarrollo de la migración y metástasis en estadios avanzados del cáncer. Hasta ahora se conoce que las plaquetas educadas por tumor protegen a las células tumorales de ser reconocidas por las células inmunológicas, formando un cúmulo de células que viaja por el torrente sanguíneo. La interacción entre las plaquetas y las células tumorales aumentan la proporción de células troncales en el tumor primario, aportando así características de malignidad mediante su dediferenciación.

Hasta ahora los protocolos de estudio de plaquetas educadas por tumor se realizan con muestras de donadores, sin embargo, debido al método de obtención de las plaquetas (flebotomía), a la cantidad de células colectadas, y a la variabilidad fenotípica entre donadores (diferenciales en patrones de expresión), resulta difícil la disponibilidad de las muestras para generar resultados fiables y reproducibles.

En este trabajo proponemos un modelo de plaquetas educadas por tumor *in vitro*, derivadas de megacariocitos de la línea celular MEG-01, que permite obtener un gran número de plaquetas funcionales, además de eliminar la variabilidad fenotípica de estas células. La accesibilidad de estas células como modelo de estudio permitirá la creación de nuevas líneas de investigación que profundicen sobre los mecanismos

moleculares sobre el papel de las plaquetas educadas por tumor en el desarrollo de la metástasis.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ABSTRACT

Cancer is a convoluted etiopathogenic entity where diverse processes of cell damage conjoins, occurs by abnormal and accelerated growth in a group of cells of the individual. It can be the result of mutations, chromosomal instability and several factors that contribute to cell damage, that is why arises the need to create new biological models to investigate the cellular and molecular mechanisms implicated in cancer, thus improving the generation diagnoses, prognoses and treatments based on precision medicine.

This work mainly address the role of platelets, small and anucleated cells, fundamental for the development of migration and metastasis in advanced stages of cancer. Is widely known that tumor-educated platelets protect tumor cells from recognition by immune cells, forming a cluster of tumoral cells that travels through the bloodstream. The interaction between platelets and tumor cells increases the proportion of stem cells in the primary tumor, thus providing malignant characteristics through their dedifferentiation.

Until now, the study of tumor-educated platelets are performed with healthy donor samples; however, due to the method of obtaining platelets (phlebotomy), the number of cells collected, and the phenotypic variability between donors (differentials in expression patterns), it is difficult to have samples enough to generate reliable and reproducible results.

This work proposes a *in vitro* model of tumor-educated platelets derived from megakaryocytes of the MEG-01 cell line, which allows obtaining numerous functional platelets; in addition to eliminates the phenotypic variability of these cells. The accessibility of this model will allow the creation of new lines of research to investigate the molecular mechanisms involved in the tumor-educated platelets role in metastasis.

INTRODUCCIÓN

La línea celular MEG-01 (aislada de leucemia megacarioblástica) fue descrita por primera vez en 1985, gracias al trabajo del doctor Michinori Ogura, quien se encargó principalmente de analizarla y caracterizarla para su uso biotecnológico; en 1988 se determinó la inducción funcional y morfológica de la diferenciación de las células MEG-01 mediante *Phorbol Diesters* (encargados de la estimulación de proteína C, promotores de tumores). En este estudio se detectaron los marcadores de superficie que caracterizan a esta línea celular (GPIIb/IIIa), mediante inmunodetección (anticuerpos dirigidos) y citometría de flujo. Se utilizó el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) como inductor de diferenciación, encontrando una mayor proliferación y diferenciación mediante los ensayos realizados (1).

Es hasta 1991 el equipo de trabajo del investigador Michinori Ogura describió por primera vez la producción de partículas tipo plaquetas (PTP) provenientes de la línea celular MEG-01. Se postula que las partículas tipo plaquetas son producidas espontáneamente por la fracción diferenciada de megacariocitos. Estas PTP se identificaron mediante sus marcadores de superficie, como el antígeno CD61 y el factor de *Von Willebrand* (2).

En 1998 se estudió aún más sobre el proceso de formación y liberación de PTP derivadas de las células MEG-01, además se caracterizaron sus marcadores de superficie. Los marcadores estudiados se componen por la glicoproteína GPIIb/IIIa y CD62, analizados mediante ensayos funcionales por adición de trombina en un cultivo celular y a la reacción de estas a la presencia de P-selectina. En este estudio se determinó que las PTP derivadas de MEG-01 son células con arquitectura (receptores, proteínas) similar a plaquetas con capacidad de agregación y coagulación, una vez que se documentan las pruebas funcionales, reciben el nombre de plaquetas derivadas de MEG-01 (3).

La producción de plaquetas y partículas tipo plaquetas *in vitro* se ha centrado en diseñar un modelo con células derivadas de cordón umbilical diferenciadas hacia

megacariocitos, mediante biorreactores, obteniendo así plaquetas funcionales. Los inductores propuestos (hasta ahora) como estimulantes de la trombopoyesis son trombopoyetina, ácido valproico, nicotinamida, butirato de sodio y tricostatina A (4).

En 1886 fue descubierto el ácido valproico (AVP), fármaco inicialmente usado como tratamiento primario anticonvulsivante. En 2001 fue descrito como inhibidor de la desacetilación de histonas (HDAC) por primera vez, además de iniciar sus pruebas en ensayos clínicos fase I y II. En 2006 se demostró, mediante evaluación de la vía de señalización de ERK, que la función de HDAC del VPA promueve la expresión de marcadores de trombopoyesis temprana (5).

La trombopoyetina (TPO) fue descubierta en 1958, sin embargo, fue purificada hasta 1994. Hasta ahora se describe la TPO como una citocina reguladora, que al unirse con el receptor CD110 (asociado a la leucemia proliferativa, MPL), desencadena la producción de megacariocitos y plaquetas (6).

Los modelos de plaquetas educadas por tumor se centran en definir el comportamiento de las células de cáncer (páncreas, hígado, pulmón, cérvix, intestino) posterior a la exposición con plaquetas; sin embargo, estos modelos también se encargan de estudiar el comportamiento de las plaquetas y sus cambios estructurales, morfológicos y patrones de expresión génica y proteica(7).

Hasta ahora los modelos descritos se han basado en el uso de plaquetas derivadas de donadores sanos y donadores con diagnóstico de cáncer, exponiéndolas a células tumorales, lo cual ha demostrado un incremento en la capacidad de invasión, migración y principalmente troncalidad de las células cancerosas, incrementando la expresión de *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *ALDH* (genes asociados a troncalidad debido a su papel en la embriogénesis) en células cancerosas (8).

MARCO TEÓRICO

CÉLULAS INMORTALIZADAS

Una célula inmortalizada es aquella que posee la capacidad de dividirse ilimitadamente, lo cual es útil primordialmente en estudios *in vitro*. Hace siete décadas, en 1951, inició un nuevo episodio de la biotecnología, esto gracias a la obtención de la primera línea celular (células inmortalizadas), derivada de una paciente diagnosticada con cáncer de cérvix en estadio terminal. La obtención de esta línea celular denominada "HeLa" (nomenclatura derivada de las iniciales del nombre y apellido de la paciente, Henrietta Lacks), es hasta ahora uno de los más grandes avances de la ciencia en los últimos años. El uso de las células HeLa ha generado miles de líneas de investigación que contribuyen a la generación de vacunas, tratamientos y principalmente a la generación de conocimiento acerca del funcionamiento de la célula tumoral (9).

Los mecanismos mediante los cuales una célula adquiere la capacidad de immortalizarse se asocian a la modificación de los telómeros, ya sea por un mecanismo artificial o un mecanismo natural, los cuales están coadyuvados por mutaciones en genes como p53, p16 o pRb. Las líneas celulares requieren suplementación de nutrientes, lo que se logra con el suministro de medios actualmente comercializados y ampliamente accesibles para continuar con los cultivos celulares, lo que dependerá de las necesidades de la línea de investigación en particular, permitiendo el empleo de ensayos *in vitro* mediante estas líneas celulares caracterizadas y estandarizadas (10).

Consideraciones éticas de las líneas celulares

En el período posterior a la II Guerra Mundial se creó la declaración de Helsinki, una base jurídica, legal y bioética, la cual parte de la necesidad por regular la experimentación humana(11). Esta declaración se encuentra integrada por diversos apartados, uno de ellos con indicaciones específicas, en las que se abordan temas

tales como la prohibición de las pruebas clínicas en humanos sin previo conocimiento, la autorización a consideración del paciente y familiares posterior al entendimiento total de los ensayos, así como los riesgos y efectos secundarios que se puedan llegar a sufrir derivados de ello.

Con el paso de los años, se han agregado nuevas cláusulas a la declaración de Helsinki, estos cambios son dinámicos y están determinados por los avances biomédicos, su alcance y repercusión, para no generar un evento similar al que sucedió con las células HeLa. Con esto se ha logrado crear una norma de manejo para el material biológico recolectado, además que el paciente tiene la opción de declinar la decisión de participar en el estudio en cualquier momento en el que aún sea localizable la muestra. (<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>)

CÁNCER

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer se define como un grupo de enfermedades que tienen origen en cualquier órgano o tejido del cuerpo y que se caracterizan por un crecimiento celular anormal e incontrolable; estas células además tienen capacidad de invasión y/o metástasis hacia otros órganos (OMS, 2022). Para entender esta entidad, debemos conocer acerca de sus marcadores, los cuales se describen más adelante.

La capacidad de mantener un genotipo característico (estabilidad cromosómica), es esencial para mantener un funcionamiento celular adecuado, sin embargo, pese a que el cáncer no tiene causas específicas descritas, hasta ahora se ha propuesto la inestabilidad cromosómica como posible causa para que se generen daños a nivel molecular e iniciar la inmortalización celular (12). Un ejemplo de ello, es el daño al genoma que se genera por diversas infecciones, como el virus del papiloma humano (HPV), cuyas infecciones se ha demostrado que están estrechamente relacionado con el desarrollo de cáncer cervico-uterino, oral, faríngeo y anal (13).

Otro de los factores ampliamente descritos y caracterizado como uno de los más importantes inductores de daño al genoma es el consumo de tabaco, identificado

como agente causal directo de distintas neoplasias principalmente en cáncer de pulmón. Entre los mecanismos descritos se encuentra el daño ocasionado por sustancias como el benceno, benzopireno, acetaldehído, formaldehído, entre otros; dado que estos generan lesiones directas a nivel tisular, causando inicialmente irritación a las mucosas y además daño directo al ADNA (alterando su estructura y generando así mutaciones) (14).

Marcadores del cáncer

En el año 2000 (15) fue publicado un artículo que menciona por primera vez los marcadores de identidad del cáncer; donde se presentan los primeros seis características que fundamentan el modelo más conocido y estudiado del cáncer, dado que todos los tipos de cáncer sólidos presentan las mismas características. A continuación, se enlistan los marcadores propuestos. Cada uno de estos indicadores posee vías de transducción de señales alteradas ya descritas:

- Señales de crecimiento constitutivamente activadas** (sobreexpresión del oncogén H-Ras).
- Resistencia a señales de supresión de crecimiento** (pérdida del gen Rb, supresor de tumores).
- Invasión tisular y metástasis** (inhibición de E-cadherina)
- Potencial replicativo ilimitado** (expresión de telomerasa)
- Angiogénesis** (producción del inductor de VEGF)
- Evasión de apoptosis** (alteración en las vías de BAX/BAK/BCL-2).

En 2011 Hanahan y Weinberg describieron “La siguiente generación” de los marcadores del cáncer, en donde se describen cuatro características más y optan por renombrar algunos de los marcadores previos; además de proponer posibles blancos o ventanas terapéuticas para contrarrestar cada uno.

Los marcadores previos renombrados, y uno de sus probables blancos terapéuticos, son los siguientes:

- 1- **Señalización sostenida de proliferación** (Inhibidores de EGFR)
- 2- **Evasión de los supresores de crecimiento** (Inhibidores de cinasa dependiente de ciclina)
- 3- **Activación, invasión y metástasis** (Inhibidores de HGF/c-Met)
- 4- **Habilidad replicativa, inmortalidad** (Inhibidores de la telomerasa)
- 5- **Inducción de angiogénesis** (Inhibidores de señalización de VEGF)
- 6- **Resistencia a la muerte celular** (mimetización de BH3 proapoptótico)

Se proponen dos condiciones favorecedoras del cáncer:

- I. **Inestabilidad genómica y mutación** (ejemplo: inhibidores de la enzima PARP)
- II. **Estado inflamatorio persistente** (fármacos anti-inflamatorios selectivos)

Así como dos características emergentes:

- a. **Desregulación energética celular** (inhibidores de la glucólisis aeróbica)
 - b. **Evasión de la respuesta inmune** (inhibición del anticuerpo anti-CTLA4)
- (15)

En el 2021, se sumaron cuatro características nuevas a las descritas previamente: **dediferenciación y transdiferenciación; desregulación epigenética; microbioma alterado; señalización neuronal alterada**. Recientemente se ha propuesto que algunos marcadores de identidad para cáncer pueden ser modificables, tal es el caso de la alteración del microbioma, condición moldeable a lo largo de la vida de los individuos mediante los cambios en la dieta y los cambios en el estilo de vida. También se describe como un factor modificable a la desregulación epigenética, la cual genera la posibilidad de cambiar tanto el pronóstico como la sobrevida de los pacientes (16).

1. Señalización sostenida de proliferación

Mantener la señalización de proliferación sostenida es una característica única de las células cancerígenas. Para generar esta condición puede existir la remodelación del

espacio pericelular y de la matriz extracelular, aumentando así la biodisponibilidad de factores de crecimiento, esto puede ocurrir mediante sobreproducción de receptores, señalización constitutivamente activa; proteasas, sulfatasas y otras enzimas que son liberadas y activadas en exceso.

Una de las vías de señalización desreguladas dentro de este marcador es la de PI3K, se ha descrito la presencia de mutaciones en las proteínas que participan en esta vía de señalización, evidenciado mediante análisis de secuenciación de material genético tumoral.

El mecanismo de retroalimentación negativa es el más importante en el organismo, encargado de cesar una función a través de un producto de la misma estimulación, limitando así la respuesta al estímulo, modulando el proceso de ligando-receptor. Por tanto, si existe una anomalía en este mecanismo no permite el cese de una función que ocurre de manera excesiva y perpetúa así una señalización y se estimula así una respuesta continua. En las células cancerígenas uno de los procesos involucrados, es la disrupción del mecanismo de retroalimentación negativa, presente en diversas cascadas de señalización (PI3K/AKT/mTOR) que se encargan de regular la proliferación y el ciclo celular.

La senescencia celular puede ser resultado de la señalización excesiva de proliferación, y ésta a su vez está determinada por oncogenes tales como RAS, MYC y RAF (posibles vías involucradas). El exceso de proliferación en células transformadas o cancerígenas pueden involucrar a dos factores importantes: la estimulación mitógena máxima (índice de Hayflick) y la defensa ante señales antiproliferativas. Las células transformadas al recibir altos niveles de señalización proliferativa pueden adaptarse a ellas y de esta manera bloquear el paso hacia la senescencia o apoptosis.

2. Evasión de supresores de crecimiento

Los supresores Rb (asociado a retinoblastoma) y p53, son considerados reguladores maestros sobre la proliferación celular, la inducción de senescencia y activación de

apoptosis por la vía intrínseca, esta última a través de la mitocondria y mediada por el balance de señales orquestadas por la familia de proteínas Bcl-2/Bax/Bak.

El producto citoplásmico de NF2, se encarga de inhibir la interacción entre moléculas de adhesión de la superficie celular con receptores tirosina-cinasa transmembranales, lo cual favorece la inhibición por contacto. Además, secuestra receptores de factores de crecimiento y limita su capacidad para emitir señales mitógenas eficientes.

Otro de los mecanismos de inhibición es mediado por la proteína polar epitelial LKB1, encargada de organizar la estructura epitelial y mantener la integridad tisular, también puede anular el efecto mitógeno provocado por el oncogén MYC. LKB1 es necesario para mantener la complejidad de la arquitectura tisular, debido a que este es fundamental para inhibir y controlar la señalización de proliferación.

El último de estos mecanismos es controlado por la vía de TGF- β (Factor de crecimiento transformante β) que en condiciones fisiológicas es un regulador maestro de señales pro-inflamatorias. Sin embargo, en cáncer se encuentra sobreexpresado, asociado a metástasis y migración; al controlar señales pro-inflamatorias favorece el proceso de transición epitelio-mesénquima, asociado a alto grado de malignidad.

3. Activación, invasión y metástasis

Estos mecanismos se caracterizan por la invasión de células cancerosas a través de la capa basal y capas profundas de los órganos afectados, la migración de células cancerosas a otros órganos (por continuidad, por vía linfática o por el torrente sanguíneo), además de la transición epitelio-mesénquima (TEM). La TEM es un proceso fisiológico que ocurre solo en el período embrionario, para formar las capas germinales y promover la diferenciación celular; sin embargo, en el cáncer este proceso se reactiva. La TEM reprime la expresión de E-cadherina (elemento regulador del fenotipo epitelial), debido a una marca represiva mediante desacetilación (H3K27me3) a nivel del promotor de su gen codificante (16).

4. Habilidad replicativa, inmortalidad

La telomerasa es una enzima ADN-DNA polimerasa que se encarga de agregar segmentos repetitivos de ADN en los extremos de los cromosomas, sin embargo, esta enzima está presente únicamente durante la embriogénesis. Si esta enzima se activa después del período embrionario, no permite el acortamiento de los telómeros, promoviendo así la inestabilidad cromosómica e impidiendo la senescencia celular. Mediante este mecanismo, las células cancerosas logran superar el índice de Hayflick (postula que el promedio mitótico máximo celular es de 50 veces antes de su senescencia) (16).

5. Inducción de angiogénesis

Las células requieren nutrientes y oxígeno para un adecuado metabolismo y función, durante el período de embriogénesis se crean vasos sanguíneos de *novo* (vasculogénesis), en contraste, durante la progresión tumoral se crean vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes (angiogénesis). Esto se debe principalmente al desequilibrio angiogénico en procesos de malignidad, un tumor no puede crecer más de 2 mm sin recibir aporte de nutrientes. La hipoxia y señales oncogénicas activan genes pro-angiogénicos como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), el cual puede sobreexpresarse para generar nuevos vasos sanguíneos defectuosos que sirvan para aportar nutrientes al tumor, y puede coadyuvar a la metástasis por mecanismo de extravasación. Por otro lado, se sabe que VEGF es secuestrado en la matriz extracelular, promoviendo liberación y activación de proteasas que degradan la matriz extracelular y favorecen la migración.

6. Resistencia a la muerte celular

La apoptosis es un proceso fisiológico encargado de regular la muerte celular programada, en respuesta a diversos factores estresantes. La apoptosis puede activarse a través de dos vías: intrínseca o mitocondrial (familia Bcl-2 y las proteínas

Bax y Bak) y extrínseca a través de receptores (FAS ligando/FAS receptor); ambas desencadenan la activación de proteasas (caspasas 8 y 9). En células tumorales se encuentran afectados los mecanismos reguladores de la apoptosis y no ejercen la función habitual, los sensores de daño se encuentran alterados o mutados, tal es el caso de p53, es por ello que existe proliferación celular anormal (17).

Dediferenciación y transdiferenciación

La dediferenciación es la reversión de las células a un estado anterior no diferenciado, fenómeno que se presenta únicamente en el período de embriogénesis para generar las capas germinales. En el cáncer este proceso se reactiva, generando un fenotipo troncal o no diferenciado, caracterizado por la sobreexpresión de los genes *SOX2*, *NANOG*, *OCT4*, *ALDH*, todos ellos asociados con tumores malignos sólidos (18).

Por otro lado, la transdiferenciación se define como el cambio morfológico a nivel tisular (metaplasia), debido a la variación de un fenotipo celular a otro, un ejemplo es la transición de un epitelio escamoso estratificado a un epitelio simple columnar (esófago de Barret). Esta transdiferenciación puede deberse en gran medida al daño continuo presente en un tejido. Un ejemplo de los genes alterados en este proceso es *PTF1 α* , favoreciendo la proliferación y transdiferenciación inducida por *KRAS* (oncogén), acelerando así el proceso de invasión y metástasis (19).

I. Inestabilidad genómica y mutación

Existen más de cien proteínas encargadas de mantener la integridad genómica y la reparación del ADN, estos procesos ocurren ininterrumpidamente durante el ciclo celular. Pese a que la variabilidad genómica favorece la diversidad genética y la evolución de los organismos; si estos cambios se presentan posterior a la etapa embrionaria pueden generar mutaciones y zonas de inestabilidad genómica relacionadas con diversas entidades patológicas (cada célula cancerígena puede contener de cuarenta a sesenta mutaciones). Existe evidencia de inestabilidad genómica y mutaciones en lesiones pre-malignas, a medida que incrementa la inestabilidad genómica se eleva también el riesgo de cáncer (20).

II. Estado inflamatorio persistente

La inflamación es un proceso fisiológico autolimitado para mediar el daño tisular y su reparación, caracterizado por la liberación de moléculas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno, con el fin de reclutar el mayor número de células posibles.

El estado inflamatorio persistente es un proceso desregulado donde las moléculas pro-inflamatorias se encuentran activadas de manera permanente; en el cáncer promueve la actividad mutagénica y acelera el proceso de malignidad. Asimismo, el estado inflamatorio mantiene el abastecimiento de moléculas bioactivas favorables para el microambiente tumoral, involucrando factores de crecimiento que mantienen una señalización sostenida de proliferación, factores de supervivencia para superar el número mitógeno máximo, factores proangiogénicos; así como la liberación de enzimas como metaloproteasas que modifican la matriz extracelular y facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis.

a) Desregulación energética celular

Una célula sana obtiene energía a través del metabolismo de la glucosa mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ruta aerobia) y, en menor medida por la glucólisis anaerobia. Sin embargo, en condiciones de alta demanda energética con bajo oxígeno disponible, se favorece la glucólisis anaerobia por ser un proceso más rápido.

Las células tumorales hacen uso de la glucólisis anaeróbica, proceso denominado “efecto de Warburg”, caracterizado por producir menor cantidad de energía a largo plazo, pese a que el rendimiento de ATP es mayor en otros procesos metabólicos. Sin embargo, este proceso genera grandes cantidades de ácido láctico a nivel local y promueve hipoxia en las células adyacentes, aunado a la neovascularización tumoral.

b) Evasión de la respuesta inmune

Las células del sistema inmune se encargan de identificar y atacar las células o componentes extraños (virus, bacterias, hongos) mediante el reconocimiento por antígenos de superficie. Algunas células cancerígenas pueden expresar antígenos de superficie, sin embargo, no se presentan en todos los tipos de cáncer.

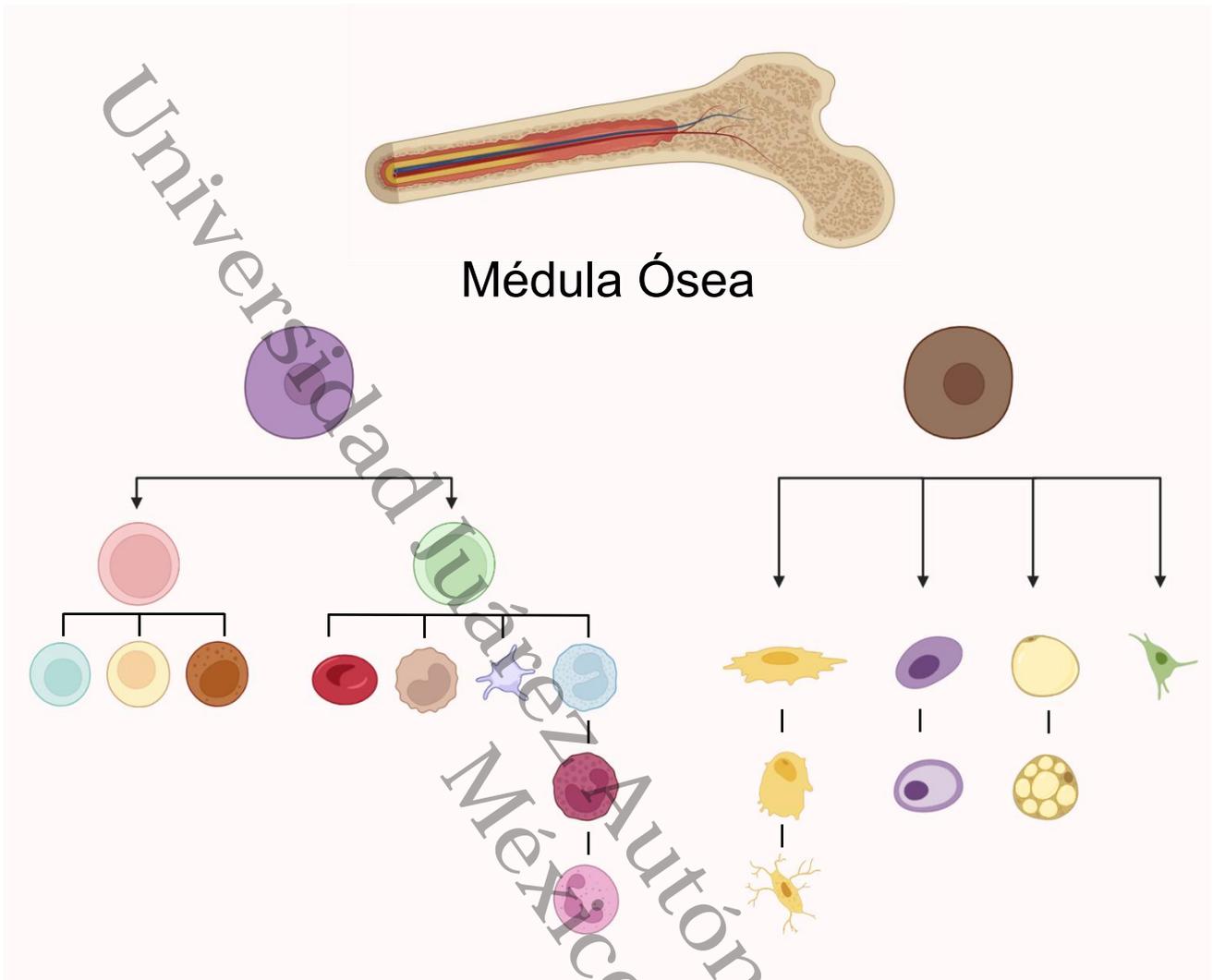
Se han descrito dos mecanismos mediante los cuales las células tumorales evaden al sistema inmune, uno de ellos ocurre mediante modulación de la respuesta inmune, por ejemplo, la metilación del promotor de NLRC5 del gen que codifica para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (vía de presentación de antígenos para Linfocitos T CD8+). El segundo mecanismo es el recubrimiento de las células tumorales con plaquetas para evitar su reconocimiento inmune, esto les permite a las primeras migrar y generar metástasis en otros órganos.

TROMBOPOYESIS Y MÉDULA ÓSEA

La médula ósea es un tejido esponjoso que se encuentra en el interior de los huesos largos, en individuos sanos corresponde aproximadamente a 5 % de la masa corporal total, es el órgano hematopoyético(21). La médula ósea alberga a las células progenitoras mesenquimales (que dan origen a las células de la función inmune y mecánica), células progenitoras hematopoyéticas (que dan origen a las células encargadas principalmente del transporte de oxígeno, nutrientes y producción de células fundamentales para la respuesta inmune), además de contener la estructura y maquinaria necesarias para la formación de hueso [Figura 1] (22).

En la médula ósea ocurre la trombopoyesis, un proceso que tiene como objetivo la formación de plaquetas, mediante la diferenciación de las células progenitoras comunes hematopoyéticas que originan el linaje eritroide y trombopoyético. Este proceso inicia en los megacarioblastos, que se diferencian a promegacariocitos y posteriormente dan origen a los megacariocitos liberadores de plaquetas, CD41+ y CD42+ [Figura 2]. Los megacariocitos maduros realizan un proceso de endomitosis, mediante el cual se multiplica su material genético dentro de la misma célula, generando un ambiente transcriptómicamente activo; para posteriormente dar paso al resultado final de la trombopoyesis, la generación y liberación de plaquetas al torrente sanguíneo (23,24).

El nicho de megacariocitos maduros en la médula ósea contiene una subpoblación de las células progenitoras hematopoyéticas que expresan el gen VWF (que codifica para la glicoproteína de *Von Willebrand*) y promueve la auto-replicación de las células progenitoras hematopoyéticas megacariocíticas (25). Es por lo anterior que diversos grupos estudian la importancia de las células progenitoras hematopoyéticas y la transición desde un estado indiferenciado hacia eritrocitos, células mieloides o plaquetas (26).



- | | | | |
|--|--|---|---|
|  Célula troncal |  Precursor mieloide |  Célula mesenquimal |  Condroblasto |
|  Precursor linfoide |  Eritrocito |  Célula osteoprogenitora |  Condrocito |
|  Célula B |  Monocito |  Osteoblasto |  Adipoblasto |
|  Célula T |  Plaqueta |  Osteocito |  Adipocito |
|  Célula NK |  Eosinófilo | |  Célula estromal |
| |  Basófilo | | |
| |  Neutrófilo | | |

Figura 1. Hematopoyesis . Producción de células derivadas de la médula ósea, partiendo del progenitor común de las células troncales.

Megacariocitos

Los megacariocitos son células de gran tamaño (30-100 μm de diámetro) que pueden contener múltiples núcleos (poliploidía), característica que confiere amplia capacidad para generar un ambiente transcriptómicamente activo, siendo de utilidad para la producción plaquetaria (27). Estas células comprenden aproximadamente el 1 % de la población de las células sanguíneas, y el 0.05 % de las células totales en la médula ósea, y son las que dan origen a las plaquetas (28).

La megacariopoyesis y la trombopoyesis están reguladas directamente por la vía de transducción de señales de Hippo, principalmente por el inhibidor de la vía LATS1/2, conocido como un supresor de tumores que actúa a nivel del ciclo celular, permitiendo o bloqueando la progresión de este, y favoreciendo la migración celular o la apoptosis. La baja proporción de LATS1/2 induce la proliferación mediante el incremento de la actividad celular en la fase G2/M, mientras que su sobreexpresión genera arresto a nivel de la fase G2/M, a través de la inhibición de la actividad de CDC2/Ciclina A. La activación de la vía de Hippo inhibe la diferenciación a nivel del progenitor hematopoyético, mientras que la depleción de LATS1/2 ocasiona la inhibición de la diferenciación megacarioblástica y reducción del número de plaquetas a producir por cada megacariocito (29).

Los megacariocitos poseen pseudópodos perivasculares (protoplaquetas) que se extienden para anclarse al endotelio e iniciar un proceso celular transendotelial, liberando las plaquetas al torrente sanguíneo. Esta interacción entre las células endoteliales y los megacariocitos está regulada por quimiocinas, moléculas de adhesión, lípidos propios del torrente sanguíneo y receptores de superficie en los megacariocitos. Las células endoteliales participan en la regulación y maduración de megacariocitos, así como en la liberación de plaquetas; tienen la capacidad de promover la producción de plaquetas mediante el factor 1 derivado del estroma (CXCL12) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF4). Los megacariocitos poseen en su estructura un receptor MPL, que al unirse con su ligando, la trombopoyetina desencadena una vía de señalización para obtener plaquetas como producto final (30).

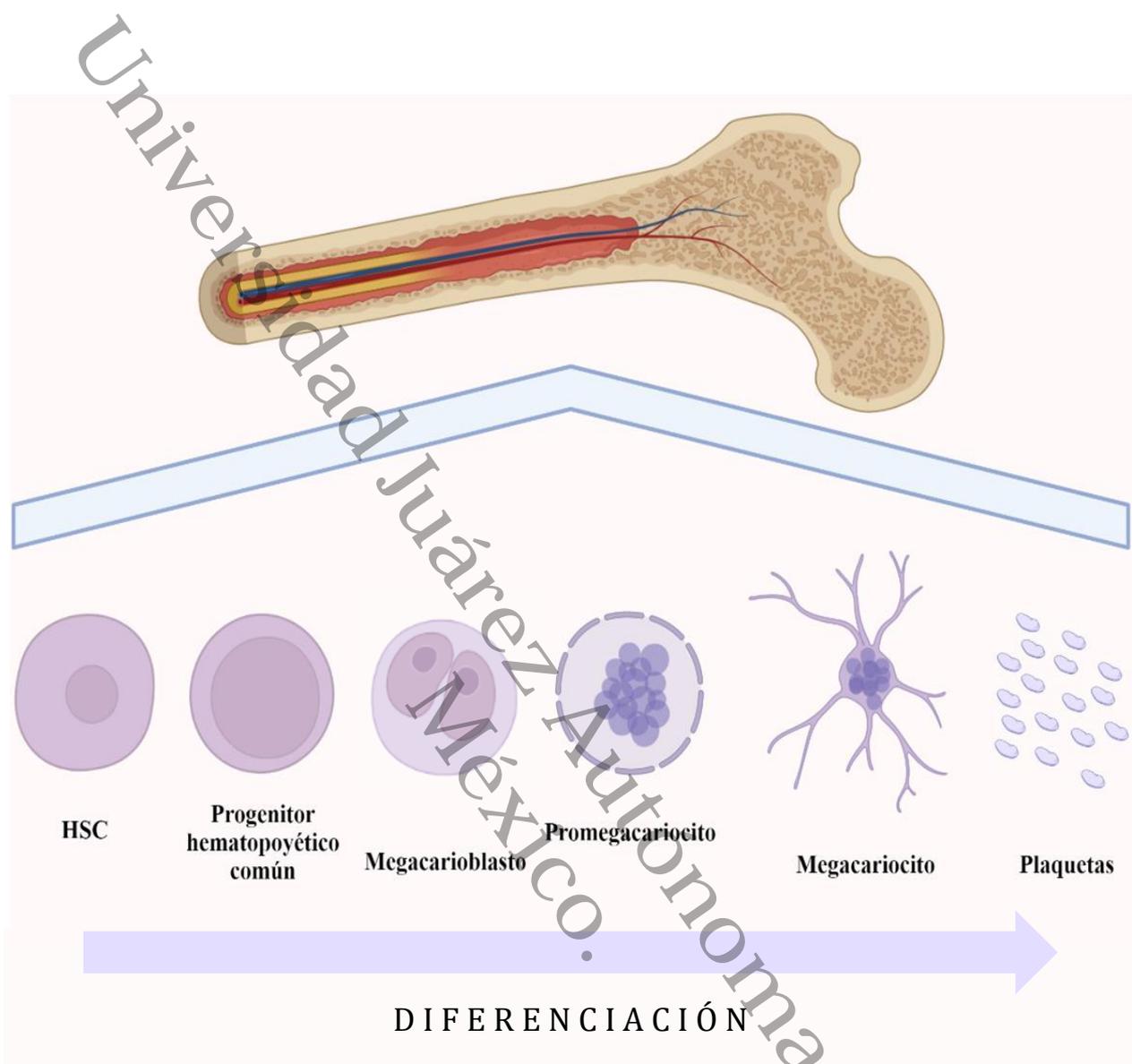


Figura 2. Trombopoyesis. Diferenciación desde célula troncal, hacia los precursores de megacariocitos y posteriormente hacia megacariocito maduro. El producto final de la trombopoyesis son las plaquetas. (HSC: célula troncal humana)

Receptor MPL

Las células progenitoras de megacariocitos necesitan tanto el receptor MPL como su ligando, la trombopoyetina; para así permanecer en un estado de quiescencia en los nichos de la médula ósea. El receptor para trombopoyetina MPL (CD110, TPOR, THPOR, proteína de la leucemia proliferativa) es esencial para efectuar la trombopoyesis y para el mantenimiento de las células hematopoyéticas progenitoras comunes. Este receptor está, conformado por 635 aminoácidos, contiene un dominio transmembrana con dos dominios de receptores de citocinas extracelulares y dos dominios receptores para citocinas intracelulares (31).

En 1990 se identificó el oncogen *V-MPL*, a partir de la leucemia mieloproliferativa murina, esto hizo posible inmortalizar células hematopoyéticas de diferentes linajes de la médula ósea. Hasta 2 años después, en 1992, se nombró *C-MPL* a su homólogo de origen humano y este fue clonado; mientras que el ligando de este, la trombopoyetina, fue clonado hasta 1994.

Trombopoyetina

La trombopoyetina (TPO) es una proteína codificada por el gen *THPO*, constituida por 353 aminoácidos, con un peso de aproximadamente 80-90kDa; estructuralmente está compuesta por un dominio de unión al receptor MPL hacia el extremo N-terminal y un dominio glicano hacia el extremo C-terminal. La TPO posee una estructura similar a la eritropoyetina debido a su haz de cuatro hélices unidas por puentes disulfuro en el dominio N-terminal (6). Descrita por primera vez por Keleman en 1958, señalada como una sustancia capaz de generar aumento de la producción plaquetaria en individuos con diagnóstico de trombocitopenia. La TPO fue purificada hasta 1994 mediante clonación del retrovirus VMPL (leucemia mieloproliferativa murina), de donde se extrajo el oncogén *C-VMPL* (32).

La TPO regula la producción de megacariocitos y plaquetas, por activación de la transducción de señales mediante el receptor MPL. Se ha reportado que, en modelos

de ratones MPL *knockout in vivo*, existe una reducción significativa en el número de megacariocitos y plaquetas circulantes, así como de células progenitoras comunes (33). La señalización por TPO promueve la internalización del receptor de TPO C-MPL, formando el complejo receptor-ligando e iniciando la cascada de señales que involucran a las vías: JAK2, STAT3/STAT5, MAPK/ERK y PI3K/AKT. De este modo, TPO induce la generación de plaquetas (trombopoyesis) mediante la estimulación de megacariocitos a través de su receptor MPL (34).

PLAQUETAS

Las plaquetas son células pequeñas (2-4 μ m) anucleadas, que se encuentran libres en el torrente sanguíneo. Los niveles normales de plaquetas en un individuo adulto sano son de entre 150,000 millones a 450,000 millones por litro, con un promedio de vida de 7 a 10 días (35). Las plaquetas tienen la capacidad de agregarse, reparar y proteger de daños a las paredes de los vasos sanguíneos; estas células desempeñan un papel fundamental en la homeostasis, la integridad vascular y la respuesta inmune.

Por medio de análisis transcriptómicos en murinos, se ha demostrado que las plaquetas son células heterogéneas respecto a su estructura y función; se ha evidenciado que el proceso de liberación de plaquetas al torrente sanguíneo no sucede exclusivamente en la médula ósea, sino que también involucra un mecanismo de migración de los megacariocitos, los cuales se encargan de llegar al espacio pulmonar, extender sus protoplaquetas y finalmente liberar las plaquetas (36).

Las plaquetas contienen cuatro organelos: mitocondrias, gránulos alfa, gránulos densos y lisosomas. Existen dos vías de activación, intrínseca y extrínseca, esta última se describe a continuación; en presencia de colágeno, trombina o ADP, se genera una activación plaquetaria en segundos, que induce la agregación mediante el factor de *Von Willebrand*. Posteriormente se genera el trombo por medio de la fibrina que recubre a las plaquetas; la trombina presentada generará que más plaquetas se adhieran; el factor allbB3 es un agente pro-agregante y las plaquetas

secretoras propiciarán un microambiente adecuado para la agregación y el reclutamiento de más plaquetas (36).

Activación de las plaquetas

En condiciones fisiológicas, la activación de las plaquetas ocurre como respuesta al daño endotelial, en cuanto ocurre exposición de colágeno y proteínas de la matriz extracelular. La formación de trombos se genera a partir de la respuesta plaquetaria mediada por el rodamiento, la adherencia, esparcimiento, migración, agregación y estabilización. Dentro de la activación extrínseca, la primera interacción ocurre mediante diversos receptores de glicoproteínas; estos tienen como ligando a factores de la matriz extracelular como proteoglicanos, laminina, fibronectina, y vitronectina, algunas isoformas de colágeno (tipo I, III y IV, al cual se une el factor de *Von Willebrand*). La glicoproteína Ib (GPIb, receptor tipo proteína cinasa) se encuentra únicamente en plaquetas (30).

La liberación de los factores contenidos en los gránulos alfa y gránulos densos que se encuentran en las plaquetas amplifican la respuesta plaquetaria secundaria, para así dar paso a la reparación tisular. En los gránulos alfa plaquetarios están contenidos tanto factores antiangiogénicos como proangiogénicos, sin embargo, estos factores serán liberados dependiendo del tipo de estímulo generado. La respuesta al estímulo por medio de los megacariocitos puede ser positiva o de inhibición según las condiciones del nicho vascular. La liberación de gránulos densos influye en el microambiente vascular, la liberación de iones calcio y magnesio promueve la activación y agregación plaquetaria; la liberación de nucleótidos ADP activa a las plaquetas mediante los receptores de P2Y1 y P2Y12, promoviendo la vasoconstricción; mientras que la liberación de gránulos densos que contienen tspan-29, tspan-30, tspan-24, tspan-9, tspan-32 para regular las interacciones de la superficie celular, ya que contienen proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP), lo cual genera la liberación de neurotransmisores como serotonina, epinefrina e histamina; dando lugar a la posibilidad de agregación y activación plaquetaria inducida por ADP (37).

Plaqueta en reposo

Plaqueta activada

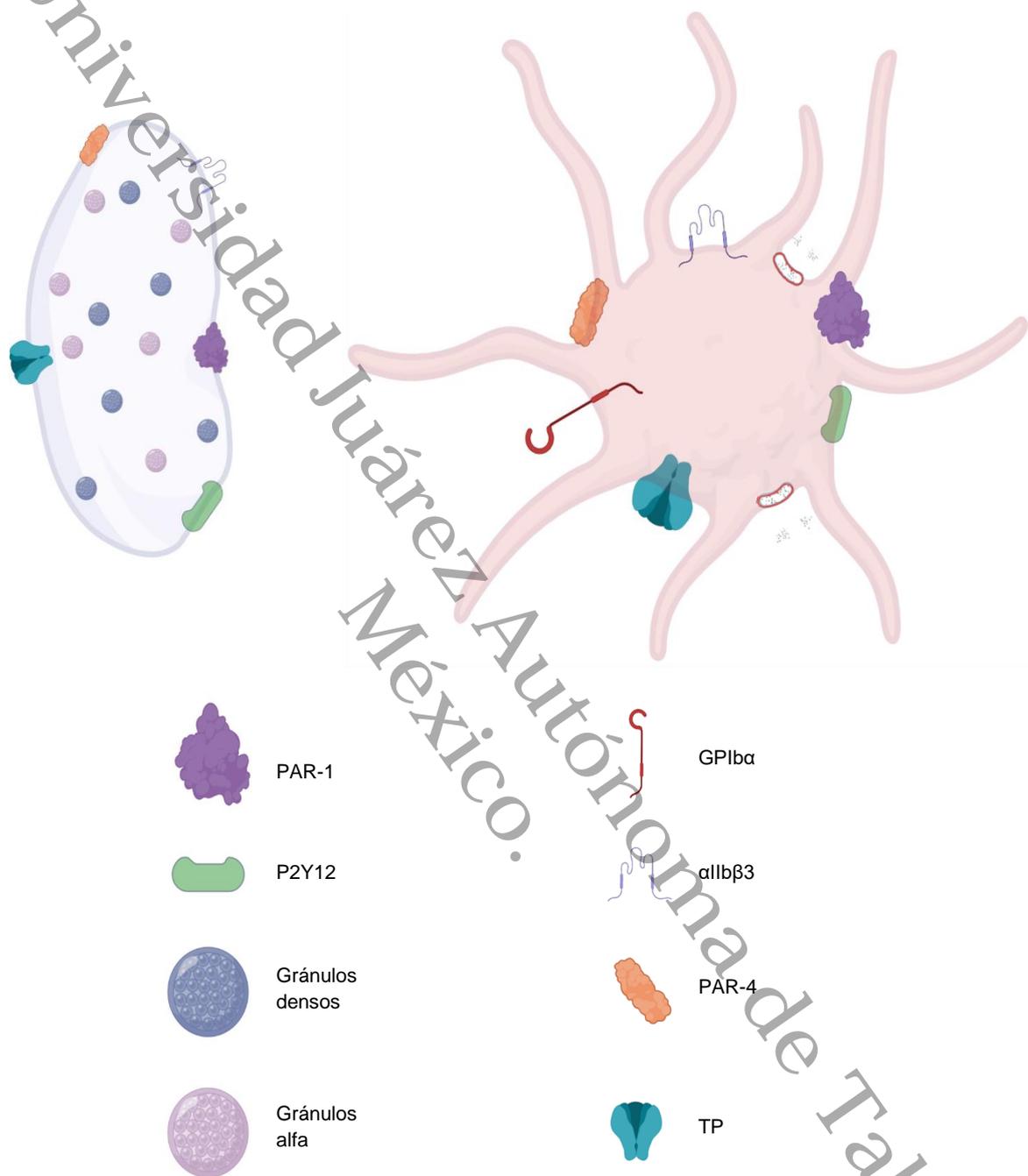


Figura 3. Estructura y conformación de una plaqueta en reposo versus una plaqueta activada. Existe cambio estructural, generando pseudópodos como resultado de la activación, además de liberación de los gránulos densos y gránulos alfa.

Las plaquetas en reposo mantienen sus receptores en la membrana celular, mientras que los gránulos alfa y gránulos densos permanecen en su interior; estas plaquetas mantienen una estructura ovoide. Por otro lado, las plaquetas activadas adquieren una morfología distinta, extendiendo pseudópodos, además de liberar los gránulos alfa y gránulos densos para iniciar la cascada de agregación plaquetaria [Figura 3].

Plaquetas y su asociación con cáncer

Las plaquetas están implicadas en importantes procesos fisiológicos durante la etapa embrionaria como la angiogénesis, proliferación e invasión celulares; sin embargo, si estos procesos ocurren después de la embriogénesis, son considerados procesos patológicos. En el cáncer la activación y agregación plaquetaria se encuentra alterada, debido a que liberan el contenido de sus gránulos alfa y gránulos densos, por su interacción con células tumorales. Esto ocurre posterior al contacto de células tumorales con los factores de coagulación derivados de plaquetas, produciendo trombina (serina proteasa perteneciente a la cascada de la coagulación, cuya función es la degradación de fibrinógeno y fibrina), la cual promueve la adhesión de las plaquetas a las células circulantes. La trombina y el tromboxano A₂ (TXA₂) promueven la agregación y activación plaquetaria al interactuar con receptores acoplados a proteína G que controlan el nivel de Ca²⁺ intracelular (P2Y₁ y P2Y₁₂), iniciando así la cascada de señalización de la agregación (38).

Debido a que las plaquetas son consideradas repositorios de ARN (ARNm, miARN, ARNc, lncARN) se han propuesto las biopsias líquidas como método diagnóstico y pronóstico de cáncer, en búsqueda de células circulantes tumorales (DNA/RNA/Proteínas de las células tumorales) y exosomas (39). Las exosomas son vesículas extracelulares de entre 30 a 150 nm de diámetro con un recubrimiento de bicapa lipídica, que viajan desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular y participa en distintos procesos, e incluso en tumores con la interacción del microambiente tumoral. Estas vesículas tienen capacidad de regulación de diversos procesos, tal como la modulación metabólica, vías de señalización, y a nivel tumoral se encargan de generar un ambiente propicio para la supervivencia de las células cancerígenas, desarrollando un microambiente tumoral complejo (40).

La continua interacción entre las células tumorales y las biomoléculas asociadas al tumor generan un tipo de alteración a nivel del ARN plaquetario, por tanto, estas reciben el nombre de plaquetas educadas por tumor. Las plaquetas pueden internalizar el ARNm, así como otras proteínas que pueden cambiar el procesamiento general de los ARNm induciendo variantes de *splicing* (corte y empalme) de pre-ARNm, pre-miARN, entre otros, estimulando además la activación plaquetaria, lo cual generaría una firma específica potencialmente diagnóstica de cáncer (41).

Las plaquetas contribuyen a la supervivencia de células tumorales circulantes, principalmente a través de la evasión del sistema inmune, debido a la adhesión de plaquetas en las células tumorales, así como formar un recubrimiento con agregados de fibrina, que funge como un escudo físico.

Otra forma de evasión del sistema inmune es mediante la transferencia de moléculas del Complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH I) de las plaquetas a las células circulantes tumorales, y de este modo evitan ser detectadas por los linfocitos NK (*natural killer*) (41).

Recientemente las plaquetas se han propuesto como vehículo terapéutico, a través de contribuciones de la nanomedicina. Se propone que las plaquetas reciban *in vitro* nanopartículas cargadas con fármacos anticancerígenos, para funcionar como camuflaje; posteriormente estas plaquetas con fármaco pueden ser administradas a los individuos mediante inyección en sangre periférica con la finalidad de generar un tratamiento dirigido hacia las células tumorales (favorecido por los mecanismos de las plaquetas educadas por tumor) mediante CAPIR (*Circulation, Accumulation, Penetration, Internalization, and Release*) (42).

ANTECEDENTES

MODELOS DE PLAQUETAS EDUCADAS POR TUMOR

Se han realizado diversos estudios en células de cáncer expuestas a plaquetas, demostrando que estas últimas sufren cambios derivados de esa interacción(43). Los resultados obtenidos de los modelos de plaquetas educadas por tumor demuestran una interacción directa entre las células cancerígenas y las plaquetas, modificando su morfología, su estructura e incluso su patrón de expresión génica, específicamente el patrón de microARN (44).

Estos modelos se realizan con plaquetas derivadas de donadores sanos, las cuales se obtienen mediante flebotomía (proceso de exanguinación) y se requiere la colaboración de donadores voluntarios sanos (7). Este proceso dificulta la obtención de plaquetas, debido a que el rendimiento es muy bajo; además se asocia con un incremento en el índice de variabilidad fenotípica proveniente de los donadores sanos, otra limitante es que las plaquetas de donadores sanos no pueden ser estudiadas después de 7-10 días de ser extraídas, debido a su tiempo de vida, además de la dificultad que representa la extracción de megacariocitos (45).

PRODUCCIÓN DE PLAQUETAS *IN VITRO*

La producción *in vitro* de plaquetas y de partículas tipo plaquetas es un proceso costoso y poco estandarizado, se ha experimentado con diversos materiales, líneas celulares y células primarias derivadas de cordón umbilical.

En 2006, Takuya Matsunga y colaboradores hicieron uso de células primarias derivadas de cordón umbilical caracterizadas como CD34+ mediante diferenciación con trombopoyetina (TPO), obteniendo la generación de partículas tipo plaquetas de 4 a 5 células por megacariocito diferenciado en 5 días, con un rendimiento de 0.8 plaquetas cada 24 horas por megacariocito (MK) (46). Sin embargo, en 2014 Sou Nakamura y colaboradores generaron plaquetas mediante diferenciación de tres

variantes de la línea celular imMKCLs en cultivo habitual, el resultado fue la obtención de 3-10 plaquetas por megacariocitos en 5 días, con rendimiento neto de 0.6-2 plaquetas cada 24 horas por MK (47). Surya Kotha y colaboradores generaron en 2018 un modelo *in vitro* de trombopoyesis de microvasculatura directa en un microambiente de médula ósea 3D, en el cual diferenciaron MK de células primarias derivadas de cordón umbilical, además de inducirlas con TPO. El resultado de este modelo fue un mayor número de plaquetas funcionales (CD41+) producidas por megacariocito, sin embargo, el costo de los materiales los hace poco accesibles. (48). En 2019, Keiichi Tozawa y colaboradores, diseñaron un biorreactor con una línea celular derivada de tejido adiposo mesenquimal mediante inducción por TPO, se obtuvo una cuenta de 5-10 plaquetas por megacariocito en un período de 12 días, con rendimiento neto de 0.41-0.83 plaquetas cada 24 horas por MK (49).

Células MEG-01

En 1985 el científico Michinori Ogura obtuvo y describió por primera vez la línea celular MEG-01; se trata de células inmortalizadas procedentes de un paciente masculino de 60 años, de origen japonés, con diagnóstico de leucemia megacarioblástica. Estas células fueron extraídas en 1983 mediante toma de muestra heparinizada de médula ósea, la cual fue positiva para el cromosoma *Philadelphia* en todos los cariotipos analizados. Cabe señalar que la muestra fue obtenida posterior al consentimiento del paciente, quien falleció en mayo de 2018 tras una falla hepatorenal. Esta línea celular se caracteriza principalmente por contener dos fracciones, una adherente (diferenciada, megacariocítica) y una en suspensión (no diferenciada, megacarioblástica) (50).

OTROS INDUCTORES DE TROMBOPOYESIS

Inhibidores de las histonas desacetilasas

Además de la trombopoyetina (TPO), se han descrito otros inductores de trombopoyesis, tal como los inhibidores de las desacetilasas de histonas. En el año

2000 se demostró que los inhibidores de las desacetilasas de histonas juegan un papel importante en el tratamiento de diversas enfermedades, principalmente en cáncer, pese a que se ha estudiado también en padecimientos inmunológicos y cardíacos; debido a que estas inhiben la proliferación y promueven la apoptosis mediante el arresto de la fase G1 del ciclo celular, reduciendo las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (51).

Actualmente existen múltiples terapias aprobadas con el uso de inhibidores de las desacetilasas de histonas para el tratamiento de cáncer de mama, próstata y ovario, en donde se muestran grandes avances respecto al empleo de fármacos nuevos o como reposicionamiento farmacológico, lo que en perspectiva podría mejorar el pronóstico de los pacientes con esta clase de tumores; hasta ahora algunos de los fármacos probados son Vorinostat y Belinostat (52) (53).

Ácido valproico

El ácido valproico (AVP) (ácido 2-propilpentanoico) es un ácido carboxílico y ácido graso de cadena corta, que inicialmente fue utilizado como anticonvulsivante en epilepsia (54), usado también en el síndrome de preeclampsia – eclampsia; así como en el trastorno de bipolaridad, y como fármaco profiláctico para la migraña. El mecanismo de acción del AVP se basa en ser bloqueador de los canales iónicos dependientes de voltaje de calcio, sodio y potasio (lo que provoca una reducción de la frecuencia de impulso neuronal) (55), además de inhibir la transaminación de ácido gama amino butírico (GABA) (56).

La estructura del AVP fue descubierta en 1886 y se define como ácido graso de cadena corta, inicialmente utilizado como solvente químico y farmacéutico, en 1963 se propone como fármaco anti epiléptico, sin embargo, en 1975 se realiza el primer ensayo clínico controlado, patentado como tratamiento antiepiléptico en 1983 (57).

En 2001 fue descrito por primera vez como inhibidor de las desacetilasas de histonas y hasta ahora ha sido probado en ensayos clínicos en fase I y II de cáncer de mama triple negativo, así como en ensayos en cáncer de pulmón (4).

El AVP se ha asociado con vías de señalización proapoptóticas en células de neuroblastoma, tal es el caso de la vía intrínseca de apoptosis (Bax, Bak, Bcl-2, Bim y Mcl-1) y la vía de *JAK/STAT* (SOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, STAT3, STAT5A y STAT5B). Por lo tanto, la eficacia de este ácido graso de cadena corta lo posiciona como un buen candidato para la terapia oncológica (58). En otros estudios el AVP fue propuesto como coadyuvante en quimioterapia del glioblastoma, con el fin de prevenir los efectos anti epilépticos generados por este tumor (59).

Hasta ahora no se ha descrito el mecanismo de acción del AVP para inducir la diferenciación y producción plaquetaria; sin embargo, hay dos hipótesis al respecto: La primera involucra al gen implicado en la migración celular MYH10, que al unirse a las HDAC1 y HDAC3 perpetúa la entrada a la fase S del ciclo celular. La segunda hipótesis propone que el efecto de VPA como inhibidor de las desacetilasas de histonas puede estar relacionado a la actividad del gen *NOTCH4*, favoreciendo la megacariopoyesis, por acetilación de proteínas del citoesqueleto como α -tubulin y cortactina (34).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los modelos de plaquetas educadas por tumor muestran el comportamiento de las plaquetas expuestas a células tumorales, además de que nos permiten estudiar los mecanismos moleculares y la interacción celular que ocurre en el desarrollo del cáncer, para establecer diagnósticos y pronósticos certeros con la implementación de tratamientos dirigidos. Actualmente estos estudios se realizan con plaquetas de donadores sanos obtenidas mediante flebotomía; sin embargo, este es un proceso invasivo y costoso que necesita la participación de personal capacitado para su realización. Por otro lado, es necesario un amplio número de donadores sanos para cada ensayo, lo cual conlleva a otra desventaja, la variabilidad fenotípica, debido a la diferencia entre donadores.

Se ha propuesto que una de las alternativas para disminuir estas desventajas (cantidad de plaquetas y variabilidad fenotípica) de las plaquetas obtenidas de donadores sanos, es generar plaquetas *in vitro*, mediante otros métodos. Algunos trabajos han propuesto el uso de biorreactores, modelos 3D para mimetizar la función de la médula ósea o mediante xenoinjertos. No obstante, la mayoría de estos modelos de producción de plaquetas se realizan con células obtenidas de cordón umbilical, por lo que se mantiene la variabilidad fenotípica; son protocolos poco accesibles debido a los costos elevados de los recursos materiales, que cuentan con un rendimiento plaquetario insuficiente.

Por ello, en este trabajo se propone la producción de plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01 inducidas por TPO y VPA como un modelo *in vitro* estandarizado que podrá ser útil para el estudio de plaquetas educadas por tumor, con la finalidad de encontrar alternativas en la obtención de plaquetas, eliminando además la variabilidad fenotípica y mejorando el rendimiento de plaquetas.

JUSTIFICACIÓN

Desarrollar modelos *in vitro* para la obtención de plaquetas que puedan ser utilizadas en el estudio de plaquetas educadas por tumores, sentará las bases para la generación de proyectos de investigación que describan los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la interacción entre las plaquetas y las células tumorales. Con este modelo se pretende mejorar el rendimiento en el número total de plaquetas funcionales mediante la inducción con trombopoyetina y ácido valproico, generando así un modelo estandarizado; además, de reducir con ello la variabilidad fenotípica de las plaquetas para su utilidad en el estudio de plaquetas educadas por tumor. Este proyecto favorecerá la generación de protocolos de investigación y trabajos de ciencia básica en modelos de plaquetas educadas por tumor, además de abrir la posibilidad a nuevas líneas de investigación que antes estaban limitadas por la falta de un buen método de obtención de plaquetas, la temporalidad del estudio o la variabilidad fenotípica. De la misma manera, permitirá abordar nuevos horizontes científicos basados en la producción *in vitro* de plaquetas y el estudio de estas células mediante producción plaquetaria continua con un menor costo, mediante el uso de los inductores trombopoyetina y ácido valproico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un método *in vitro* para la producción de plaquetas funcionales, a partir de la línea celular MEG-01 mediante inducción con trombopoyetina y ácido valproico

Objetivos específicos

- Determinar el número de partículas tipo plaquetas generadas por cada megacariocito en 3 condiciones experimentales: cultivo celular convencional, inducción con Ácido Valproico, inducción con Trombopoyetina.
- Evaluar la funcionalidad y el uso de las partículas tipo plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01, como modelo de plaquetas educadas por tumor.
- Determinar la inducción de troncalidad en la línea celular BxPC-3 después de la interacción con plaquetas derivadas de donador sano y plaquetas derivadas de MEG-01.

HIPÓTESIS

La producción de plaquetas funcionales en la línea celular MEG-01 inducida por Ácido Valproico y Trombopoyetina incrementará el rendimiento y reducirá la variabilidad fenotípica, lo cual permitirá la creación de un modelo estandarizado para el estudio de plaquetas educadas por tumor.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular de mantenimiento

Se utilizó la línea celular MEG-01 (ATCC, CRL-2021), megacarioblastos de origen humano derivados de paciente con Leucemia Mieloide Crónica (LMC), la cual se mantuvo en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (ThermoFisher, cat# 12633012); suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) (SIGMA-ALDRICH; St. Lois, MO, USA) al 10 %; en incubadora a 37 °C, con CO₂ del 5 %; se realizaron cambios de medio cada 72 a 96 horas.

Se utilizó la línea celular BxPC-3 (ATCC, CRL-1687), células epiteliales de origen humano derivadas de paciente con adenocarcinoma pancreático, la cual se mantuvo con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F12) (ATCC) adicionado con L-Glutamina; suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) (SIGMA-ALDRICH; St. Louis, MO, USA) al 10 %; en incubadora a 37 °C, con CO₂ del 5 %; se realizaron cambios de medio cada 72 a 96 horas.

Inducción de producción de plaquetas in vitro

Se conformaron 3 condiciones experimentales: MEG-01 control, MEG-01 VPA, MEG-01 TPO. Para cada condición se sembraron 5×10^5 células por pozo, en cajas de 6 pozos con área de superficie de 9.5 cm², bajo las siguientes condiciones:

- *Grupo Control MEG-01*: 2 mL de medio RPMI sin suero fetal bovino.
- *Grupo MEG-01 AVP*: 2 mL de medio RPMI sin suero fetal bovino más 4 mM de Ácido Valproico (VPA) (Sigma-Aldrich, cat# P4543).
- *Grupo MEG-01 TPO*: 2 mL de medio RPMI más 200 ng de Trombopoyetina (TPO) (Sigma-Aldrich, cat# SRP3178).

Posterior a las 72 h de incubación, el sobrenadante fue colectado para el conteo de partículas tipo plaquetas y un nuevo pulso de AVP o TPO fue agregado, hasta completar tres pulsos (72h, 144h, 216h).

Aislamiento y conteo de partículas tipo plaquetas

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento (tres pulsos), las cajas de 6 pozos fueron retiradas de la incubadora. El sobrenadante conteniendo los promegacarioblastos, megacariocitos y partículas tipo plaquetas fue colectado en tubos cónicos estériles de 50 mL, se lavaron los pozos en dos ocasiones con amortiguador HEPS (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 3.8mM HEPES, 5mM EGTA). Posteriormente, para separar las partículas tipo plaquetas, se centrifugó el sobrenadante a 100 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después, el sobrenadante fue transferido a otro tubo cónico estéril y centrifugado a 1000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener un botón celular correspondiente a las partículas tipo plaquetas que posteriormente se resuspendió en HEPS.

Para el conteo de las partículas tipo plaquetas se realizó una dilución 1:20, la cual se tiñó con colorante Azul de Cresilio Brillante al 10 % (Sigma-Aldrich, B5388), luego se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, se realizó el conteo de partículas tipo plaquetas en cámara de Neubauer. Este procedimiento fue realizado posterior a cada pulso de inducción en las tres condiciones experimentales (72h, 144h, 216h).

Ensayo de formación de trombo de plaquetas derivadas de MEG-01

Para evaluar la función y capacidad de agregación de las partículas tipo plaquetas se realizó ensayo de formación de coágulo. Se aislaron las partículas tipo plaquetas por condición (control y tratamientos) y las plaquetas obtenidas de donador (control del experimento) por el método previamente descrito. Se colectaron en tubos cónicos estériles de 15 mL y resuspendieron en 6 mL de PBS.

Para definir la concentración ideal de CaCl₂ para la formación del coágulo, se realizó una curva de concentración de CaCl₂, las concentraciones utilizadas fueron: 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM. De cada condición fue transferido 1 mL a microtubos de 1.5 mL con cada una de las concentraciones de CaCl₂ antes mencionadas, cada muestra fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente

y se evaluó la formación del coagulo. La concentración óptima de agregación en las muestras control y tratamiento fue a 50 mM.

Ensayos de caracterización de plaquetas CD41+ por citometría de flujo

Se caracterizaron las partículas tipo plaquetas CD41+ mediante citometría de flujo, marcando estas células por reacción antígeno-anticuerpo. Se sembraron 2.5×10^5 células MEG-01 en cajas de 6 pozos, por cada condición experimental: grupo control, grupo TPO y grupo VPA. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, las cajas de 6 pozos se retiraron de incubación, el sobrenadante fue colectado en tubos cónicos estériles de 15 mL y se realizaron 2 lavados con HEPS, posteriormente se centrifugaron a $1000 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente para formar un botón celular. Para caracterizar CD41 en muestras de donador sano, se obtuvo una muestra de sangre total en tubo con citrato de sodio mediante flebotomía. Se separó el plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación a $100 \times g$ durante 15 minutos a temperatura ambiente, del cual se extrajo únicamente la fracción plaquetaria (sobrenadante) mediante centrifugación del PRP a $1000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente formando un botón celular. Cada botón celular (Control donador sano, MEG-01 Control, MEG-01 TPO, MEG-01 VPA) se resuspendió en 500 μ L de HEPS con adición del anticuerpo primario de conejo anti- CD41 (abcam ab134131) a una concentración de 1:100, incubando durante 40 minutos a 4 °C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con HEPS, formando nuevamente un botón celular, el cual se resuspendió en 500 μ L de HEPS con adición del anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (abcam ab150077) a una concentración de 1:200, incubando a 4 °C durante 40 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo se realizaron dos lavados, se resuspendieron en 500 μ L de HEPS y se colocaron en tubos para citometría.

Para el control de donador sano sin marcar se realizó la extracción de la muestra y la separación de componentes mediante centrifugación, sin embargo, no se adicionó ningún anticuerpo. Para evaluar la especificidad del anticuerpo, se realizó un control de isotipo de donador sano, para el cual se obtuvo la muestra de plaquetas mediante centrifugación. Una vez obtenido el botón celular se agregó únicamente el anticuerpo

secundario. Las muestras utilizadas en el ensayo quedaron de la siguiente manera: Control donador sano sin marcar, Control Isotipo, Control donador sano marcado, MEG-01 Control, MEG-01 TPO, MEG-01 VPA. El análisis se realizó por citómetro de flujo (BD, FACS Canto II), con plantilla para caracterización plaquetaria.

Ensayo de co-cultivo para modelo de Plaquetas Educadas por Tumor (PET)

Para realizar los ensayos de co-cultivo celular para el modelo de plaquetas educadas por tumor; se sembraron 5×10^5 células BxPC-3 (ATCC BxPC-3, cáncer de páncreas), en cajas de 6 pozos, en las condiciones de mantenimiento previamente descritas. Posterior a 24 horas, se co-cultivaron en medio DMEM con plaquetas derivadas de MEG-01, calculadas a una proporción de 100 plaquetas por cada célula BxPC-3. Posterior a 72 horas de co-cultivo se separaron ambos grupos celulares y se extrajo RNA de las células BxPC-3, para determinar la interacción entre ambos grupos celulares. Se aisló ARN mediante método de metanol-cloroformo (Invitrogen, cat# 15596026) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, aumentando el tiempo de precipitación en isopropanol (24h a -20°C).

La concentración y calidad de las muestras fueron determinadas en un Nanodrop (ThermoFisherScientific). Se realizó la síntesis de cDNA con el kit *RT-PCRMaxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (ThermoFisherScientific, cat# K1641) según las indicaciones del fabricante. Las qPCR se realizaron con *Master Mix Sybr Select* (cat# 4472908), ThermoFisherScientific), analizadas en un equipo *QuantStudio 7* (cat# 4485701, ThermoFisherScientific), la tasa de cambio entre el gen de referencia y el gen de interés fue calculada por el método $\Delta\Delta\text{CT}$.

Los genes evaluados fueron NANOG, SOX-2 y OCT-4, que son indicadores de troncalidad celular.

Cuantificación de megacariocitos maduros

Para cuantificar el número de megacariocitos maduros (adheridos), se sembraron 1.5×10^5 células MEG-01 por pozo en cajas de 6 pozos, tratados como se describió

previamente. Posterior al tratamiento, las células fueron retiradas del incubador, el sobrenadante se descartó y los megacariocitos maduros se fijaron añadiendo 500 μ L de paraformaldehído al 4 % en cada pozo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la fijación, cada pozo se lavó con HEPS en dos ocasiones. Una vez lavados los pozos, se agregó 500 μ L de cristal violeta 0.5 % por pozo (10 minutos a temperatura ambiente). A continuación, se realizaron 2 lavados con HEPS, consecutivamente se destiñeron con ácido acético al 33 % con agitación leve (10 minutos a temperatura ambiente). Posterior a la incubación con ácido acético se leyó la absorbancia en un lector de placas a 595nm.

Analisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a través de la plataforma GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), mediante pruebas paramétricas, análisis ANOVA de dos vías. Cada análisis se realizó con triplicado biológico y duplicado técnico.

RESULTADOS

Cuantificación de partículas tipo plaquetas por condición

Se cuantificó el número de partículas tipo plaquetas (PTP) producidas por los megacariocitos en la condición de control y las diferentes condiciones utilizadas: inducción con Ácido Valproico (AVP) e inducción con Trombopoyetina (TPO), se realizaron en 3 pulsos de (72h, 144h, 216h) [Figura 4].

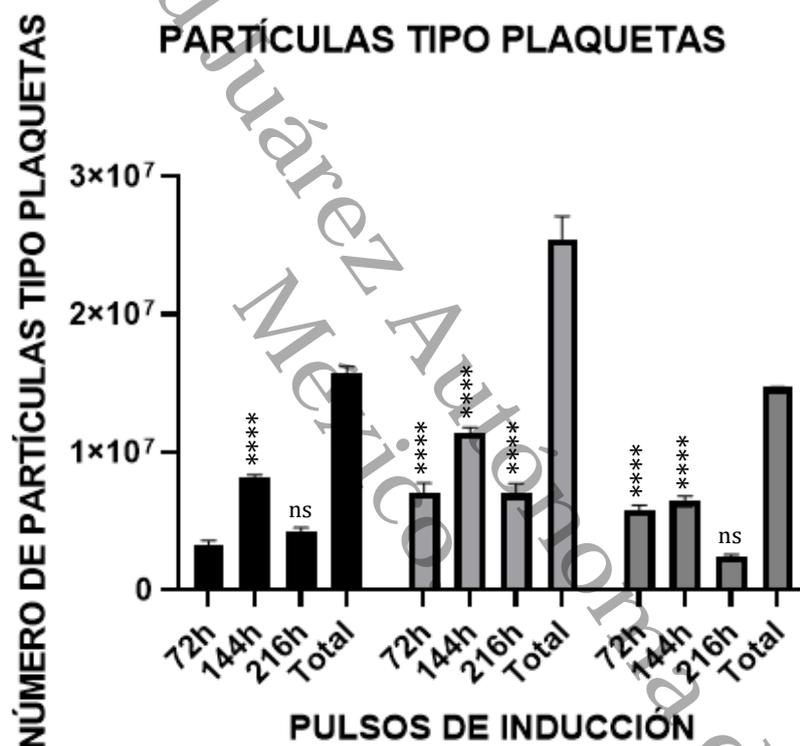


Figura 4. Número de partículas tipo plaquetas obtenidas después de cada pulso de inductor. Partículas tipo plaquetas provenientes de megacariocitos derivados de MEG-01. 72h: Primer pulso, 144h: Segundo pulso, 216h: Tercer pulso. Total: Sumatoria de PTP producidas posterior a los tres pulsos de inductor (216h). Posterior a cada pulso de inducción (1ro, 72h; 2do, 144h; 3ro, 216h), se cuantificó mediante cámara de Neubauer. (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ns: valor no significativo)

En el primer pulso de inducción hay un incremento importante de producción de PTP en ambas condiciones de tratamiento (AVP y TPO) respecto al control; luego, a las 144 horas observamos un incremento en la producción de PTP en las tres condiciones tratamiento, no obstante, la mayor producción de PTP fue inducida por TPO respecto al control. Al finalizar el tercer pulso a las 216 horas, la producción de PTP disminuyó considerablemente con respecto al pulso a las 144 horas en todas las condiciones, sin embargo, se mantuvo una diferencia significativa en la producción de PTP con el estímulo de TPO respecto al control. En condición AVP, posterior al tercer pulso (144h), existe decremento significativo de producción de PTP con respecto al Control (72h).

Cuantificación de partículas tipo plaquetas por cada megacariocito sembrado

Se cuantificó la cantidad promedio de PTP producidas por cada megacariocito sembrado, en condición TPO hubo incremento de la producción de PTP en los tres pulsos de inducción, en el primer pulso el rendimiento fue de 216 % con respecto al Control (46 PTP), en el segundo pulso de inducción su rendimiento fue de 153 % (76 PTP) con respecto a la misma condición en el primer pulso y 139 % con respecto a la condición control en el segundo pulso; manteniendo una tendencia a la baja en el tercer pulso de las 3 condiciones [Figura 5].

	Pulso de inductor		
	1er Pulso (72h) PTP (%)	2do Pulso (144h) PTP (%)	3er Pulso (216h) PTP (%)
Control	21.33 (100%) ****	54.55 (100%) ****	28.66 (100%) ns
TPO	46.99 (220.30%) ****	76.22 (139.72%) ****	46.55 (162.42%) ****
AVP	38.99 (182.79) ***	43.00 (78.82%) ****	16.10 (56.52%) ns

Figura 5. Promedio de partículas tipo plaquetas producidas por cada megacariocito sembrado. Cuantificación posterior a cada pulso de inducción (1ro, 72h; 2do, 144h; 3ro 216h), cantidad ajustada a cada megacariocito sembrado proveniente de MEG-01. (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ns: valor no significativo)

En condición AVP, el primer pulso tuvo rendimiento del 182 % (39 PTP) con respecto al Control, el segundo (43 PTP) y tercer pulso (16 PTP) no fueron significativos respecto al control. Sin embargo, en el grupo TPO hubo una tendencia a la alza con respecto al Control en los tres pulsos de inducción.

Megacariocitos maduros por condición

Se cuantificó la proporción de megacariocitos maduros obtenidos bajo cada pulso bajo cada condición, se encontró una mayor proporción de diferenciación en tratamiento con Trombopoyetina posterior al primer pulso. Se mantuvo un comportamiento similar de diferenciación en el primero y segundo pulso, no obstante, después del tercer pulso, la proporción de células diferenciadas fue similar entre ambos tratamientos. [Figura 6, demostrativo, muestra insuficiente (n=2)].

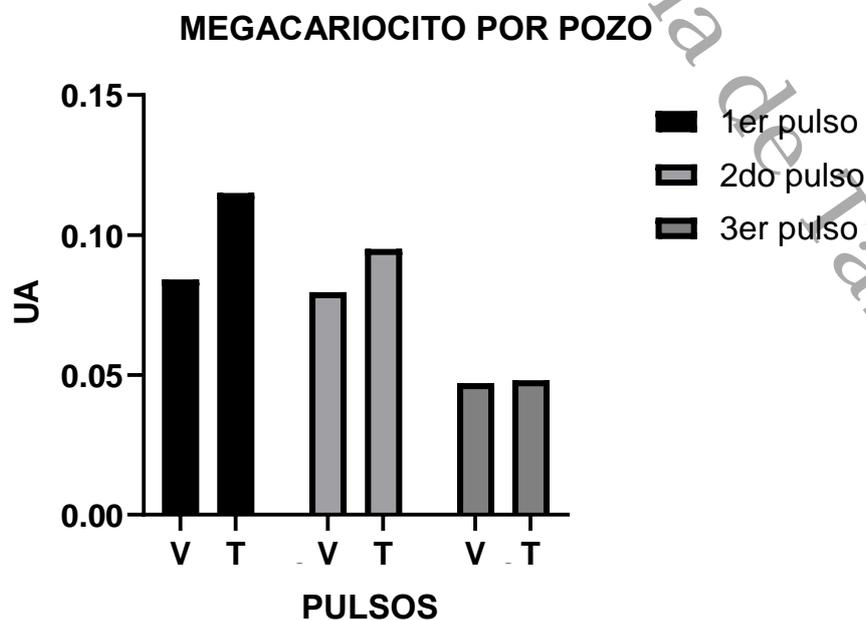


Figura 6. Cuantificación de megacariocitos maduros. V: AVP, T: TPO.

Cuantificación de megacariocitos en cada pozo, posterior a cada pulso de inducción (1ro, 72h; 2do, 144h; 3ro, 216h), mediante medición de absorbancia (UA: Unidades Arbitrarias).

Caracterización de células CD41+ mediante citometría de flujo

Se caracterizaron las células CD41+, previamente se ajusto la condición de tamaño y granularidad, como control del experimento se utilizaron plaquetas de donador sano. En la condición MEG-01 control, el 60 % de las PTP fueron CD41+; en condición TPO, el 63 % de estas PTP fueron CD41+, mientras que en la condición VPA, el 80 % de las PTP fueron CD41+, conservando granularidad y tamaño similar a las plaquetas Control. [Figura 7].

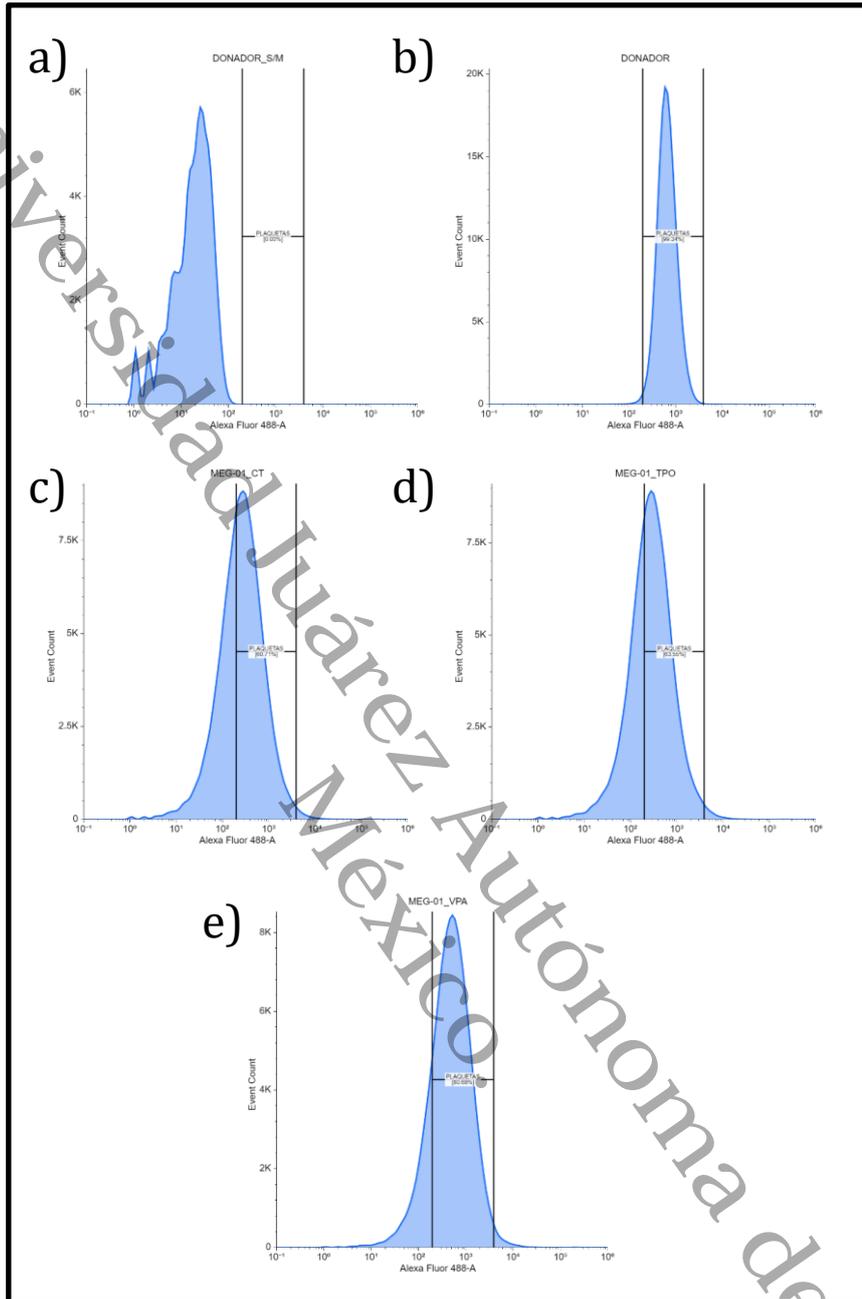


Figura 7. Caracterización de plaquetas CD41+ mediante citometría de flujo.

Posterior al tercer pulso de inducción, se marcaron las plaquetas obtenidas y se realizó el marcaje de CD41 con AlexaFluor488. **Panel a):** Donador sin marcar, fluorescencia basal. **Panel b):** plaquetas de donador marcadas con anti-CD41 (99.34 % plaquetas positivas). **Panel c):** plaquetas derivadas de MEG-01 (control de estímulo) marcadas con anti-CD41 (60.71 % partículas tipo plaquetas positivas). **Panel d):** plaquetas derivadas de MEG-01 tratadas con TPO marcadas con anti-CD41 (63.55 % partículas tipo plaquetas positivas). **Panel e):** plaquetas derivadas de MEG-

01 tratadas con VPA marcadas con anti-CD41 (80.68 % partículas tipo plaquetas positivas).

Pruebas de agregación de partículas tipo plaquetas

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad de las PTP, estas fueron tratadas con cloruro de calcio a 50 mM. El resultado de esta prueba evidenció, en el control y los tratamientos, la agregación de las partículas tipo plaquetas, con mayor densidad en las condiciones tratamiento respecto al control, sin embargo, en los tres casos hubo agregación. Por tanto, se demuestra que las partículas tipo plaquetas son plaquetas funcionales con capacidad de activarse y agregarse [Figura 8].

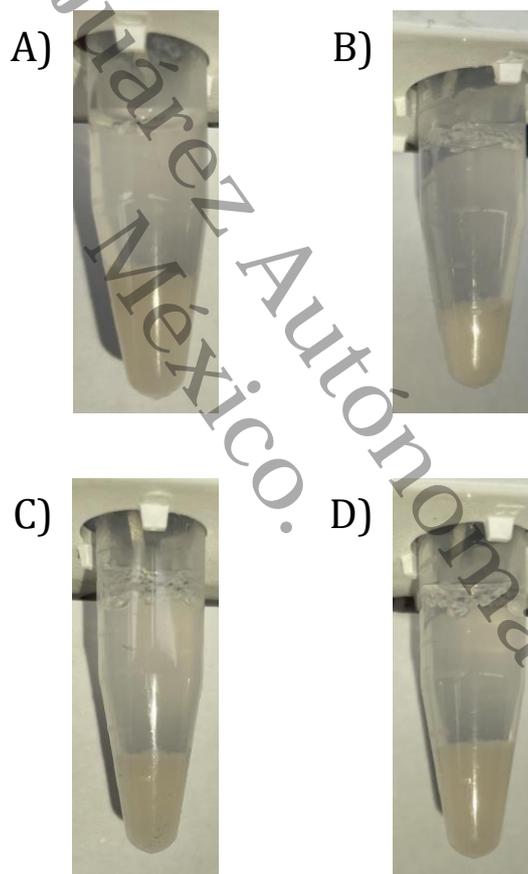


Figura 8. Pruebas de agregación mediante CaCl_2 . Se realizaron pruebas de formación de trombo mediante agregación de Cloruro de calcio [50mM]. **A)** Plaquetas obtenidas DONADOR; **B)** Plaquetas aisladas de MEG-01 CONTROL; **C)** Plaquetas aisladas de MEG-01 posterior a inducción con AVP; **D)** Plaquetas aisladas de MEG-01 posterior a inducción con TPO.

Análisis de troncalidad de células de cáncer de páncreas entrenadas por plaquetas

Se realizaron análisis de genes de troncalidad para establecer el modelo de plaquetas educadas por tumor. En el caso de la línea celular de páncreas (BxPC-3) en cocultivo con las plaquetas derivadas de donador, hubo un incremento en la tasa de cambio de la expresión génica (SOX2, NANOG, OCT4). En el caso de la línea celular de páncreas (BxPC-3) en cocultivo con las plaquetas derivadas de MEG-01 hubo un incremento en la expresión de los genes de troncalidad, comportamiento similar al que sucedió con plaquetas derivadas de donador. Sin embargo, al comparar los resultados de la exposición a las plaquetas de donador *versus* exposición a las plaquetas de MEG-01, no existió cambios en el patrón de expresión, ni hubo significancia estadística al analizarlos. Demostrando que las plaquetas de MEG-01 pueden ser usadas en un modelo de plaquetas educadas por tumor al ser indistinguibles con respecto a las plaquetas de donador [Figura 9].

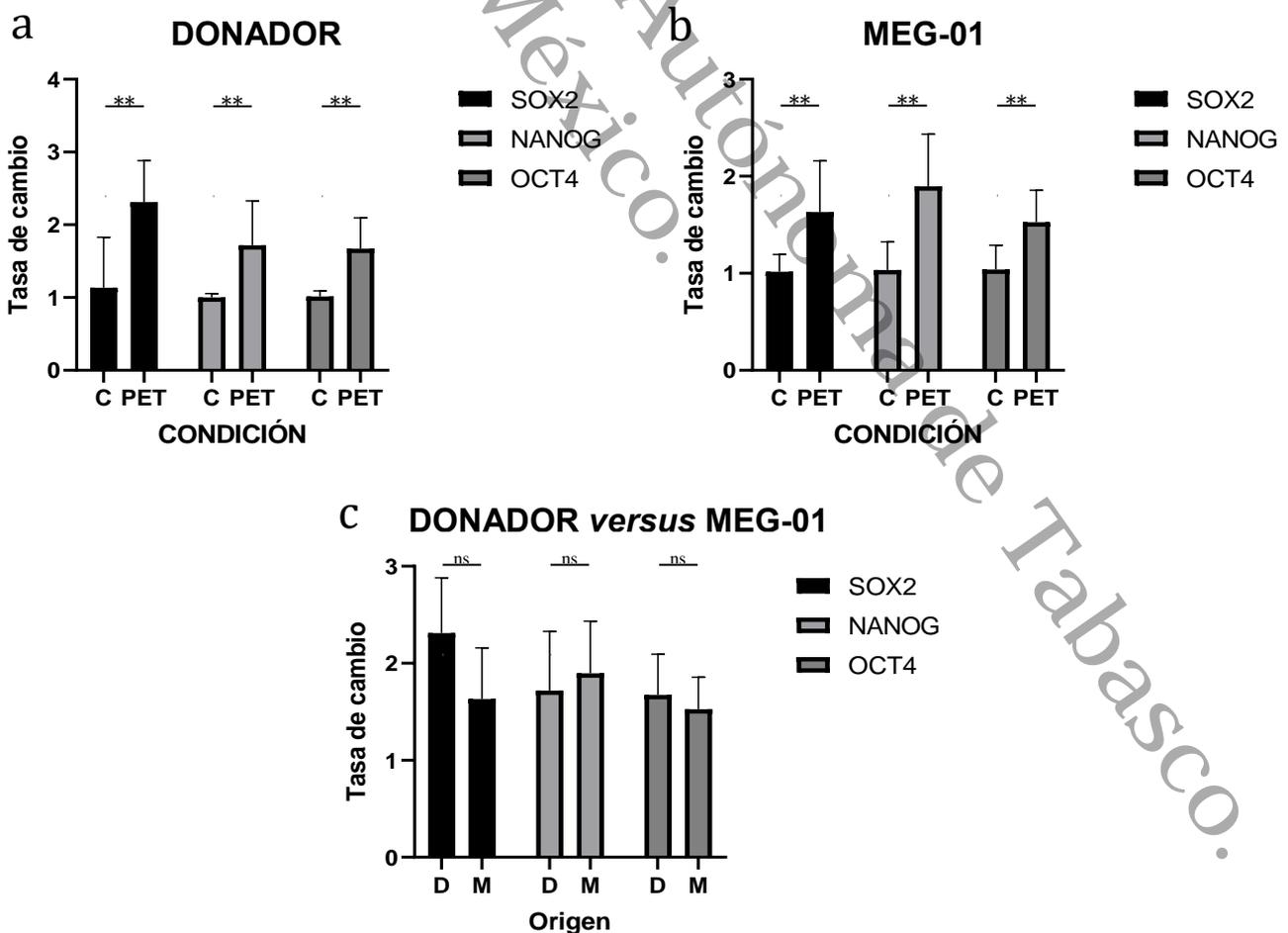


Figura 9. Genes de troncalidad. Células BxPC-3 expuestas a plaquetas. **Panel a):** células de cáncer en cocultivo con plaquetas de donador, control (C) *versus* plaquetas educadas por tumor (PET). **Panel b):** células de cáncer en cocultivo con plaquetas derivadas de línea celular MEG-01, Control (C) *versus* plaquetas educadas por tumor (PET). **Panel c):** Comparación entre células expuestas a plaquetas derivadas de donador (D) *versus* plaquetas derivadas de MEG-01 (M). (** = $p < 0.005$; ns = valor no significativo)

DISCUSIÓN

Las plaquetas son células fundamentales a nivel inmunológico y hemostático, y su estudio representa un área de oportunidad en la investigación básica, principalmente por su asociación con el cáncer, tal es el caso de las plaquetas educadas por tumor. Sin embargo, la obtención de plaquetas derivadas de donadores sanos es complicada; pese a ser un proceso poco invasivo, presenta riesgos y requiere personal calificado para la toma de muestra por flebotomía. Por otra parte, puede presentarse variabilidad fenotípica, generando dificultades en la estandarización de las técnicas y generando sesgos en su estudio; por tanto, este trabajo aborda la búsqueda de alternativas viables para la producción de plaquetas *in vitro* (derivadas de la línea celular MEG-01) producidas por medio de inductores con un método estandarizado.

Hasta ahora, la producción de plaquetas en modelos *in vitro* posee limitaciones metodológicas debido al uso de materiales complejos y costosos, además de la obtención de un número limitado de partículas tipo plaquetas (PTP) en comparación con métodos convencionales de obtención de plaquetas (flebotomía). Matsunga y colaboradores reportaron trombopoyesis *in vitro* en células CD34+ de cordón umbilical, inducidas por TPO con rendimiento de 4-5 PTP por cada megacariocito (MK) en 5 días; posteriormente, Yukako Ono y colaboradores indujeron trombopoyesis mediante fibroblastos p45NF-E2/Maf en un modelo murino, obteniendo 5-10 plaquetas por MK en 3 horas (60); Sou Nakamura y colaboradores, tras ensayos de con hueso xenogénico porcino *ex vivo*, reportaron un rendimiento neto de 0.6-2 plaquetas cada 24 horas por cada MK (47), sin embargo, este experimento implica costos elevados para producción mínima de plaquetas (61).

Como innovación técnica, Fujiyama y colaboradores indujeron trombopoyesis con xenoinjerto a médula ósea de porcino *in vivo*, obteniendo 2-5 plaquetas por MK en 3 horas; esta técnica implica recursos humanos y personal especializado, además de materiales costosos, lo cual dificulta el proceso de producción. Otro método complejo fue propuesto por Yunitaka Ito y colaboradores, reportando una producción cercana a 70 plaquetas por MK con uso de un biorreactor con movimiento de 300 mm/s, sin

embargo, estas plaquetas corren riesgo de activación por turbulencia y de este modo el rendimiento de las plaquetas por MK no es efectivo (62), además de no ser viable debido al alto costo que representan los recursos materiales necesarios para su producción y mantenimiento, siendo así una herramienta poco factible para la producción de plaquetas *in vitro*. En contraste con los antecedentes de producción plaquetaria *in vitro*, los resultados de este proyecto muestran una inducción efectiva mediante TPO y VPA, con un método de inducción por pulsos (72h, 144h, 216h). Ambos inductores fueron capaces de generar PTP, con el AVP se obtuvo un rendimiento similar en el primer y segundo pulso, mientras que en el segundo pulso de inducción con TPO se obtuvo un mayor rendimiento de PTP con respecto al control de MEG-01, siendo este último el mejor candidato para inducción de trombopoyesis *in vitro*, con un rendimiento de hasta el 200% con respecto al control.

Debido a las diferencias de rendimiento entre los métodos previamente descritos y el propuesto actualmente, los resultados de este proyecto representan una alternativa accesible, sin necesitar de un procedimiento invasivo y con bajo costo de producción, además de no requerir de algún equipo especializado para los procesos quirúrgicos, ni el empleo de especímenes para ensayos *in vivo*, en el caso de TPO se obtuvo un rendimiento de hasta 80 PTP por MK, dando como resultado más de 26 PTP por MK sembrado, cada 24 horas durante 3 días. Por otro lado, en condición VPA hubo rendimiento de >40 PTP por MK, lo cual representa más de 13 PTP por MK sembrado cada 24 horas durante 3 días.

Aunado a la producción de PTP, los megacariocitos inducidos con AVP o TPO mantienen un comportamiento similar a lo largo de los pulsos de inducción; posterior al primer pulso de inducción se presentó un mayor número de MK maduros, mientras que posterior al segundo pulso de inductor se encontró decremento mínimo en AVP y TPO; al transcurrir el tercer pulso de inductor, la proporción de MK maduros disminuyó abruptamente, lo cual corresponde al agotamiento por producción de PTP (endomitosis).

Para demostrar la funcionalidad de estas PTP, se han realizado pruebas de agregación, mientras que para su caracterización se realizó reconocimiento de antígenos de superficie (CD41+). En 2018 Kotha y colaboradores desarrollaron un

modelo de microambiente de médula ósea para trombopoyesis *in vitro* con células de cordón umbilical inducidas por TPO, como resultado de este modelo se obtuvieron PTP CD41+, similares a las plaquetas. En los resultados presentados en este proyecto se demuestra que las PTP obtenidas mantienen la expresión de CD41, similar a las plaquetas obtenidas de un donador sano; en condiciones de MEG-01 control y tratamiento con TPO se obtuvo como resultado alrededor del 60% PTP CD41+; mientras que en condición tratamiento con AVP se obtuvo 80% de PTP que fueron CD41+, siendo esta última la inducción más efectiva, lo cual demuestra que pese a que existe menor producción de PTP en condición AVP, hasta el 80% de estas PTP son plaquetas. Aunado a este resultado, se realizaron pruebas funcionales de coágulo, evidenciando que las PTP tienen la capacidad de activación y agregación similar a las plaquetas controles (donador sano, MEG-01). Las plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01 poseen marcadores de superficies propios de plaquetas, así como funciones características de estas células, lo cual abre la posibilidad de generalizar su producción y además ser usadas en ensayos experimentales.

La falta de un método estandarizado de producción de plaquetas permite proponer la aplicación y el uso de las plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01 al ser áreas poco exploradas, además de que Díaz-Blancas y colaboradores han sugerido que el comportamiento de las plaquetas derivadas de MEG-01 es similar a plaquetas derivadas de donador sano (7). Partiendo de ello, se estableció un modelo de plaquetas educadas por tumor; de este modo, se realizaron pruebas para analizar la expresión de genes asociados a troncalidad (NANOG, SOX2, OCT4), y como resultado encontramos un patrón reportado previamente, caracterizado por un incremento en la expresión génica troncal de las células de cáncer utilizando plaquetas aisladas de donador sano obtenidas mediante flebotomía. Sin embargo, con este modelo se demuestra la capacidad de las plaquetas obtenidas de la línea celular MEG-01, para incitar la misma respuesta de genes de troncalidad en las células de cáncer de páncreas. Asimismo, al analizar los resultados de proporción troncal en células BXPC-3 posterior a la exposición con plaquetas derivadas de donador sano y plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01, presentaron el mismo patrón, además de no existir diferencias significativas entre ellas, abriendo camino a la propuesta de la utilización de plaquetas derivadas de MEG-01 para estandarizar

los procesos de obtención de plaquetas y de esta manera eliminar la variabilidad fenotípica en un modelo de plaquetas educadas por tumor.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CONCLUSIÓN

Este proyecto cumple con el objetivo planteado, el cual se basa en crear una estrategia de producción de plaquetas *in vitro* para implementar un modelo de plaquetas educadas por tumor. Mediante los inductores de trombopoyesis probados en este proyecto (AVP y TPO) se ha demostrado un incremento en la producción de plaquetas funcionales derivadas de MEG-01, con características semejantes a las obtenidas de muestras de donador. Esto permitió desarrollar un modelo de plaquetas educadas por tumor que podrían ser útiles para el estudio de los mecanismos moleculares, interacciones celulares y la respuesta de las células tumorales a la exposición con plaquetas; eliminando la variabilidad fenotípica y las limitantes metodológicas al extraer plaquetas de un donador sano. Este modelo es asequible dado que los recursos materiales, humanos y consumibles son pocos en comparación con otros modelos de producción *in vitro* de plaquetas.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

-Entrenamiento de líneas celulares de otros tipos de cáncer (mama, hígado, cérvix) con plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01 inducidas mediante AVP y TPO para ampliar la utilidad del modelo de plaquetas educadas por tumor.

-Inducción de exosomas en las plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01 para su empleo en el cierre de heridas de modelos *in vivo*

-Secuenciación y caracterización de microARN de los exosomas de plaquetas derivadas de la línea celular MEG-01

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

GLOSARIO

ANGIOGÉNESIS: Formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos sanguíneos preexistentes

BLANCO TERAPÉUTICO: Sitio de acción del tratamiento

CÁNCER: Entidad etiopatogénica compleja, proceso maligno de proliferación celular anormal

CÉLULA TRONCAL: Célula capaz de dividirse indefinidamente y que posee la capacidad de dar origen a distintos linajes celulares

DESDIFERENCIACION: Involución del fenotipo celular a un estado anterior indiferenciado

EPIGENÉTICA: Estudio de las modificaciones genéticas que afectan la expresión o represión génica sin modificar la secuencia de DNA

EXOSOMAS: Vesículas extracelulares liberadas por células eucariotas, pueden contener material genético

HEMATOPOYESIS: Proceso de diferenciación de las células sanguíneas

LÍNEA CELULAR: Población celular mutada, las cuales proliferan indefinidamente

MESÉNQUIMA: Porción orgánica funcional, tejido primitivo mesodérmico

MICROBIOMA: Microorganismos como virus, hongos y bacterias presentes en un entorno específico

NEOPLASIA: Crecimiento celular anormal y descontrolado, pueden ser benignas o malignas

POLIPLOIDIA: Más de un par de copias de juegos de cromosomas

PRONÓSTICO: Probabilidad de recuperación, recaída o subsecuencia de la enfermedad

PRUEBAS CLÍNICAS: Estudios clínicos en fase experimental con seres humanos

SOBREVIDA: Probabilidad de sobrevivir hasta un determinado tiempo posterior a la enfermedad

TRANSDIFERENCIACION: Metaplasia o el cambio morfológico a nivel tisular debido al cambio de un fenotipo celular a otro

VASCULOGÉNESIS: Formación de vasos sanguíneos partiendo de células progenitoras

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ogura M, Morishima Y, Okumura M, Hotta T, Takamoto S, Ohno R, et al. Functional and morphological differentiation induction of a human megakaryoblastic leukemia cell line (MEG-01s) by phorbol diesters. *Blood*. el 1 de julio de 1988;72(1):49–60.
2. Takeuchi K, Ogura M, Saito H, Satoh M, Takeuchi M. Production of platelet-like particles by a human megakaryoblastic leukemia cell line (MEG-01). *Exp Cell Res*. marzo de 1991;193(1):223–6.
3. Takeuchi K, Satoh M, Kuno H, Yoshida T, Kondo H, Takeuchi M. Platelet-like particle formation in the human megakaryoblastic leukaemia cell lines, MEG-01 and MEG-01s: Platelet-like Particle Formation in MEG-01. *Br J Haematol*. febrero de 1998;100(2):436–44.
4. Bartels M, Govers A, Polak R, Vervoort S, van Boxtel R, Pals C, et al. Megakaryocyte lineage development is controlled by modulation of protein acetylation. Bertolini F, editor. *PLOS ONE*. el 26 de abril de 2018;13(4):e0196400.
5. Vulcano F, Ciccarelli C, Mattia G, Marampon F, Macioce G, Milazzo L, et al. HDAC inhibition is associated to valproic acid induction of early megakaryocytic markers. *Exp Cell Res*. mayo de 2006;312(9):1590–7.
6. Hitchcock IS, Hafer M, Sangkhae V, Tucker JA. The thrombopoietin receptor: revisiting the master regulator of platelet production. *Platelets*. el 18 de agosto de 2021;32(6):770–8.
7. Díaz-Blancas JY, Dominguez-Rosado I, Chan-Nuñez C, Melendez-Zajgla J, Maldonado V. Pancreatic Cancer Cells Induce MicroRNA Deregulation in Platelets. *Int J Mol Sci*. el 28 de septiembre de 2022;23(19):11438.
8. Swain N, Thakur M, Pathak J, Swain B. SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020;24(2):368.

9. Irfan Maqsood M, Matin MM, Bahrami AR, Ghasroldasht MM. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment: Immortality of cell lines. *Cell Biol Int.* octubre de 2013;37(10):1038–45.
10. Merten OW. Introduction to animal cell culture technology—past, present and future. *Cytotechnology.* marzo de 2006;50(1–3):1.
11. Beskow LM. Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* el 31 de agosto de 2016;17(1):395–417.
12. Servant G, Deininger PL. Insertion of Retrotransposons at Chromosome Ends: Adaptive Response to Chromosome Maintenance. *Front Genet [Internet].* el 5 de enero de 2016.
13. Pache B, Jacot-Guillarmod M, Hübner M, Mathevet P. Papillomavirus humain : dépistage des cancers du col et de l'anus. *Rev Médicale Suisse.* 2022;18(800):1950–5.
14. Larsson SC, Carter P, Kar S, Vithayathil M, Mason AM, Michaëlsson K, et al. Smoking, alcohol consumption, and cancer: A mendelian randomisation study in UK Biobank and international genetic consortia participants. Tsilidis KK, editor. *PLOS Med.* el 23 de julio de 2020;17(7):e1003178.
15. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* enero de 2000;100(1):57–70.
16. Senga SS, Grose RP. Hallmarks of cancer—the new testament. *Open Biol.* enero de 2021;11(1):200358.
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* marzo de 2011;144(5):646–74.
18. Robinson M, Gilbert SF, Waters JA, Lujano-Olazaba O, Lara J, Alexander LJ, et al. Characterization of SOX2, OCT4 and NANOG in Ovarian Cancer Tumor-Initiating Cells. *Cancers.* el 12 de enero de 2021;13(2):262.
19. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* el 1 de enero de 2022;12(1):31–46.

20. Sonugür FG, Akbulut H. The Role of Tumor Microenvironment in Genomic Instability of Malignant Tumors. *Front Genet.* el 29 de octubre de 2019;10:1063.
21. Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer.* mayo de 2020;20(5):285–98.
22. Benova A, Tencerova M. Obesity-Induced Changes in Bone Marrow Homeostasis. *Front Endocrinol.* el 12 de mayo de 2020;11:294.
23. Mazzi S, Lordier L, Debili N, Raslova H, Vainchenker W. Megakaryocyte and polyploidization. *Exp Hematol.* enero de 2018;57:1–13.
24. Poirault-Chassac S, Nivet-Antoine V, Houvert A, Kauskot A, Lauret E, Lai-Kuen R, et al. Mitochondrial dynamics and reactive oxygen species initiate thrombopoiesis from mature megakaryocytes. *Blood Adv.* el 23 de marzo de 2021;5(6):1706–18.
25. Spivak JL, Moliterno AR. The Thrombopoietin Receptor, MPL, Is a Therapeutic Target of Opportunity in the MPN. *Front Oncol.* el 10 de marzo de 2021;11:641613.
26. Lundgren S, Keränen M, Wartiovaara-Kautto U, Myllymäki M. Somatic compensation of inherited bone marrow failure. *Semin Hematol.* julio de 2022;59(3):167–73.
27. Cunin P, Nigrovic PA. Megakaryocytes as immune cells. *J Leukoc Biol.* junio de 2019;105(6):1111–21.
28. Dhenge A, Kuhikar R, Kale V, Limaye L. Regulation of differentiation of MEG01 to megakaryocytes and platelet-like particles by Valproic acid through Notch3 mediated actin polymerization. *Platelets.* el 18 de agosto de 2019;30(6):780–95.
29. Lorthongpanich C, Jiamvoraphong N, Supraditaporn K, Klaihmon P, U-pratya Y, Issaragrisil S. The Hippo pathway regulates human megakaryocytic differentiation. *Thromb Haemost.* 2017;117(01):116–26.

30. Zhan H, Kaushansky K. Megakaryocytes as the Regulator of the Hematopoietic Vascular Niche. *Front Oncol.* el 22 de junio de 2022;12:912060.
31. Eaton N, Boyd EK, Biswas R, Lee-Sundlov MM, Dlugi TA, Ramsey HE, et al. Endocytosis of the thrombopoietin receptor Mpl regulates megakaryocyte and erythroid maturation in mice. *Front Oncol.* el 30 de agosto de 2022;12:959806.
32. Español I, Pujol-Moix N. Trombopoyetina: de su descubrimiento a sus perspectivas clínicas. *Med Clínica.* enero de 2000;114(13):511–6.
33. Matsuoka Y, Takahashi M, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, et al. CD34 Antigen and the MPL Receptor Expression Defines a Novel Class of Human Cord Blood-Derived Primitive Hematopoietic Stem Cells. *Cell Transplant.* junio de 2017;26(6):1043–58.
34. Noetzli LJ, French SL, Machlus KR. New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* julio de 2019;39(7):1288–300.
35. Plantureux L, Crescence L, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Effects of platelets on cancer progression. *Thromb Res.* abril de 2018;164:S40–7.
36. Heemskerk JWM, West J. Emerging Technologies for Understanding Platelet Diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mayo de 2022;42(5):540–52.
37. Menter DG, Kopetz S, Hawk E, Sood AK, Loree JM, Gresele P, et al. Platelet “first responders” in wound response, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* junio de 2017;36(2):199–213.
38. Wang L, Wang X, Guo E, Mao X, Miao S. Emerging roles of platelets in cancer biology and their potential as therapeutic targets. *Front Oncol.* el 22 de julio de 2022;12:939089.
39. Chen M, Hou L, Hu L, Tan C, Wang X, Bao P, et al. Platelet detection as a new liquid biopsy tool for human cancers. *Front Oncol.* el 14 de septiembre de 2022;12:983724.

40. Allegra A, Cancemi G, Mirabile G, Tonacci A, Musolino C, Gangemi S. Circulating Tumour Cells, Cell Free DNA and Tumour-Educated Platelets as Reliable Prognostic and Management Biomarkers for the Liquid Biopsy in Multiple Myeloma. *Cancers*. el 26 de agosto de 2022;14(17):4136.
41. Antunes-Ferreira M, Koppers-Lalic D, Würdinger T. Circulating platelets as liquid biopsy sources for cancer detection. *Mol Oncol*. junio de 2021;15(6):1727–43.
42. Li X, Hu L, Tan C, Wang X, Ran Q, Chen L, et al. Platelet-promoting drug delivery efficiency for inhibition of tumor growth, metastasis, and recurrence. *Front Oncol*. el 6 de octubre de 2022;12:983874.
43. Wei J, Meng X, Wei X, Zhu K, Du L, Wang H. Down-regulated lncRNA ROR in tumor-educated platelets as a liquid-biopsy biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. el 15 de septiembre de 2022.
44. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*. noviembre de 2015;28(5):666–76.
45. Varkey J, Nicolaidis T. Tumor-Educated Platelets: A Review of Current and Potential Applications in Solid Tumors. *Cureus* [Internet]. el 1 de noviembre de 2021 [citado el 25 de junio de 2023]; Disponible en: <https://www.cureus.com/articles/64969-tumor-educated-platelets-a-review-of-current-and-potential-applications-in-solid-tumors>
46. Matsunaga T, Tanaka I, Kobune M, Kawano Y, Tanaka M, Kuribayashi K, et al. Ex Vivo Large-Scale Generation of Human Platelets from Cord Blood CD34⁺ Cells. *STEM CELLS*. diciembre de 2006;24(12):2877–87.
47. Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, et al. Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. abril de 2014;14(4):535–48.

48. Kotha S, Sun S, Adams A, Hayes B, Phong KT, Nagao R, et al. Microvasculature-directed thrombopoiesis in a 3D in vitro marrow microenvironment. Asakura A, editor. PLOS ONE. el 4 de abril de 2018;13(4):e0195082.
49. Tozawa K, Ono-Uruga Y, Yazawa M, Mori T, Murata M, Okamoto S, et al. Megakaryocytes and platelets from a novel human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell line. Blood. el 14 de febrero de 2019;133(7):633–43.
50. Ogura M, Morishima Y, Ohno R, Kato Y, Hirabayashi N, Nagura H, et al. Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG- 01, with positive Philadelphia chromosome. Blood. el 1 de diciembre de 1985;66(6):1384–92.
51. Pramanik SD, Kumar Halder A, Mukherjee U, Kumar D, Dey YN, R M. Potential of histone deacetylase inhibitors in the control and regulation of prostate, breast and ovarian cancer. Front Chem. el 12 de agosto de 2022;10:948217.
52. Alseksek RK, Ramadan WS, Saleh E, El-Awady R. The Role of HDACs in the Response of Cancer Cells to Cellular Stress and the Potential for Therapeutic Intervention. Int J Mol Sci. el 24 de julio de 2022;23(15):8141.
53. Maccallini C, Ammazalorso A, De Filippis B, Fantacuzzi M, Giampietro L, Amoroso R. HDAC Inhibitors for the Therapy of Triple Negative Breast Cancer. Pharmaceuticals. el 26 de mayo de 2022;15(6):667.
54. Pascali JP, Giorgetti A, Barone R, Pelletti G, Fais P. Valproic acid determination by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC–MS/MS) in whole blood for forensic purposes. Drug Test Anal. el 2 de septiembre de 2022;dta.3362.
55. Johnston JP, Nerenberg SF. Valproic Acid-Induced Thrombocytopenia-Related Spontaneous Systemic Bleeding. Am J Case Rep [Internet]. el 30 de diciembre de 2020.
56. Santos DS, Rocha MA, Mello MLS. Epigenetic studies in insects and the valproic acid perspective. Braz J Biol. 2024;84:e256045.

57. Woolley B, Mills J. Versatile Valproic Acid. *Issues Ment Health Nurs.* el 22 de septiembre de 2022;1–3.
58. Sanaei M, Kavooosi F. The effect of valproic acid on intrinsic, extrinsic, and JAK/STAT pathways in neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *Res Pharm Sci.* 2022;17(4):392.
59. Yagi C, Tatsuoka J, Sano E, Hanashima Y, Ozawa Y, Yoshimura S, et al. Anti-tumor effects of anti-epileptic drugs in malignant glioma cells. *Oncol Rep.* el 21 de octubre de 2022;48(6):216.
60. Ono Y, Wang Y, Suzuki H, Okamoto S, Ikeda Y, Murata M, et al. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf. *Blood.* el 1 de noviembre de 2012;120(18):3812–21.
61. Fujiyama S, Hori N, Sato T, Enosawa S, Murata M, Kobayashi E. Development of an ex vivo xenogeneic bone environment producing human platelet-like cells. Bertolini F, editor. *PLOS ONE.* el 7 de abril de 2020;15(4):e0230507.
62. Ito Y, Nakamura S, Sugimoto N, Shigemori T, Kato Y, Ohno M, et al. Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. *Cell.* julio de 2018;174(3):636-648.e18.

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hematopoyesis.....	22
Figura 2. Trombopoyesis.....	24
Figura 3. Estructura y conformación de una plaqueta en reposo <i>versus</i> una plaqueta activada.....	28
Figura 4. Número de partículas tipo plaquetas obtenidas después de cada pulso de inductor.....	43
Figura 5. Promedio de partículas tipo plaquetas producidas por cada megacariocito sembrado.....	44
Figura 6. Cuantificación de megacariocitos maduros.....	45
Figura 7. Caracterización de plaquetas CD41+ mediante citometría de flujo ...	47
Figura 8. Pruebas de agregación mediante CaCl ₂	48
Figura 9. Genes de troncalidad.....	50