

## TRABAJO DE FIN DE GRADO

## Grado en Biomedicina

## ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA FRENTE A LÍNEAS TUMORALES Y SUS IMPLICACIONES

Autor: Federico Etchechury Amicone

### **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todos los miembros del grupo de investigación "Inmunobiología plaquetaria" por su gran apoyo y guía durante la realización de mi Trabajo de Fin de Grado.

Quiero agradecer al Dr. Antonio Garrido Tarrío, tutor interno de mi TFG, por la asesoría y dedicación mostrados. De igual manera, agradezco profundamente a la Dra. Guadalupe Ortiz Muñoz, por dedicar su valioso tiempo en educarme y aconsejarme personalmente. Asimismo, también quiero expresar mi gratitud por la actitud y amabilidad de las investigadoras predoctorales Alicia Álvarez Álvarez y María Fernández Fernández, ya que han resaltado por su disponibilidad y por el esfuerzo realizado, educándome y aconsejándome durante el desarrollo de este proyecto y mis practicas externas. Su experiencia previa y pasión por esta área de conocimiento permitieron y contribuyeron a que este proyecto sea lo que es hoy en día. Por último, también deseo agradecer a todos los miembros del departamento de bioquímica de la UAM e IIBM, así como al personal del servicio de citometría, por su paciencia y amabilidad, ya que convirtieron mi entorno de trabajo en un lugar cómodo para la realización de este TFG.

Muchas gracias por su apoyo, ejemplo y por haber hecho posible este trabajo.

Título del Trabajo:

## "ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA FRENTE A LÍNEAS TUMORALES Y SUS IMPLICACIONES"

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Sols-Morreale, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, "**Grupo de Investigación Inmunobiologia Plaquetaria**".

Tutor/es: Guadalupe Ortiz Muñoz y Antonio Garrido Tarrío

#### RESUMEN

El microambiente tumoral es un entorno dinámico compuesto por células inmunitarias, fibroblastos y plaquetas al cual están expuestas las células tumorales, la interacción entre estos componentes es clave en mecanismos de progresión y evasión tumoral. Este trabajo evalúa la interacción entre las plaquetas y las células tumorales, así como el papel de las plaquetas como reguladores inmunes dentro del microambiente tumoral, enfocándose en la activación plaquetaria y sus implicaciones dentro de estos contextos. Se analizo la activación plaquetaria inducida por distintas líneas tumorales (CarB, Panc02, Eo771, Mc38 y Py8119), donde se encontró que CarB y Panc02 indujeron una activación significativa. Dicha activación resulto ser contacto dependiente y potenciada por la trombina. En adición, se corroboro in vivo que las plaquetas pre-educadas por tumor son mas reactivas frente a agonistas clásicos. Asimismo, este trabajo también estudio el rol inmunomodulador de las plaquetas. Se observo que las plaquetas promovieron la diferenciación de neutrófilos murinos a células supresoras derivadas de mieloides, favoreciendo un microambiente tumoral inmunosupresor. Además, las plaquetas también mostraron capacidad para inducir la NETosis de neutrófilos murinos. Por último, se identificó una tendencia a la expresión de PD-L1 en células tumorales Mc38 tras su coincubación con plaquetas. Estos hallazgos refuerzan el papel clave de las plaquetas en la progresión tumoral y promueven un microambiente tumoral inmunosupresor, además de ser capaces de inducir mecanismos de evasión inmunológica a través de la expresión de PD-L1.

# 1 Índice

1 Índice5
2 Introducción
3 Objetivos
4 Materiales y métodos
4.1 Protocolo de aislamiento de plaquetas
4.2 Protocolo de aislamiento de neutrófilos inmaduros a partir de medula ósea11
4.3 Ensayo de activación plaquetaria
4.4 Ensayo de diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides por citometría de
flujo12
4.5 Ensayo de inducción de NETosis en neutrófilos inmaduros por inmunofluorescencia. 13
4.6 Análisis estadístico14
5 Resultados
6 Discusión
7 Conclusión
8 Bibliografía
Anexos

### 2 Introducción

El crecimiento y propagación de las células tumorales está condicionado por el ambiente que las rodea. El microambiente tumoral (*Tumor microenvironment*-TME, por sus siglas en inglés) es el entorno al cual las células tumorales están expuestas, y es generado gradualmente a partir de las interacciones entre las células tumorales y no tumorales. Está compuesto por componentes tanto celulares como no celulares tales como moléculas de señalización y la matriz extracelular (MEC) (1,2). El TME controla la progresión tumoral de forma dinámica y ocasionalmente pro-tumoral a través de los componentes no tumorales del TME o mediante la comunicación intercelular usando una red de moléculas señalizadoras (citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento) y enzimas remodeladoras de la MEC (3). Entre los componentes celulares más relevantes del TME se encuentran los fibroblastos asociados al cáncer (*Cancer associated fibroblasts*-CAF, por sus siglas en inglés) y células inmunes provenientes de los linajes hematopoyéticos linfoide y mieloide.

Los CAF son uno de los componentes del TME en tumores sólidos y su presencia ha sido asociada con una peor prognosis. Debido a su heterogeneidad funcional, los CAF están involucrados en varios de los mecanismos relacionados con la progresión y diseminación tumoral, tales como el depósito y remodelación de la MEC, proliferación celular, angiogénesis y comunicación con las células del sistema inmunitario (2,4). Algunos estudios sugieren que su función pro-tumoral está mediada por la liberación de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento transformante beta (*Transforming growth factor beta*-TGF-β, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor-EGF, por sus siglas en inglés) y factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor*-FGF, por sus siglas en inglés). Estos estimulan la proliferación celular y contribuyen a la remodelación de la MEC a través de la producción de colágeno, fibronectina y metaloproteinasas (*Matrix metalloproteinases*-MMPs, por sus siglas en inglés) facilitando la invasión tumoral (4).

Las células inmunitarias provenientes del linaje linfoide tales como los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, T reguladores, linfocitos B y células *natural killer* también son componentes esenciales dentro del fenotipo inmunitario del TME (5). Dentro del contexto de una respuesta antitumoral fisiológica, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos se encargan de reconocer y eliminar las células tumorales. Esta actividad está respaldada por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *helper* 1. Los linfocitos T reguladores se han visto ligados a un TME inmunosupresor dado que liberan interleucinas supresoras de actividad (IL-10 y TFG-β) sobre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, inhibiendo el

reconocimiento y eliminación de las células tumorales (3,6). En ocasiones, el TME adquiere un fenotipo inmunosupresor, inhibiendo la actividad antitumoral fisiológica a través de mecanismos tales como el reclutamiento de células inmunitarias supresoras de actividad antitumoral, la promoción de rutas de señalización supresoras de la actividad antitumoral en las células inmunitarias y/o alterando el sistema de presentación de antígenos (7).

Conforme el tumor progresa, las células derivadas del linaje mieloide expuestas al tumor o TME adyacente adquieren de forma gradual un fenotipo inmunosupresor, pasando a denominarse células supresoras derivadas del linaje mieloide (*Myeloid-derived suppressor cells-MDSC*, por sus siglas en inglés). Las MDSC se subdividen en monocíticas (Mo-MDSC) y granulocíticas (Gr-MDSC) dependiendo de su estadio anterior como monocitos o neutrófilos, respectivamente. Las MDSC tienen potentes capacidades inhibitorias y juegan un rol importante en la progresión tumoral, angiogénesis y supresión de la actividad antitumoral de linfocitos T, contribuyendo al desarrollo de un TME inmunosupresor (8).

En una etapa temprana del desarrollo tumoral, las células dendríticas procesan los antígenos tumorales (Neoantígenos) y los exponen a los linfocitos T en los órganos linfoides. Los linfocitos que tengan la capacidad de reconocer dichos antígenos proliferan y migran al tumor, donde liberan factores quimioatrayentes para reclutar otros componentes del sistema inmunitario como los neutrófilos y los monocitos (6). Las primeras generaciones de neutrófilos que migran al tumor llevan a cabo una función antitumoral fisiológica. No obstante, la exposición prolongada de los neutrófilos a los diferentes componentes del TME induce un cambio fenotípico y los diferencia a Gr-MDSC (9). Estudios recientes apuntan a que los Gr-MDSC tienen la capacidad de disminuir la proliferación de linfocitos T, contribuyendo a la capacidad inmunosupresora del TME (10). Por otro lado, las Mo-MDSC se generan tras la exposición de monocitos a componentes del TME tales como quimiocinas y citoquinas. Los Mo-MDSC están relacionados con la proliferación e invasión tumoral, la metástasis y la regulación de la respuesta inmune antitumoral (11).

Asimismo, además de inducir diferenciación fenotípica de los neutrófilos, se ha demostrado que las plaquetas activadas son capaces de inducir la NETosis, un tipo de muerte celular donde los neutrófilos liberan trampas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil extracellular traps*-NET, por sus siglas en inglés). Estas estructuras están compuestas por filamentos de cromatina descondensada, elastasa de neutrófilos, catepsina G, mieloperoxidasa, metaloproteinasa de matriz 9 e histonas. Dentro del contexto del TME, las NETs tienen una función

inmunosupresora que favorece la progresión tumoral. Mas específicamente, las NETs inducen exhaustación y disfunción de linfocitos CD8<sup>+</sup> al actuar como una barrera física que impide el contacto directo entre las células tumorales y los linfocitos CD8<sup>+</sup>, impidiendo el reconocimiento y eliminación de las células tumorales. Además, las NET también son capaces de regular la diferenciación linfocítica a fenotipos inmunosupresores, como Th2 y Treg, contribuyendo así a la evasión inmune (12).

Aunque clásicamente las plaquetas han sido asociadas a funciones relacionadas exclusivamente con la hemostasia, no suelen incluirse frecuentemente en los esquemas tradicionales del TME. No obstante, su presencia en este contexto es real y su papel potencialmente relevante. Siendo el segundo tipo celular más abundante en la sangre, después de los eritrocitos, la relevancia de las plaquetas no debería ser pasada por alto ya que desempeñan un papel significativo tanto en el cáncer como en otros contextos inmunológicos. Las plaquetas también son un componente del TME y participan en un bucle de retroalimentación positivo entre ellas mismas y las células tumorales contribuyendo al desarrollo, crecimiento, supervivencia y metástasis tumoral (13). Un elevado número de plaquetas circulantes (Trombocitosis) se ha descrito en varios tipos de cáncer, correlacionándose negativamente el número de plaquetas circulantes y la esperanza de vida del paciente (14). Las células tumorales tienen la capacidad de producir moléculas inductoras de activación plaquetaria ya sea por mecanismos dependientes o independientes de contacto célula tumoral-plaqueta (13,14). Una vez activas, las plaquetas son capaces de influenciar el crecimiento y diseminación tumoral a través de su interacción con varios componentes de la TME.

A su vez, las plaquetas activas llevan a cabo varios mecanismos que promueven el desarrollo tumoral y metástasis tales como: protección contra el reconocimiento inmune mediante agregados plaquetarios que rodean a las células tumorales circulantes evitando así el reconocimiento de la célula tumoral por el sistema inmune, incremento en la capacidad de adhesión de las células tumorales al endotelio vascular, síntesis de productos lipídicos y liberación de sustancias mediadoras a partir de exosomas, micropartículas o gránulos α (15,16). Por último, se ha observado que las plaquetas activadas tienen la capacidad de expresar el ligando 1 de muerte programada (*Programmed death-ligand 1-PD-L1*, por sus siglas en inglés) en su superficie o inducir su expresión en la superficie de las células tumorales ováricas. Uno de los principales medios de acción de PD-L1 depende de su reconocimiento por la proteína de muerte celular programada 1 (*Programmed cell death protein 1-PD-1*, por sus siglas en inglés) en los linfocitos T, lo que inhibe su activación y favorece la evasión del sistema inmunológico

por parte del tumor (17).

Las plaquetas, a través de la desgranulación de sustancias mediadoras son capaces de reclutar y activar los CAF (18). Específicamente, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet derived growth factor-PDGF, por sus siglas en inglés) liberado por las plaquetas permite el reclutamiento de macrófagos al tumor donde estos liberan mediadores que inducen el desarrollo de fibroblastos reactivos (19). Por otro lado, otro de los mecanismos a partir del cual las plaquetas regulan la respuesta inmunitaria es a través del contacto directo con las células inmunitarias o la liberación de mediadores solubles. La liberación de estos mediadores regula la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, induciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias y por ende contribuyendo al estadio pro-inflamatorio del TME (20). En cuanto a la asociación entre las plaquetas y los Mo-MDSC, algunos estudios han descrito que su activación induce la síntesis y liberación de citoquinas asociadas al crecimiento y supervivencia celular. Factores liberados por micropartículas o exosomas plaquetarios tienen la capacidad de inducir la generación de Mo-MDSC, ya sea teniendo un efecto inhibidor sobre la activación del inflamosoma NLRP3 o a través de la liberación de mediadores inflamatorios y quimiocinas (16,21). La interacción entre los Gr-MDSC y las plaquetas dentro del TME contribuye a la progresión tumoral a través de la angiogénesis y la señalización con las células tumorales. También se ha visto que la señalización derivada de las plaquetas tiene la capacidad de estimular el reclutamiento de granulocitos a nichos metastásicos tempranos (22). Por último, los mediadores liberados por las plaquetas pueden llegar a incrementar la mielopoiesis, reclutamiento y proliferación de los granulocitos y la función inmunosupresora de Gr-MDSC (8,23). Algunos grupos de investigación han descrito que, dentro del contexto del cáncer de mama, el potenciamiento de la capacidad inmunosupresora de las MDSC ocurre a nivel transcripcional y es dependiente de las plaquetas activadas y de los factores solubles liberados por las mismas (24).

En resumen, las plaquetas activadas desempeñan un papel crucial en la progresión tumoral, promoviendo un microambiente tumoral inmunosupresor e induciendo mecanismos de evasión inmunológica a través de la expresión de PD-L1. Sin embargo, esta población celular sigue siendo subestimada en el contexto del cáncer.

La hipótesis actual del laboratorio de inmunobiología plaquetaria del Instituto de Investigaciones Biomédicas Sols-Morreale plantea que las células tumorales tienen la capacidad de activar las plaquetas. La hipótesis propuesta establece que la activación

plaquetaria promueve la transición de células mieloides, tales como monocitos y neutrófilos, hacia un fenotipo inmunosupresor y por ende contribuyendo a la progresión tumoral.

Por ello, al regular la activación plaquetaria, se podría influir en el cambio fenotípico de las células mieloides y alterar la progresión tumoral al evitar la inhibición por parte de estas de la respuesta antitumoral de las células T. Esta hipótesis en un futuro será probada *in vivo* mediante el uso de tratamientos antiplaquetarios. No obstante, antes será necesario seleccionar una línea celular tumoral murina adecuada para los estudios *in vivo*. Para ello, el objetivo principal de este trabajo será evaluar la activación plaquetaria *in vitro* de líneas células tumorales murinas para seleccionar la óptima para visualizarla in vivo en experimentos futuros.

## 3 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el impacto de diferentes líneas tumorales sobre la activación plaquetaria, con el fin de identificar una línea tumoral candidata para futuros estudios in vivo. La activación plaquetaria se determinará a través de la expresión del marcador CD62P (P-selectina), analizado por citometría de flujo. Para ello, se co-incubarán distintas líneas celulares tumorales con plaquetas en diferentes ratios tumor-plaquetas y tiempos de exposición, evaluando así el nivel de activación plaquetaria inducido por cada línea celular. Además, paralelamente se estudiará el efecto de las plaquetas activadas sobre el cambio fenotípico de células mieloides, la inducción de la NETosis en neutrófilos y la expresión de PD-L1 en células tumorales con el propósito de complementar y respaldar los resultados obtenidos en estudios in vivo. Los datos generados se analizarán mediante citometría de flujo, centrándose en la expresión del marcador CD62P como indicador de activación plaquetaria. En el caso de células mieloides supresoras, se analizarán los marcadores Ly6G, Ly6C y Arg-1 (Marcador especifico de MDSC). Para los ensayos de expresión de PD-L1, se utilizará el marcador PD-L1. Finalmente, la formación de NETs se evaluará mediante microscopia de fluorescencia utilizando como marcadores DAPI, Cit-H3 y MPO. Los objetivos específicos son:

- 1. Determinar la capacidad de las líneas celulares tumorales murinas de inducir la activación plaquetaria.
- 2. Analizar la implicación de las plaquetas en la inducción de cambio fenotípico de células supresoras de actividad antitumoral.
- 3. Evaluar la capacidad de las plaquetas activadas de inducir la expresión de PD-L1

en células tumorales.

4. Evaluar la capacidad de las plaquetas activadas de inducir NETosis.

## 4 Materiales y métodos

### 4.1 Protocolo de aislamiento de plaquetas

Como primer paso, se recoge la sangre total de un ratón vía punción cardiaca con una jeringa llena con 100  $\mu$ L de dextrosa de citrato ácido (ACD) para prevenir la coagulación. Una vez extraída, se añade la mezcla en un tubo de 15 mL con 1 ml de buffer PIPES (NaCl 0,15M, PIPES 20mM). Posteriormente, la sangre se centrifuga a 630 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente sin acelerador ni freno. Tras ello, se extrae cuidadosamente el plasma rico en plaquetas (*platelet rich plasma*-PRP, por sus siglas en inglés) y se transfiere a un tubo de 1,5 mL con 5  $\mu$ L de Apirasa para prevenir la activación plaquetaria. Se centrifuga el tubo de 1,5 mL a 720 g durante 7 minutos a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 500  $\mu$ L de buffer Tyrodes inhibidor (500  $\mu$ L buffer Tyrodes + 10  $\mu$ L/ml Heparina + 5  $\mu$ L/ml Apirasa). Durante la totalidad del procedimiento se debe procurar manipular la muestra suavemente y no exponerla a temperaturas bajas para evitar la activación plaquetaria.

# 4.2 Protocolo de aislamiento de neutrófilos inmaduros a partir de medula ósea

En primer lugar, se extraen la tibia y el fémur del ratón y se colocan en una placa Petri con PBS 1X. Se eliminan los restos orgánicos exteriores utilizando papel absorbente y los huesos se transfieren a un tubo de 50 mL con un filtro de 100 um. Se extrae la medula ósea cortando los extremos de los huesos y lavándolos con una jeringa cargada con PBS 1X, depositando el contenido sobre el filtro de 100 um. Se aíslan las células disgregando la medula ósea a través del filtro de 100 um. La suspensión se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y se añade al tubo de 50 mL 4 ml de solución salina 0,2% para lisar los eritrocitos. Luego, se añaden al tubo de 50 mL 10 ml de solución salina 1,2% para estabilizar la osmolaridad. Una vez estabilizado, el tubo de 50 mL se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 6 ml de PBS 1X. En otro tubo de 15 mL, se añaden 6 ml de Percoll. Posteriormente, se vierten los 6 ml del tubo de 50 mL con células suspendidas en PBS 1X sobre

el Percoll. Se centrifuga el tubo de 15 mL a 2500 rpm durante 30 minutos sin acelerador ni freno a temperatura ambiente para formar un gradiente. Se descarta el sobrenadante dejando los 3 ml finales en el tubo de 15 mL. Se extrae 1 ml del fondo del tubo de 15 mL y se traspasa a un tubo de 1,5 mL. Se centrifuga el tubo de 1,5 mL a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descarga el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 ml de buffer Tyrodes para su posterior uso.

### 4.3 Ensayo de activación plaquetaria

Se utilizan 100.000 células tumorales, preparándose bajo diferentes condiciones experimentales según la relación de plaquetas y la presencia o ausencia de trombina. En primer lugar, las plaquetas se incuban con las células tumorales durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añade trombina a las condiciones correspondientes y se deja incubar por otros 30 minutos adicionales a temperatura ambiente. Luego, se tiñen las muestras añadiendo 10 μL de una mezcla de anticuerpos compuesta por CD41-APC-A (1:400), CD62P-PE-A (1:400) y *Fc blocker* (1:200) diluida en buffer Tyrodes. Se dejan incubar las condiciones con la mezcla de anticuerpos durante 30 minutos y se fijan utilizando 100 μL de buffer de fijación 2X. Tras 2 minutos, se centrifugan las muestras y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 200 μL de buffer Tyrodes y se traspasan las condiciones a tubos de citometría. Por último, las condiciones experimentales se analizaron usando el equipo de citometría de flujo FACS CANTO II en las primeras 24 horas desde la fijación. Este procedimiento se realizó con todas las líneas tumorales incluidas en el experimento. En el caso del protocolo de expresión de PD-L1, la mezcla de anticuerpos también incluyo PD-L1-PE-Cy7 (1:400).

# 4.4 Ensayo de diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides por citometría de flujo

Se utilizan 250.000 células precursoras de neutrófilos por tubo de 1,5 mL, preparándose bajo diferentes condiciones experimentales según la relación de plaquetas, la presencia o ausencia de trombina y la preactivación plaquetaria. Una porción de las plaquetas extraídas se coincuban con trombina durante 30 minutos para preactivarlas. Luego, se centrifugan a 720g durante 5 minutos y se resuspenden en buffer Tyrodes. Los neutrófilos se incuban con las plaquetas *overnight* a 37°C. Posteriormente, se tiñen las muestras añadiendo 10 μL de una mezcla de anticuerpos compuesta por CD41-APC (1:400), Ly6C-Percp-Cy5.5 (1:400), Ly6G-

APC-Cy7 (1:400) y *Fc blocker* (1:200) diluida en buffer Tyrodes. Se dejan incubar las condiciones con la mezcla de anticuerpos durante 30 minutos y se fijan utilizando buffer de fijación 2X durante 5 minutos. Se centrifugan a 720g por 5 minutos y se resuspenden en buffer Tyrodes. Posteriormente, se tiñen las muestras añadiendo 10 μL de una mezcla de anticuerpos compuesta por Arg-1-PE (1:400) diluida en buffer Tyrodes durante 30 minutos. Por último, se centrifugan las muestras a 720g durante 5 minutos y se resuspenden en 200 μL de buffer Tyrodes. Las condiciones experimentales se analizaron con el equipo de citometría de flujo FACS CANTO II en las primeras 24 horas desde la fijación.

# 4.5 Ensayo de inducción de NETosis en neutrófilos inmaduros por inmunofluorescencia.

Tras realizar los protocolos de aislamiento de plaquetas y neutrófilos inmaduros. Se utilizarán los neutrófilos provenientes de ratones wild-type sin tumor, mientras que las plaquetas provendrán de ratones wild-type con y sin tumor dependiendo de la condición. Los neutrófilos de resuspenden en medio RPMI. En primer lugar, vamos a delimitar un área circular en un portaobjetos tratado utilizando un marcador hidrofóbico. Se utilizan 50.000 neutrófilos por condición. Además, se realiza una condición con solo neutrófilos como control negativo y neutrófilos con Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) a 100 nM como control positivo. Se colocan los neutrófilos sobre el portaobjetos, dentro del área delimitada por el marcador hidrofóbico. Las condiciones se colocan dentro de un contenedor para evitar evaporación, y se dejan incubar durante 3 horas a 37°C dentro de un incubador. Tras ello, se elimina el líquido con papel absorbente y se fija con 100 µL de PBS 1X 4% PFA por condición, dejándolo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se elimina con papel absorbente y se lava con PBS 1X. Tras ello, se quita el PBS 1X con papel absorbente y se bloquean los sitios de unión inespecíficos utilizando 100 µL de blocking buffer (PBS 1X 3% BSA) por condición. Se dejan las condiciones en el blocking buffer durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se elimina el blocking buffer con papel absorbente y se añaden 50 µL por condición de una mezcla de anticuerpos primarios constituida por MPO (1:100) y Cit-H3 (1:200) diluidos en blocking buffer. Tras ello, se deja incubar overnight a 4°C dentro de una cámara húmeda. Al siguiente día, se elimina el líquido con papel absorbente y se lava con PBS 1X. Tras ello, se añaden 100 µL por condición de una mezcla de anticuerpos secundarios compuesta por Anti-goat-AlexaFluor-546 (1:1000; Rojo) y Anti-rabbit-AlexaFluor-488 (1:1000; Verde) diluidos en blocking buffer. Dejar incubar en oscuridad durante 1 hora dentro de una cama húmeda.

Eliminar el anticuerpo secundario con papel absorbente y lavar con PBS 1X. Añadir 100 μL por condición de DAPI diluido 1:100 en *blocking buffer* y dejar 5 minutos. Realizar otro lavado con PBS 1X, luego eliminarlo con papel absorbente. Añadir 7 μL de ProLong en el centro del área delimitada por el marcador hidrofóbico y colocar un cubreobjetos asegurándose que no queden burbujas. Finalmente, dejar a 4°C hasta que se pueda visualizar. La condición utilizada como control negativo solo se incuba con anticuerpos secundarios y DAPI.

### 4.6 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico, los datos obtenidos en los distintos grupos experimentales fueron organizados y revisados para asegurar su calidad. En primer lugar, se aplicó la prueba de Q de Dixon sobre los resultados para detectar y eliminar los valores atípicos. A partir de esto, se calcularon las medias y desviaciones estándar utilizando Microsoft Excel o GraphPad Prism 8.0. Una vez hecho esto, se aplicó el F *test* para comparar las varianzas entre los grupos comparados. En el caso de que el p valor resultante del F *test* haya resultado < 0.05, se asumió que la varianza entre los resultados era significativa y por ende se utilizó el t-test con corrección de Welch para comparar los grupos. En caso contrario, se utilizó un t-test estándar no pareado. En algunos experimentos, se calcularon los valores del *fold change* utilizando el control correspondiente. Los resultados se mostraron como media ± desviación estándar (DE), media ± error estándar de la media (SEM) o *fold change* ± desviación estándar (DE) según correspondiera.

### 5 Resultados

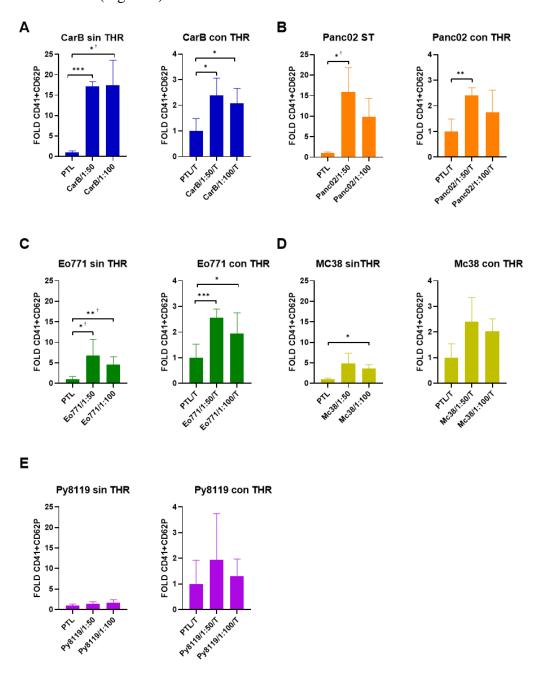
Con el objetivo de evaluar la capacidad de activación plaquetaria de diferentes líneas celulares tumorales murinas se realizaron una serie de ensayos de activación plaquetaria. Las líneas celulares tumorales murinas seleccionadas para los ensayos de activación plaquetaria fueron CarB, Panc02, Eo771, Mc38 y Py8119. La línea celular CarB proviene de un carcinoma de células escamosas de piel de ratón. La línea celular PANC02 deriva de un adenocarcinoma de ducto pancreático de ratón. Las líneas celulares Eo771 y Py8119 provienen de un neoplasma maligno de glándula mamaria de ratón. Por último, la línea celular Mc38 fue generada a partir de un adenocarcinoma de colon de ratón.

Los resultados obtenidos de los ensayos de activación plaquetaria sugieren que la coincubación de plaquetas con distintas líneas tumorales induce un aumento significativo en la activación plaquetaria, como se puede observar realizando una comparativa entre el nivel de activación plaquetaria de plaquetas solas frente a condiciones co-incubadas con células tumorales a distintos ratios célula tumoral-plaqueta (1:50 y 1:100). Asimismo, la co-incubación de plaquetas con distintas líneas tumorales en presencia de 2,5 U/mL de trombina también produjo un aumento significativo de la activación plaquetaria en muchas de las líneas celulares utilizadas. Para ello, se compararon las condiciones co-incubadas con células tumorales a los distintos ratios en presencia de trombina con la condición control de plaquetas solas más 2,5 U/mL de trombina (Figura 1).

Tal como se muestra en la Figura 1.A-C, las líneas celulares CarB, Panc02 y Eo771 indujeron de forma estadísticamente significativa la expresión proteica de CD62P en condiciones de coincubación a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:50 al compararse con las condiciones basales de plaquetas. Sin embargo, las líneas celulares Mc38 y Py8119, aunque mostraron tendencias similares, no alcanzaron la significancia estadística en esta condición (Figura 1.D-E). Similarmente, en condiciones de co-incubación a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:100, en la Figura 1.A-B se observa que las líneas celulares CarB, Eo771 indujeron de forma estadísticamente significativa la expresión proteica de CD62P en comparación a la condición basal de plaquetas, al igual que la línea celular Mc38, que en esta ocasión si alcanzo la diferencia significativa (Figura 1.D). Asimismo, también se observó una tendencia hacia la significancia en el caso de la línea celular **Panc02** (t-test de Welch, p = 0.0760) en esta condición, aunque sin alcanzar la significancia estadística (Figura 1.B). Por último, la línea celular Py8119 no mostro diferencias con respecto a la condición control (Figura 1.E). Al realizar una comparación entre ambos ratios célula tumoral-plaqueta, se observó una activación plaquetaria levemente menor a 1:100 en comparación con 1:50 en todas las líneas celulares, aunque la diferencia no resulto ser estadísticamente significativa (Figura 1).

Adicionalmente, en la Figura 1 también podemos observar que la co-incubación de células tumorales y plaquetas en presencia de 2,5 U/mL de trombina arrojo resultados similares. Las líneas celulares **CarB**, **Panc02** y **Eo771** indujeron de forma estadísticamente significativa la expresión proteica de CD62P en condiciones de co-incubación a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:50 en presencia de 2,5 U/mL de trombina, al compararse con la condición control de plaquetas activadas con 2,5 U/mL de trombina (Figura 1.A-C). Bajo estas mismas condiciones, la expresión proteica de CD62P inducida por la línea celular **Mc38** mostro una tendencia hacia la significancia (t-test estándar, p = 0.0857), aunque sin alcanzar el umbral establecido (Figura 1.D). En caso contrario, en esta condición la línea celular **Py8119** no indujo sobre la expresión de CD62P (Figura 1.E). De manera similar, en condiciones de co-incubación

a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:100 en presencia de 2,5 U/mL de trombina, las líneas celulares **CarB** y **Eo771** indujeron una expresión de CD62P significativo con respecto a la condición control establecida (Figura 1.A y 1.C). Por otro lado, la línea celular **Mc38** mostro también una capacidad de inducción sobre la expresión de CD62P con tendencia hacia la significancia (t-test estándar, p = 0.0703), sin alcanzar a ser estadísticamente significativa (Figura 1.D). Por el contrario, las líneas celulares **Panc02** y **Py8119** no indujeron cambios sobre la activación plaquetaria bajo esta condición (Figura 1.B y 1.E). Aunque no significativa desde el punto de vista estadístico, se apreció una tendencia a menor activación plaquetaria al emplear un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:100 frente a 1:50, ambos en presencia de 2,5 U/mL de trombina (Figura 1).



**Figura 1.** Activación plaquetaria (expresada como *fold change* de CD41<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup>) tras co-incubación con células tumorales a diferentes ratios célula tumoral-plaqueta (1:50 y 1:100), en ausencia o presencia de 2,5 U/mL de trombina. B. Activación plaquetaria (expresada como *fold change* de CD41<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup>) tras co-incubación con células tumorales de línea Panc02 a diferentes ratios célula tumoral-plaqueta (1:50 y 1:100), en ausencia o presencia de 2,5 U/mL de trombina. **A.** CarB **B.** Panc02 **C.** Eo771 **D.** Mc38 **E.** Py8119. Los datos se representan como media del *fold change*  $\pm$  desviación estándar (DE); n = 3-6 réplicas biológicas por grupo. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante t-test estándar o t-test con corrección de Welch según correspondiera. p < 0.05 se consideró significativo. \* = p < 0.05; \*\*\* = p < 0.005; \*\*\*\* = p < 0.0005. †indica análisis con t-test de Welch. THR: Trombina.

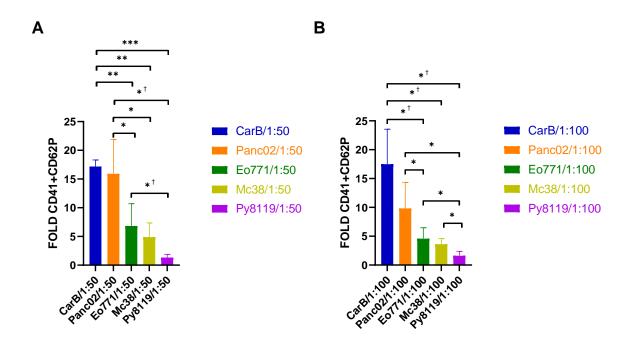
Bajo la condición experimental de co-incubación de células tumorales con plaquetas a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:50, se evaluaron las diferencias entre las distintas líneas celulares tumorales. Se encontraron diferencias significativas sobre la capacidad de inducción de activación plaquetaria entre las líneas celulares tumorales utilizadas (Figura 2.A).

En la Figura 2.A se muestra que la línea celular **CarB** fue la que indujo la mayor expresión proteica de CD62P en esta condición, seguida por la línea celular **Panc02**. Las líneas celulares **Eo771** y **Mc38** mostraron una capacidad intermedia de inducir la activación plaquetaria. Por otro lado, la línea celular **Py8119** presento la capacidad de inducción más baja. Tras el análisis estadístico, se encontró que el cambio sobre la expresión de CD62P inducido por la línea celular **CarB** resulto significativo frente a los inducidos por las otras líneas celulares utilizadas, a excepción de **Panc02**. La activación plaquetaria inducida por la línea celular **Panc02** también fue significativamente mayor a la producida por las líneas celulares **Eo771**, **Mc38** y **Py8119**. La expresión proteica de CD62P inducida por la línea celular **Eo771** solo resulto significativa frente a la línea celular **Py8819**. Por último, se observó una tendencia a la significancia entre la activación plaquetaria inducida por la línea celular **Mc38** sobre **Py8119** (t-test estándar, p = 0.0732), aunque sin alcanzar el umbral de significancia.

Paralelamente, como se observa en la Figura 2.B, se llevó a cabo una comparación de la capacidad de inducción de la activación plaquetaria de las diferentes líneas celulares para la condición de co-incubación de células tumorales con plaquetas a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:100. También se observaron diferencias significativas en la capacidad de inducción de la activación plaquetaria entre las líneas celulares usadas.

De manera similar a la condición anterior, la línea celular **CarB** también fue la que indujo la mayor expresión proteica de CD62P, seguida por **Panc02**. Tras ellas, las líneas celulares **Eo771** y **Mc38** indujeron un aumento intermedio sobre la expresión proteica de CD62P. Por último, la línea celular **Py8119** fue la que indujo la menor expresión proteica de CD62P. A diferencia

de lo observado en la condición previa, en esta condición la activación plaquetaria inducida por la línea celular **Panc02** fue significativamente mayor a la de **Eo771** y **Py8119**, pero solo alcanzó una tendencia hacia la significancia frente a **Mc38** (t-test estándar, p = 0.0794). Además, en esta condición **Mc38** si indujo una activación significativamente superior a **Py8119**, diferencia que no se encontró significativa en la condición anterior (Figura 2.B).



**Figura 2.** Comparación de la activación plaquetaria (expresada como *fold change* de CD41<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup>) inducida tras co-incubación con células tumorales de distintas líneas celulares (CarB, Panc02, Eo771, Mc38, Py8119) a distintos ratios célula tumoral-plaqueta. **A.** 1:50 **B.** 1:100. Los datos se expresan como media del *fold change*  $\pm$  desviación estándar (DE); n =3-6 réplicas biológicas por grupo Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante t-test estándar o t-test con corrección de Welch según correspondiera. p < 0.05 se consideró significativo. \* = p < 0.05; \*\*\* = p < 0.005; \*\*\* = p < 0.0005. † indica análisis con t-test de Welch.

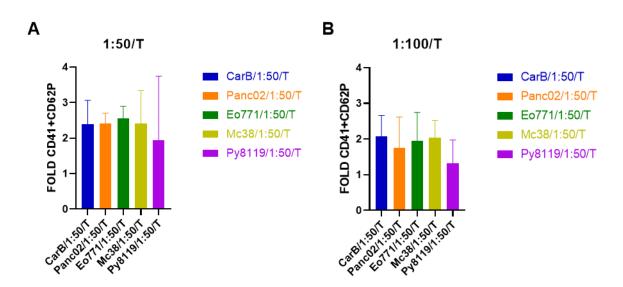
Por otro lado, se comparó la capacidad de inducción de la activación plaquetaria de las distintas líneas celulares para la condición de co-incubación de células tumorales con plaquetas a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:50 con 2,5 U/mL de trombina. En este caso, las diferencias sobre la activación plaquetaria (Expresada en *fold change*) inducida por las distintas líneas celulares no resultaron estadísticamente significativas (Figura 3.A).

Según la Figura 3.A, en esta condición todas las líneas celulares indujeron un aumento similar de la activación plaquetaria. La expresión proteica de CD62P inducida por la línea celular Eo771 fue la mayor, seguida por las líneas celulares **Panc02**, **Mc38** y **CarB**. La línea celular **Py8119** indujo una activación plaquetaria ligeramente menor que las otras líneas celulares.

Luego de aplicar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre la activación plaquetaria inducida por ninguna de las líneas celulares en esta condición.

En paralelo, se realizó una comparativa sobre la capacidad de inducción de la activación plaquetaria de las distintas líneas celulares para la condición de co-incubación de células tumorales con plaquetas a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:100 más 2,5 U/mL de trombina, según se muestra en la Figura 3.B. No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre la activación plaquetaria inducida por las diferentes líneas celulares.

A diferencia de la condición anterior, en la condición de co-incubación de células tumorales con plaquetas a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:100 con 2,5 U/mL de trombina la línea celular **CarB** fue la que indujo la mayor activación plaquetaria, mientras que en la condición anterior ese puesto lo ocupaba **Eo771**. También se observaron variaciones en el orden relativo de inducción de expresión proteica de CD62P ya que la línea celular **Mc38** también indujo una activación plaquetaria superior a **Eo771**. Asimismo, en el caso de la línea celular **Panc02**, se observó una disminución en su capacidad de inducción de la activación plaquetaria en comparación con las otras líneas. Tras realizar el análisis estadístico, en esta condición tampoco se encontraron diferencias significativas entre la activación plaquetaria inducida por las diferentes líneas celulares para esta condición (Figura 3.B).

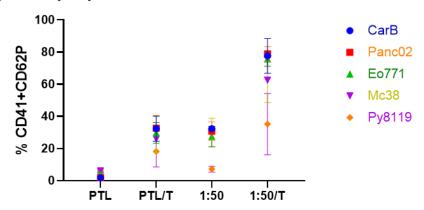


**Figura 3.** Comparación de la activación plaquetaria (expresada como *fold change* de CD41+CD62P+) inducida tras co-incubación con células tumorales de distintas líneas celulares (CarB, Panc02, Eo771, Mc38, Py8119) a distintos ratios célula tumoral-plaqueta, en presencia de 2,5 U/mL de trombina. **A.** 1:50 **B.** 1:100. Los datos se expresan como media del *fold change*  $\pm$  desviación estándar (DE); n =3-6 réplicas biológicas por grupo. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante t-test estándar o t-test con corrección de Welch según correspondiera. p < 0.05 se consideró significativo. \* = p < 0.05; \*\*\* = p < 0.005; \*\*\* = p < 0.0005. † indica

análisis con t-test de Welch.

Tal como se observa en la Figura 4, la activación plaquetaria inducida por las células tumorales a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:50, en términos generales, es comparable con la activación plaquetaria inducida por la presencia de 2,5 U/mL de trombina. No obstante, la coincubación de plaquetas con células tumorales a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:50 más la adición de 2,5 U/mL de trombina parece potenciar la activación plaquetaria inducida por las células tumorales en comparación a la condición de células tumorales a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:50 en ausencia de trombina.

#### Respuesta plaquetaria a celulas tumorales ± trombina

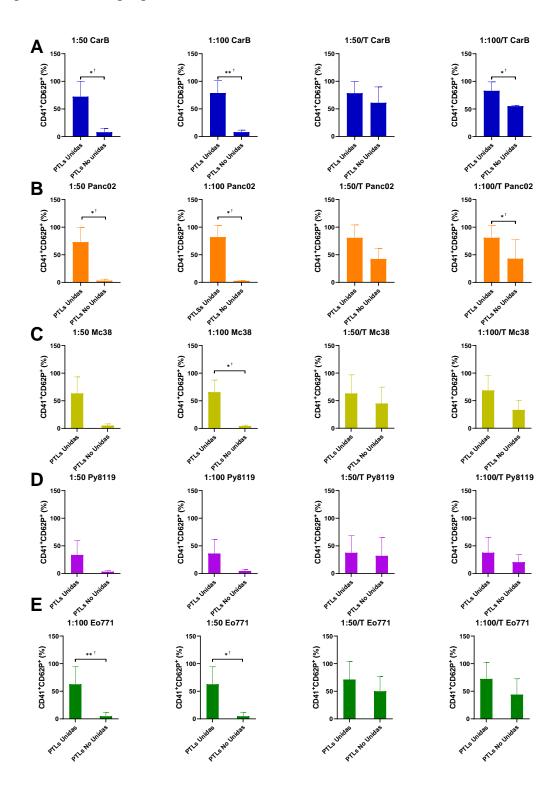


**Figura 4.** Porcentaje de plaquetas activadas (CD41<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup>) tras exposición a distintas líneas celulares (CarB, Panc02, Eo771, Mc38, Py8119), en presencia o ausencia 2.5 U/mL de trombina. Los datos se expresan como media del porcentaje ± error estándar de la media (SEM); n =3-6 réplicas biológicas por grupo.

Además, con el objetivo de definir si la activación plaquetaria inducida por las células tumorales era generada de manera contacto-dependiente o independiente, se ajustó la estrategia de *gating* para separar las poblaciones de plaquetas unidas o no a las células tumorales (Figura 5).

Los resultados mostrados en la Figura 5 a partir de esta nueva estrategia muestran que, en las condiciones sin trombina, la expresión proteica de CD62P de las plaquetas unidas a las células tumorales es significativamente superior a la presente en las plaquetas libres en todas las líneas celulares, a excepción de **Py8119**. Si bien el aumento en la activación plaquetaria de las plaquetas unidas a la línea celular **Mc38** frente a las libres no resulto significativa, si se observó una tendencia hacia la significancia (p = 0.0759, t-test con corrección de Welch) (Figura 5.C). Asimismo, en las condiciones de células tumorales co-incubadas a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:100 en presencia de 2,5 U/mL de trombina la activación producida por las líneas

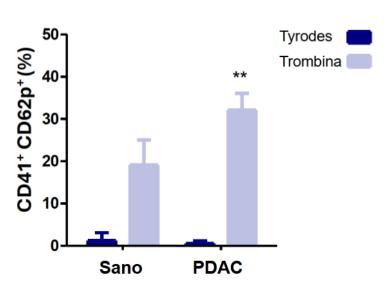
celulares **CarB** y **Panc02** resultaron significativas frente a la producida en las plaquetas libres (Figura 5.A-B). No obstante, eso no sucedió en las otras líneas celulares utilizadas. Por último, en la condición de células tumorales co-incubadas a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:50 en presencia de 2,5 U/mL de trombina la activación plaquetaria de las plaquetas unidas a células tumorales no resulto significativamente superior en ninguna de las líneas utilizadas, al compararlas con las plaquetas libres.



**Figura 5.** Activación plaquetaria evaluada mediante expresión de CD62P en plaquetas unidas a células (Barras izquierdas) versus plaquetas no unidas a células (Barras derechas), en distintas líneas celulares tumorales. **A.** CarB **B.** Panc02 **C.** Mc38 **D.** Py8119 **E.** Eo771. Las condiciones con "/T" indican presencia de 2,5 U/mL de trombina. Los datos se expresan como media del porcentaje  $\pm$  desviación estándar (DE); n =3-6 réplicas biológicas por grupo. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante t-test estándar o t-test con corrección de Welch según correspondiera. p < 0.05 se consideró significativo. \* = p < 0.05; \*\*\* = p < 0.005; \*\*\* = p < 0.005; \*\*\* = p < 0.0005. † indica análisis con t-test de Welch.

Con el objetivo de evaluar si los resultados observados *in vitro* son comparables a contextos *in vivo*. se realizaron una serie de ensayos de activación plaquetaria con plaquetas obtenidas a partir de sangre total de ratones con y sin tumor. Los modelos murinos portadores de tumor fueron generados mediante la implantación de líneas celulares de adenocarcinoma pancreático murino (PDAC) (Figura 6).

Los resultados obtenidos de los ensayos de activación plaquetaria *in vivo*, mostrados en la Figura 6, concuerdan con los resultados obtenidos *in vitro*, ya que se observa que la activación plaquetaria inducida por la trombina en los modelos murinos con tumor es significativamente superior a la producida sobre las plaquetas procedentes de ratones sin tumor, sugiriendo que las plaquetas de modelos murinos con tumor presentan una mayor reactividad frente a estímulos activadores como la trombina.



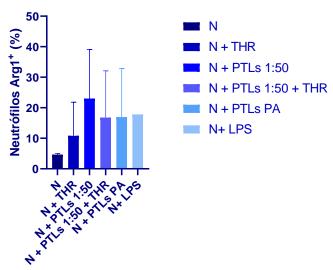
**Figura 6.** Porcentaje de plaquetas activadas (CD41<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup>) de ratones con y sin tumor, en presencia o ausencia de 7,5 U/mL de trombina. Los datos se expresan como media del porcentaje ± desviación estándar (DE); n = 5 réplicas biológicas por grupo. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante t-test estándar. p < 0.05 se consideró significativo. \* = p < 0.05; \*\*\* = p < 0.005; \*\*\* = p < 0.005. PDAC: Adenocarcinoma ductal pancreático

Tras esto, con el objetivo de evaluar la capacidad de las plaquetas de inducir el cambio fenotípico de neutrófilos inmaduros procedentes de medula ósea a MDSC, se realizó una coincubación de neutrófilos inmaduros con plaquetas a un ratio neutrófilo-plaqueta de 1:50, en ausencia o presencia de 2,5 U/mL de trombina. Además, se realizó una preactivación

plaquetaria utilizando 2,5 U/mL de trombina. Asimismo, se realizó una co-incubación de neutrófilos con lipopolisacárido (LPS) como control positivo (Figura 7).

Tal como se observa en la Figura 7, la expresión proteica de arginasa 1 (Arg1), un marcador asociado al fenotipo MDSC, aumentó en los neutrófilos co-incubados con plaquetas en comparación con los neutrófilos solos (N). Esta expresión fue evaluada específicamente en la población de neutrófilos Ly6G+Ly6C+, compatible con el fenotipo de Gr-MDSC en modelos de origen murino. Las condiciones N + PTLs 1:50, N + PTLs 1:50 + THR y N + PTLs PA mostraron una tendencia a incrementar la proporción de neutrófilos diferenciados a MDSC. Sin embargo, debido al limitado tamaño muestral (n = 2) no se pudo realizar un análisis estadístico. La estimulación con LPS (N + LPS) produjo su efecto esperado como control positivo de la inducción de MDSCs.

# Frecuencia de neutrófilos Arg1<sup>+</sup> como indicador de fenotipo MDSC tras estimulación con plaquetas, trombina o LPS

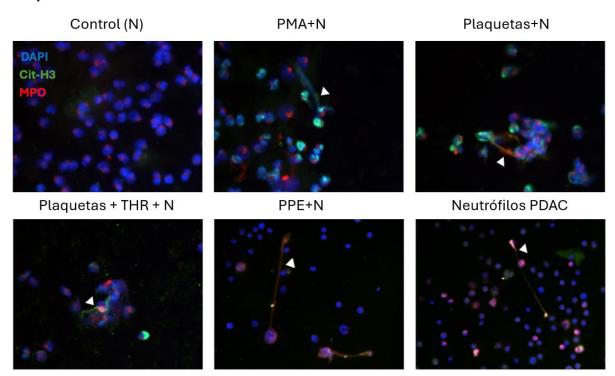


**Figura 7.** Frecuencia de neutrófilos positivos para arginasa 1 (Arg1) bajo distintas condiciones de estimulación. Los neutrófilos fueron incubados solos (N), con trombina (N + THR), con plaquetas (N + PTLs 1:50), con plaquetas más trombina (N + PTLs 1:50 + THR), con plaquetas preactivadas (N + PTLs PA) o con LPS como control positivo (N + LPS). Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (DE); n = 1-2. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante t-test estándar.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las plaquetas de inducir la formación de NETs, se incubaron neutrófilos de origen murino *in vitro* bajo diferentes condiciones experimentales y se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando DAPI, citrulina-Histona H3 (Cit-H3) y mieloperoxidasa (MPO) (Figura 8).

Como se muestra en la Figura 8, en la condición control de solo neutrófilos, no se observaron estructuras características de NETs. Asimismo, sí se observó la formación de NETs en las condiciones de co-incubación de neutrófilos con plaquetas o plaquetas activadas con trombina. En adición, las plaquetas pre-educadas al ser extraídas de ratones con tumores también fueron capaces de inducir la formación de NETs, en ausencia de trombina. Por otro lado, se observó que los neutrófilos provenientes de ratones con tumor formaban NETs en ausencia de plaquetas. Por último, en la condición control positiva de neutrófilos co-incubados con Forbol 12-miristato 13-acetato (*Phorbol 12-myristate 13-acetate-PMA*, por sus siglas en inglés) durante 3 horas a 100 nM si se indujo la formación de NETs, como era de esperarse.

#### Plaquetas activadas inducen la formación de NETs in vitro

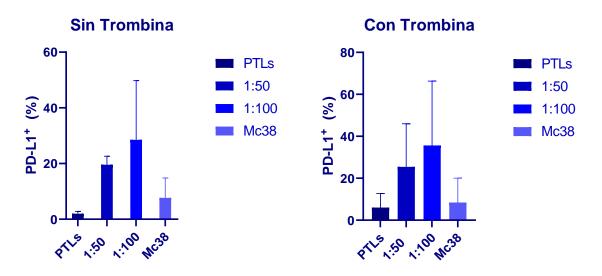


**Figura 8.** La formación *in vitro* de NETs se evaluó incubando neutrófilos aislados (N) y plaquetas bajo diferentes condiciones. Las condiciones incluyeron: Neutrófilos solos (N), neutrófilos con PMA (100 nM, 3 horas, control positivo), neutrófilos con plaquetas (Plaquetas+N), neutrófilos con plaquetas más 7,5 U/mL trombina (Plaquetas+THR+N), neutrófilos con plaquetas pre-educadas por tumor (PPE+N) y neutrófilos solos aislados de ratones portadores de tumor pancreático (Neutrófilos PDAC). Las NETs se visualizaron mediante tinción con DAPI (azul, núcleo), Cit-H3 (Verde) y MPO (rojo). Las flechas blancas indican NETs positivas.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las plaquetas de inducir la expresión de PD-L1 en la línea celular Mc38, se incubaron células tumorales con plaquetas a diferentes ratios célula tumoral-plaqueta (1:50 y 1:100) en presencia o ausencia de trombina (7,5 U/mL). En este caso,

las diferencias sobre la expresión de PD-L1 (Expresada como porcentaje de expresión) inducida por las plaquetas no resultaron estadísticamente significativas (Figura 9).

Según la Figura 9, la adición de trombina parece aumentar la expresión proteica de PD-L1 las condiciones de co-incubación de células tumorales con plaquetas, al compararse con las condiciones sin trombina correspondientes. En adición, la expresión de PD-L1 en las células tumorales expuestas a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:50 mostraron un aumento con tendencia hacia la significancia (p = 0.0569, t-test estándar) al compararse con el control negativo (Células tumorales solas). No obstante, esto no se repite en el ratio 1:100 ni en las condiciones con trombina. Asimismo, se observó que, en ambas condiciones, el ratio 1:50 indujo una menor expresión de PD-L1 que el ratio 1:100, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por último, la expresión de PD-L1 en plaquetas pareció verse incrementada en presencia de trombina.



**Figura 9.** Expresión de PD-L1 en Mc38 en condiciones con y sin trombina. Se evaluó la expresión de PD-L1 en células tumorales co-incubadas con plaquetas a diferentes ratios célula tumoral-plaqueta (1:50 y 1:100), así como controles de plaquetas y células tumorales solas. **A.** Sin trombina **B.** Con trombina. Los valores están representados como media ± desviación estándar (DE). n = 3. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante t-test estándar.

### 6 Discusión

Si bien la implicación de las plaquetas en el microambiente tumoral no ha sido ampliamente estudiada, se han realizado estudios que investigan la capacidad de las células tumorales de inducir la activación plaquetaria tanto de forma contacto dependiente como independiente. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Placke *et al.* (2011), quienes observaron que

las células tumorales, en presencia de plaquetas, eran recubiertas rápidamente tanto en experimentación *in vitro* como *in vivo* y en este estado eran capaces de inducir la activación plaquetaria. Estos resultados, aparte de los obtenidos en este trabajo han sido consistentes con resultados previos (25,26). En adición, también se ha descrito que moléculas de membrana tales como la podoplanina, ligando de la glucoproteína P-selectina (*P-selectin glycoprotein ligand-1-PSGL-1*, por sus siglas en inglés) y CD97 presentes en las células tumorales interaccionan con las plaquetas, causando su activación (27–30). Asimismo, estudios previos también observaron la capacidad de las células tumorales de inducir la activación plaquetaria o modular la reactividad plaquetaria través de mecanismos contacto independientes, tales como la liberación de vesículas extracelulares (*extracelular vesicules-EVs*, por sus siglas en inglés), citoquinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento, moléculas inductoras de la activación plaquetaria (Trombina, ADP y Tromboxano A<sub>2</sub>) y factor tisular (14,31).

De forma complementaria, los resultados presentados en la Figura 6 demuestran que si bien las líneas celulares CarB, Panc02, Eo771 y Mc38 son capaces de inducir una activación plaquetaria significativa sobre las plaquetas unidas a su superficie, la línea celular Py8119 no. Asimismo, esta diferencia sobre la activación plaquetaria pareció producirse únicamente en las condiciones sin trombina, a excepción de las líneas celulares CarB y Panc02. Esto sugiere que la activación plaquetaria se produce a través de un mecanismo contacto-dependiente, a falta de experimentos que lo respalden. En adición, la incorporación de trombina pareció eliminar el efecto diferencial de las líneas celulares frente a la activación plaquetaria, sugiriendo también una saturación de las rutas de señalización responsables de este fenómeno. Asimismo, a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:100 más 2,5 U/mL de trombina, la expresión proteica de CD62P en las plaquetas unidas a las líneas celulares tumorales CarB y Panc02 resulto significativamente superior a la presente en las plaquetas sueltas. Esto está de acuerdo con la hipótesis de que las células tumorales no solo son capaces de activar a las plaquetas, sino también de modular su reactividad frente a agonistas clásicos como la trombina.

Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo utilizando otras estrategias de *gating*, donde se observó que varias de las líneas celulares tumorales murinas fueron capaces de inducir activación plaquetaria de forma estadísticamente significativa, tanto en ausencia como en presencia de trombina (Figura 1). En conjunto, estas observaciones apuntan a que la interacción entre las plaquetas y las células tumorales, mediada posiblemente por moléculas de superficie, es capaz de inducir o regular la activación plaquetaria.

Las diferencias en la capacidad de inducción sobre la activación plaquetaria de las diferentes líneas celulares murinas utilizadas en este trabajo podrían atribuirse a una mayor expresión de moléculas de membrana como la podoplanina, PSGL-1 y CD97, o a una mayor liberación de moléculas relacionadas con la activación plaquetaria contacto independiente. Asimismo, la incapacidad de inducir la activación plaquetaria de la línea celular Py8119 también podría ser explicada utilizando el razonamiento previo utilizando también los resultados obtenidos en la Figura 6. Estos hallazgos abren nuevas preguntas acerca de los mecanismos subyacentes de activación plaquetaria por células tumorales, constituyendo una posible dirección para futuras investigaciones.

Estos hallazgos se alinean con estudios previos donde se resalta la presencia la importancia de estas moléculas en algunas de las líneas celulares estudiadas. En lo que respecta a las diferencias entre las líneas celulares, en la línea celular CarB (Carcinoma de células escamosas murino) previamente se ha documentado una elevada expresión de podoplanina, la cual se ha relacionado con la activación plaquetaria y progresión de la metástasis tumoral (32,33). No obstante, no se ha encontrado relación entre la línea celular CarB o similares y la expresión de PSGL-1 o CD97. Por otro lado, la línea celular Panc02 (Adenocarcinoma ductal pancreático) si es capaz de expresar PSGL-1, el cual ha sido relacionado con la generación de trombos in vivo por Thomas et al. (2009) (34). Asimismo, aunque la expresión de CD97 en Panc02 no se ha investigado explícitamente, sí se ha evidenciado expresión de CD97 en adenocarcinomas pancreáticos (35). No obstante, esta línea celular no expresa podoplanina en su superficie (36). Similarmente, la línea celular Mc38 (Adenocarcinoma de colon murino) tampoco expresa podoplanina en su superficie. Al contrario, sí se han realizado investigaciones que describen la expresión de CD97 en líneas de carcinoma colorrectal humano tales como HCT116 y HT-29 (37). La expresión de PSGL-1 en esta línea celular tampoco ha sido investigada, pero estudios previos han encontrado que fragmentos de mucinas provenientes de la línea celular LS180 (Adenocarcinoma de colon humano) y otros carcinomas cuentan con O-glicanos sialilados, fucosilados y sulfatados que también son capaces de unirse al CD62P plaquetario similar a PSGL-1 (38). En el caso de la línea celular Eo771 (Neoplasias malignas de glándula mamaria murina), la expresión de podoplanina se ha relacionado con la transición epitelio-mesenquimal, expresión de colágeno e hipoxia en tumores primarios de cáncer de mama triple negativo (39). Al contrario, no se han realizado investigaciones previas que relacionen esta línea celular con la expresión de tanto PSGL-1 como CD97. Por último, la línea celular Py8119 (Neoplasias malignas de glándula mamaria murina) no se ha relacionado con la expresión de PSGL-1 y

CD97. No obstante, es posible que esta línea celular sea capaz de expresar podoplanina dado a que deriva de un tumor mamario de un modelo murino MMTV-PyMT. Utilizando este mismo modelo, Chen *et al.* (2018) identifico una expresión de podoplanina en los vasos linfáticos tumorales, la cual relaciono con la regulación de la diseminación metastásica (40).

En cuanto a los mecanismos de activación plaquetaria contacto-independientes, existe la posibilidad de que la línea celular CarB sea capaz de liberar EVs que inducen la activación plaquetaria a través de rutas relacionadas con el factor tisular basándonos en un estudio reciente realizado por Weiser *et al.* (2025) utilizando líneas celulares de origen humano derivadas de carcinoma de células escamosas (41). Asimismo, la línea celular Panc02 también es capaz de liberar EVs capaces de activar las plaquetas a través del receptor tipo 1 de interleucina 1 (*Interleukin 1 receptor-like-1-*ST2, por sus siglas en inglés) debido a su contenido de IL-33 (42). Por otro lado, la línea celular Eo771 tiene la capacidad de liberar EVs, aunque hasta la fecha no se han realizado investigaciones que liguen el contenido de estas con la activación plaquetaria (43). En adición, la línea celular Mc38 también es capaz de liberar EVs capaces de influir en el TME, aunque aún no se ha establecido una relación entre estas EVs y la activación plaquetaria (44). Por último, aunque si existe evidencia de que las células tumorales derivadas de canceres de mama liberen EV, no se han realizado estudios que relacionen directamente las EVs liberadas por la línea celular Py8119 con la activación plaquetaria (45).

Adicionalmente, aunque no se han identificado estudios directos existe la posibilidad de que la línea celular CarB sea capaz de liberar TGF-β, IL-6 y el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*-VEGF, por sus siglas en inglés) dado que estudios previos han demostrado que su liberación en carcinomas de células escamosas (46–48). En un estudio realizado por Gnerlich *et al.* (2015), se reporta que la línea celular Panc02 libera de forma constitutiva tanto TGF-β así como IL-6 e IL-1 β, aunque estos últimos a niveles bajos (49,50). En el caso de la línea celular Eo771, estudios previos han encontrado altos niveles de TGF-β e IL-6, relacionándolos con la progresión tumoral (51). Por último, las líneas celulares Mc38 y Py8119 también son capaces de liberar TGF-β en grandes cantidades según estudios realizados por Sow *et al.* (2019) y Biswas *et al.* (2014) respectivamente. Además, en el caso de Mc38 se ha documentado la secreción de VEGF-A (52). Si bien no se confirma explícitamente la liberación de TGF-β por la línea celular Py8119, si se detecta una fosforilación basal de Smad 2/3 que se atribuye a una señalización autocrina (53,54).

En conjunto, los datos obtenidos identifican la capacidad de inducción de la activación

plaquetaria de las líneas celulares CarB y Panc02 como la más intensa. Basándonos en hallazgos previos, estas diferencias podrían atribuirse tanto a la expresión de proteínas de membrana tales como la podoplanina, PSGL-1 y CD97 como a la liberación de mediadores de la activación plaquetaria contacto-independientes como EVs, TGF-β, IL-6 e IL-1β. Por el contrario, la línea celular Py8119 mostro una capacidad limitada de inducir la activación plaquetaria, probablemente debido a una menor expresión de moléculas de membrana, dado que si se ha confirmado su capacidad de secreción de TGF-β.

Adicionalmente, al observar los resultados obtenidos en las Figuras 4 y 5 de forma conjunta, se observa que la co-incubación de las plaquetas con las células tumorales tienen la capacidad de inducir una activación plaquetaria comparable a la inducida por la trombina a una concentración de 2,5 U/mL. Sin embargo, cuando se realizó la co-incubación de las células tumorales más 2,5 U/mL de trombina, se observó un incremento adicional sobre la activación plaquetaria. Este hallazgo sugiere un posible efecto sinérgico entre las rutas de activación plaquetaria utilizadas por las células tumorales y la trombina. Esta hipótesis se ve respaldada por lo observado en la Figura 4, donde la incorporación de trombina a la condición de coincubación de células tumorales, a un ratio célula tumoral-plaqueta de 1:100, elimino el efecto diferencial que tenían las distintas líneas celulares tumorales sobre la activación plaquetaria. Esto podría indicar que se alcanzó un nivel de activación plaquetaria máximo. En conjunto, estos resultados apuntan a que las células tumorales tienen la capacidad no solo de activar a las plaquetas, sino de amplificar el efecto activador de la trombina. En adición, la Figura 6 muestra que, incluso en presencia de trombina, las plaquetas unidas a las líneas celulares tumorales CarB y Panc02 expresan más CD62P que las no unidas. Esto sugiere que algunas líneas celulares no solo tienen la capacidad de activar directamente a las plaquetas, sino que también pueden modular su reactividad frente a agonistas clásicos como la trombina. Un estudio reciente realizado por Dudiki et al. (2023) también ha encontrado que la activación plaquetaria inducida por EVs liberadas por células tumorales era comparable a la activación plaquetaria causada agonistas plaquetarios clásicos como la trombina y el ADP (31). Asimismo, si bien las células tumorales tienen la capacidad de activar las plaquetas a través de la interacción con moléculas de membrana o factores solubles liberados al TME, también son capaces de modular la reactividad plaquetaria a la trombina a través de la liberación de TGF-β, IL-6, VEGF y EVs.

Al realizar los ensayos de activación plaquetaria *in vivo*, se observó que las plaquetas procedentes de modelos murinos portadores de tumor mostraron una activación superior a las procedentes de modelos murinos sin tumor. Este fenómeno podría estar mediado por señales

solubles liberadas por las células tumorales o por el contacto con células tumorales circulantes (CTC) (26). Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos *in vitro* en este trabajo, donde se observó que las células tumorales eran capaces de modular la reactividad plaquetaria frente a la trombina. En conjunto, estos resultados corroboran que los resultados observados *in vitro*, al menos en el caso de la línea celular Panc02, se pueden extrapolar a experimentos *in vivo*. Además, esos resultados también apuntan a que las plaquetas, tras activarse mediante la interacción con células tumorales, son capaces de reingresar a la circulación sistémica. No obstante, será necesario realizar estudios adicionales para comprobar que los resultados obtenidos en las otras líneas tumorales utilizadas también se reproducen *in vivo*.

En cuanto a la capacidad de las plaquetas de inducir el cambio fenotípico de neutrófilos de origen murino a MDSC, se observó que él porcentaje de expresión proteica de Arg1 dentro de la subpoblación de neutrófilos Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> en las condiciones de co-incubación de neutrófilos con plaquetas, plaquetas más trombina y plaquetas preactivadas con trombina era mayor que en la condición control de neutrófilos solos. Estos resultados señalan la posibilidad de que la interacción entre los neutrófilos inmaduros y las plaquetas sea capaz de inducir un cambio fenotípico en los neutrófilos, diferenciándolos a un fenotipo inmunosupresor como las MDSC. No obstante, no se han podido realizar análisis estadísticos debido al bajo número de replicas biológicas realizado (n = 2). A pesar de esta limitación, se puede observar que la expresión proteica de Arg1 inducida por la co-incubación de neutrófilos con plaquetas, plaquetas con trombina y plaquetas preactivadas es comparable con la producida por el control positivo, en este caso LPS. Un estudio reciente realizado por Dahal et al. (2024) relacionó el factor activador de plaquetas (Platelet-Activating Factor-PAF, por sus siglas en inglés), un lípido bioactivo liberado por las plaquetas, con la diferenciación de neutrófilos hacia un fenotipo MDSC al inducir una mayor expresión de marcadores como la arginasa 1 y dcTRAIL-R1 (55,56). Asimismo, estudios previos también han observado que las plaquetas o factores solubles liberados por las mismas también son capaces tanto de inducir el reclutamiento de MDSC al tumor como de potenciar su capacidad inhibitoria a nivel transcripcional (24). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, junto con la evidencia existente, respaldan la hipótesis de que las plaquetas son capaces de inducir la diferenciación de neutrófilos hacia un fenotipo MDSC.

En cuanto a la capacidad de las plaquetas para inducir la NETosis en neutrófilos, se observó que la co-incubación de neutrófilos con plaquetas en estado basal como activadas por trombina era capaz de desencadenar la formación de NETs. Asimismo, la co-incubación de neutrófilos

con plaquetas pre-educadas en un entorno tumoral también desencadeno la promovió la NETosis en ausencia de trombina. Por otro lado, los neutrófilos aislados de ratones con tumor también formaron NETs sin necesidad de estímulos adicionales, lo cual sugiere que el microambiente tumoral tiene la capacidad de inducir la NETosis directamente in vivo, En conjunto, los resultados obtenidos apuntan a que las plaquetas son capaces de desencadenar la NETosis e influir en la evasión inmune tumoral independientemente de su estado de activación. Además, lo observado también concuerda con lo observado previamente en este trabajo, dado que se puede observar que la presencia de células tumorales es capaz de influir sobre el comportamiento de las plaquetas. Estos resultados concuerdan por lo observado por Caudrillier et al. (2012), donde al co-incubar neutrófilos humanos con plaquetas activadas previamente con trombina, se observó una robusta formación de NETs en comparación al control negativo en un modelo de daño pulmonar agudo. A diferencia de lo reportado por este estudio, en nuestro modelo murino si se produjo la formación de NETs al co-incubar neutrófilos con plaquetas en estado basal. Esta diferencia podría atribuirse al uso de células murinas en nuestro modelo, mientras que el estudio previo fue realizado en humanos, lo cual podría influir en la sensibilidad de los neutrófilos a las plaquetas basales (57). Asimismo, el efecto observado de las células tumorales y el microambiente tumoral sobre las plaquetas y los neutrófilos consiste con lo reportado por Cedervall et al. (2015), ya que también observaron que los tumores eran capaces de activar neutrófilos en modelos murinos, favoreciendo la formación de NETs en órganos distantes (58). Ya que la NETosis ha sido asociada previamente con la disfunción de células inmunes efectoras, los resultados obtenidos apoyan la posibilidad de que las plaquetas, al inducir la formación de NETs, tienen un rol a la evasión inmune tumoral (12).

Por último, a partir de los resultados observados en la Figura 9, se sugiere que las plaquetas son capaces de inducir la expresión de PD-L1 en las células tumorales de la línea celular Mc38. Asimismo, este efecto también parece ser potenciado por la presencia de trombina. Si bien las diferencias no se encontraron estadísticamente significativas, posiblemente atribuible al número limitado de replicas biológicas, posiblemente un aumento de muestra permitiría mejorar la potencia estadística del análisis y reducir la variabilidad. En adición, la mayor expresión de PD-L1 a un ratio 1:100 podría indicar que en este caso el ratio célula tumoral-plaqueta y la expresión proteica de PD-L1 siguen una correlación positiva. Finalmente, dentro del contexto tumoral, estos hallazgos son sumamente relevantes dada la importancia de PD-L1.

Aunque es bien sabido que ciertos tipos celulares expresan PD-L1 como mecanismo para

evadir la respuesta inmunitaria, la contribución de las plaquetas a este proceso no ha sido explorada ampliamente. No obstante, un estudio realizado por Zaslavsky *et al.* (2020) encontró que las plaquetas intratumorales de tumores PD-L1 negativos, a través de PD-L1, influyen en la supresión de la respuesta inmunitaria (59). Esto destaca la importancia de las plaquetas como fuente alternativa de PD-L1 en el TME. En conjunto, estos descubrimientos subrayan la necesidad de considerar el papel de las plaquetas y su activación en la evasión inmunitaria tumoral.

Por último, los objetivos de este trabajo se alinean con los objetivos de desarrollo sostenible establecidos por las Naciones Unidas (Agenda 2030). En específico, el objetivo 3 (Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades) se liga estrechamente con la línea de investigación llevada a cabo en este trabajo. Este trabajo investiga el papel de las plaquetas dentro del contexto tumoral, incluyendo su capacidad de inducir la diferenciación de neutrófilos a MDSC, promover la NETosis y aumentar la expresión de PD-L1 en células tumorales. Estos hallazgos abren nuevas líneas de investigación dentro de las áreas de la inmunología y oncología, permitiendo en un futuro mejorar los tratamientos y pronósticos de enfermedades relacionadas a estas áreas. Asimismo, este trabajo se alinea con el subobjetivo 3.4 de la agenda 2030 de las Naciones Unidas, el cual aboga por reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles mediante la prevención y el tratamiento y promover la salud mental y el bienestar para el 2030.

### 7 Conclusión

A partir de los resultados obtenidos durante este estudio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1. Las líneas celulares utilizadas en este estudio mostraron diferencias significativas en su capacidad de inducir la activación plaquetaria, tanto en ausencia como presencia de trombina. Asimismo, los resultados sugieren que esta activación plaquetaria parece depender, al menos en parte, de mecanismos contacto dependientes. Además, se observó que las células tumorales tienen la capacidad para modular la reactividad plaquetaria frente a la trombina. Por último, entre las líneas celulares analizadas, CarB y Panc02 destacaron por inducir la activación plaquetaria más intensa. Estos resultados también se pudieron observar *in vivo*.
- 2. Los resultados obtenidos sugieren que las plaquetas podrían estar relacionadas con la

inducción del cambio fenotípico de neutrófilos murinos hacia un fenotipo inmunosupresor tipo MDSC. No obstante, el limitado tamaño muestral no ha permitido realizar análisis estadísticos. Asimismo, las diferencias observadas sobre la expresión de Arg1 inducida por las plaquetas resulto comparables con la producida por el control positivo. Estos hallazgos coinciden con estudios previos, respaldando la hipótesis de que las plaquetas participan en la generación de células con actividad inmunosupresora dentro del microambiente tumoral.

- 3. Los hallazgos de este estudio señalan a que las plaquetas activadas tienen la capacidad de inducir la expresión de PD-L1 sobre una línea celular tumoral como Mc38. Aunque las diferencias encontradas no resultaron estadísticamente significativas, si se pudo observar una tendencia hacia la significancia. Además, también se observó una posible correlación positiva entre el ratio célula tumoral-plaqueta y la expresión de PD-L1 en la línea celular Mc-38. Los resultados obtenidos se alinean con estudios previos, reforzando la hipótesis de que las plaquetas pueden contribuir a la capacidad de los tumores para evadir la respuesta inmunitaria.
- 4. Los resultados obtenidos indican que tanto las plaquetas activadas por trombina como en estado basal son capaces de inducir la NETosis en neutrófilos murinos. Asimismo, se observó que las plaquetas pre-educadas extraídas de modelos murinos con tumor también fueron capaces de promover la formación de NETs en ausencia de trombina. Por último, los neutrófilos extraídos de modelos murinos con tumor también mostraron formación espontanea de NETs, abriendo la posibilidad de que el microambiente tumoral sea capaz de promover la NETosis in vivo. Lo encontrado concuerda con estudios previos, respaldando la hipótesis de que las plaquetas son capaces de inducir la formación de NETs, contribuyendo a la evasión inmunitaria tumoral.

### 8 Bibliografía

- 1. Arneth B. Tumor microenvironment. Vol. 56, Medicina (Lithuania). MDPI AG; 2020.
- 2. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. Vol. 221, Pharmacology and Therapeutics. Elsevier Inc.; 2021.
- 3. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. J Cell Sci. 2012 Dec;125(23):5591–6.
- 4. Zhang H, Yue X, Chen Z, Liu C, Wu W, Zhang N, et al. Define cancer-associated fibroblasts (CAFs) in the tumor microenvironment: new opportunities in cancer

- immunotherapy and advances in clinical trials. Vol. 22, Molecular Cancer. BioMed Central Ltd; 2023.
- 5. Xue R, Zhang Q, Cao Q, Kong R, Xiang X, Liu H, et al. Liver tumour immune microenvironment subtypes and neutrophil heterogeneity. Nature. 2022 Dec 1;612(7938):141–7.
- 6. Jhunjhunwala S, Hammer C, Delamarre L. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. Vol. 21, Nature Reviews Cancer. Nature Research; 2021. p. 298–312.
- 7. LV B, Wang Y, Ma D, Cheng W, Liu J, Yong T, et al. Immunotherapy: Reshape the Tumor Immune Microenvironment. Vol. 13, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2022.
- 8. Myeloid derived suppressor cells and innate immune system interaction in tumor microenvironment.
- 9. Sanchez-Pino MD, Dean MJ, Ochoa AC. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): When good intentions go awry. Cell Immunol. 2021 Apr 1;362.
- 10. Hegde S, Leader AM, Merad M. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity. Vol. 54, Immunity. Cell Press; 2021. p. 875–84.
- 11. Dymicka-Piekarska V, Koper-Lenkiewicz OM, Zińczuk J, Kratz E, Kamińska J. Inflammatory cell-associated tumors. Not only macrophages (TAMs), fibroblasts (TAFs) and neutrophils (TANs) can infiltrate the tumor microenvironment. The unique role of tumor associated platelets (TAPs). Vol. 70, Cancer Immunology, Immunotherapy. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 1497–510.
- 12. Fang Q, Stehr AM, Naschberger E, Knopf J, Herrmann M, Stürzl M. No NETs no TIME: Crosstalk between neutrophil extracellular traps and the tumor immune microenvironment. Vol. 13, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2022.
- 13. Li S, Lu Z, Wu S, Chu T, Li B, Qi F, et al. The dynamic role of platelets in cancer progression and their therapeutic implications. Nat Rev Cancer [Internet]. 2024 Jan 1;24(1):72–87. Available from: https://www.nature.com/articles/s41568-023-00639-6
- 14. Li Z, Riesenberg B, Metelli A, Li A, Wu BX. The role of platelets in tumor growth, metastasis, and immune evasion. In: Platelets. Elsevier; 2019. p. 547–61.
- 15. Dovizio M, Alberti S, Guillem-Llobat P, Patrignani P. Role of platelets in inflammation and cancer: Novel therapeutic strategies. Vol. 114, Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology. 2014. p. 118–27.
- 16. Kang Y, Amoafo EB, Entsie P, Beatty GL, Liverani E. A role for platelets in metabolic reprogramming of tumor-associated macrophages. Vol. 14, Frontiers in Physiology. Frontiers Media SA; 2023.

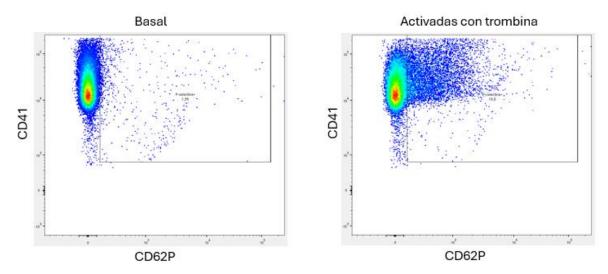
- 17. Cho MS, Lee H, Gonzalez-Delgado R, Li D, Sasano T, Carlos-Alcalde W, et al. Platelets Increase the Expression of PD-L1 in Ovarian Cancer. Cancers (Basel). 2022 May 1;14(10).
- 18. De Palma M, Biziato D, Petrova T V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. Vol. 17, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2017. p. 457–74.
- 19. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. Vol. 18, Developmental Cell. Cell Press; 2010. p. 884–901.
- 20. TGF-β signaling and the interaction between platelets and T-cells in tumor microenvironment: Foes or friends?
- 21. Qian J, Wang X, Su G, Shu X, Huang Z, Jiang H, et al. Platelet-rich plasma-derived exosomes attenuate intervertebral disc degeneration by promoting NLRP3 autophagic degradation in macrophages. Int Immunopharmacol. 2022 Sep 1;110:108962.
- 22. Segal BH, Giridharan T, Suzuki S, Khan ANH, Zsiros E, Emmons TR, et al. Neutrophil interactions with T cells, platelets, endothelial cells, and of course tumor cells. Vol. 314, Immunological Reviews. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 13–35.
- 23. Wang L, Wang H, Zhu M, Ni X, Sun L, Wang W, et al. Platelet-derived TGF-β1 induces functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in immune thrombocytopenia.
- 24. Han X, Song X, Xiao Z, Zhu G, Gao R, Ni B, et al. Study on the mechanism of MDSC-platelets and their role in the breast cancer microenvironment. Vol. 12, Frontiers in Cell and Developmental Biology. Frontiers Media SA; 2024.
- 25. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. Cancer Res. 2012 Jan 15;72(2):440–8.
- 26. Liu Y, Zhang Y, Ding Y, Zhuang R. Platelet-mediated tumor metastasis mechanism and the role of cell adhesion molecules. Vol. 167, Critical Reviews in Oncology/Hematology. Elsevier Ireland Ltd; 2021.
- 27. Braun A, Anders HJ, Gudermann T, Mammadova-Bach E. Platelet-Cancer Interplay: Molecular Mechanisms and New Therapeutic Avenues. Vol. 11, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2021.
- 28. Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Mika KK, Mishima K, Yatomi Y, et al. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. Journal of Biological Chemistry. 2007 Sep 7;282(36):25993–6001.

- 29. Kappelmayer J, Nagy B. The interaction of selectins and PSGL-1 as a key component in thrombus formation and cancer progression. Vol. 2017, BioMed Research International. Hindawi Limited; 2017.
- 30. Ward Y, Lake R, Faraji F, Sperger J, Martin P, Gilliard C, et al. Platelets Promote Metastasis via Binding Tumor CD97 Leading to Bidirectional Signaling that Coordinates Transendothelial Migration. Cell Rep. 2018 Apr 17;23(3):808–22.
- 31. Dudiki T, Veleeparambil M, Zhevlakova I, Biswas S, Klein EA, Ford P, et al. Mechanism of Tumor-Platelet Communications in Cancer. Circ Res. 2023 May 26;132(11):1447–61.
- 32. Montero-Montero L, Renart J, Ramírez A, Ramos C, Shamhood M, Jarcovsky R, et al. Interplay between podoplanin, cd44s and cd44v in squamous carcinoma cells. Cells. 2020 Oct 1:9(10):1–22.
- 33. Wen-Yu Chuang1 YSCCJYYCW and CH. Role of podoplanin expression in squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract. Histol Histopathology. 2013;28:293–9.
- 34. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. Journal of Experimental Medicine. 2009 Aug 31;206(9):1913–27.
- 35. He Z, Wu H, Jiao Y, Zheng J. Expression and prognostic value of CD97 and its ligand CD55 in pancreatic cancer. Oncol Lett. 2015 Feb 1;9(2):793–7.
- 36. Shirai T, Tsukiji N, Sasaki T, Oishi S, Yokomori R, Takano K, et al. Cancer-associated fibroblasts promote venous thrombosis through podoplanin/CLEC-2 interaction in podoplanin-negative lung cancer mouse model. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2023 Nov 1;21(11):3153–65.
- 37. Steinert M, Wobus M, Boltze C, Schü Tz A, Wahlbuhl M, Rg Hamann J, et al. Expression and Regulation of CD97 in Colorectal Carcinoma Cell Lines and Tumor Tissues.
- 38. Shao B, Wahrenbrock MG, Yao L, David T, Coughlin SR, Xia L, et al. Carcinoma mucins trigger reciprocal activation of platelets and neutrophils in a murine model of Trousseau syndrome. Blood. 2011 Oct 13;118(15):4015–23.
- 39. Wang Z, Ingebriktsen LM, Bekkhus T, Bazioti A, Shi W, Lehrstrand JH, et al. Podoplanin-Linked Mesenchymal Shift Synergizes with CCR7 driving Lymphatic Metastasis and Tumor Progression in Breast Cancer [Internet]. 2025. Available from: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2025.03.17.643704
- 40. Chen Y, Keskin D, Sugimoto H, Kanasaki K, Phillips PE, Bizarro L, et al. Podoplanin + tumor lymphatics are rate limiting for breast cancer metastasis. PLoS Biol. 2018 Dec 1;16(12).

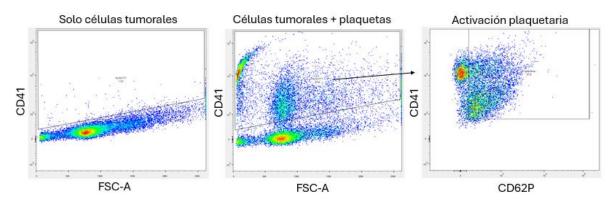
- 41. Weiser T, Hoch CC, Petry J, Shoykhet M, Schmidl B, Yazdi M, et al. Head and neck squamous cell carcinoma-derived extracellular vesicles mediate Ca<sup>2+</sup>-dependent platelet activation and aggregation through tissue factor. Cell Communication and Signaling . 2025 Dec 1;23(1).
- 42. Alashkar Alhamwe B, Ponath V, Alhamdan F, Dörsam B, Landwehr C, Linder M, et al. BAG6 restricts pancreatic cancer progression by suppressing the release of IL33-presenting extracellular vesicles and the activation of mast cells. Cell Mol Immunol. 2024 Aug 1;21(8):918–31.
- 43. Visan KS, Lobb RJ, Ham S, Lima LG, Palma C, Edna CPZ, et al. Comparative analysis of tangential flow filtration and ultracentrifugation, both combined with subsequent size exclusion chromatography, for the isolation of small extracellular vesicles. Vol. 11, Journal of Extracellular Vesicles. John Wiley and Sons Inc; 2022.
- 44. Ji Q, Zhou L, Sui H, Yang L, Wu X, Song Q, et al. Primary tumors release ITGBL1-rich extracellular vesicles to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-niche formation. Nat Commun. 2020 Dec 1;11(1).
- 45. Hendrix A, Hume AN. Exosome signaling in mammary gland development and cancer. International Journal of Developmental Biology. 2011;55(7–9):879–87.
- 46. Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, Anderson WP, Speight PM, Marshall JF, et al. Tumour-derived TGF-β1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. Br J Cancer. 2004 Feb 23;90(4):822–32.
- 47. Ruan M, Thorn K, Liu S, Li S, Yang W, Zhang C, et al. The secretion of IL-6 by CpG-ODN-treated cancer cells promotes T-cell immune responses partly through the TLR-9/AP-1 pathway in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2014;45(6):2103–10.
- 48. Mulligan JK, Day TA, Gillespie MB, Rosenzweig SA, Young MRI. Secretion of vascular endothelial growth factor by oral squamous cell carcinoma cells skews endothelial cells to suppress T-cell functions. Hum Immunol. 2009 Jun;70(6):375–82.
- 49. Gnerlich JL, Mitchem JB, Weir JS, Sankpal N V., Kashiwagi H, Belt BA, et al. Induction of Th17 Cells in the Tumor Microenvironment Improves Survival in a Murine Model of Pancreatic Cancer. The Journal of Immunology. 2010 Oct 1;185(7):4063–71.
- 50. Karakhanova S, Link J, Heinrich M, Shevchenko I, Yang Y, Hassenpflug M, et al. Characterization of myeloid leukocytes and soluble mediators in pancreatic cancer: Importance of myeloid-derived suppressor cells. Oncoimmunology. 2015;4(4).
- 51. Ngule C, Shi R, Ren X, Jia H, Oyelami F, Li D, et al. NAC1 promotes stemness and regulates myeloid-derived cell status in triple-negative breast cancer. Mol Cancer. 2024 Dec 1;23(1).

- 52. Arulanandam R, Batenchuk C, Angarita FA, Ottolino-Perry K, Cousineau S, Mottashed A, et al. VEGF-Mediated Induction of PRD1-BF1/Blimp1 Expression Sensitizes Tumor Vasculature to Oncolytic Virus Infection. Cancer Cell. 2015 Aug 10;28(2):210–24.
- 53. Biswas T, Gu X, Yang J, Ellies LG, Sun LZ. Attenuation of TGF-β signaling supports tumor progression of a mesenchymal-like mammary tumor cell line in a syngeneic murine model. Cancer Lett. 2014 Apr 28;346(1):129–38.
- 54. Sow HS, Ren J, Camps M, Ossendorp F, Ten Dijke P. Combined inhibition of TGF-β signaling and the PD-11 immune checkpoint is differentially effective in tumor models. Cells. 2019 Apr 1;8(4).
- 55. Dahal A, Hong Y, Mathew JS, Geber A, Eckl S, Renner S, et al. Platelet-activating factor (PAF) promotes immunosuppressive neutrophil differentiation within tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2024 Aug 27;121(35).
- 56. Iwamoto SI, Kawasaki T, Kambayashi JI, Ariyoshi H, Monden M. Platelet Microparticles: A Carrier of Platelet-Activating Factor? 1996.
- 57. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. Journal of Clinical Investigation. 2012 Jul 2;122(7):2661–71.
- 58. Cedervall J, Zhang Y, Huang H, Zhang L, Femel J, Dimberg A, et al. Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals. Cancer Res. 2015 Jul 1;75(13):2653–62.
- 59. Zaslavsky AB, Adams MP, Cao X, Maj T, Choi JE, Stangl-Kremser J, et al. Platelet PD-L1 suppresses anti-cancer immune cell activity in PD-L1 negative tumors. Sci Rep. 2020 Dec 1;10(1).

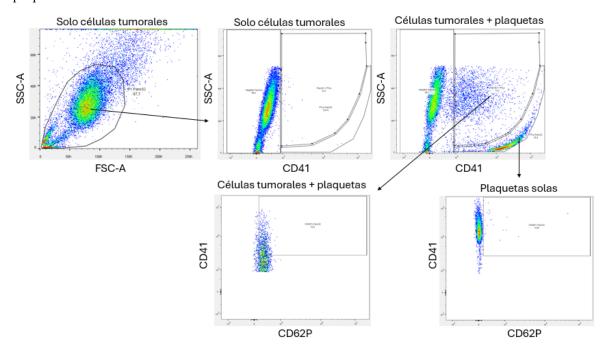
## **Anexos**



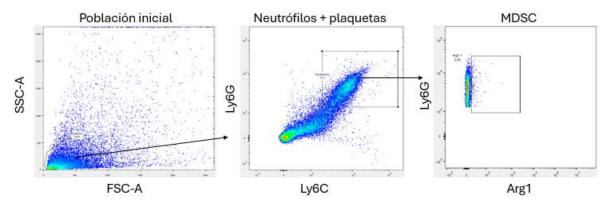
**Figura 10.** Análisis en FACS representativo de una población de plaquetas en estado basal y plaquetas activadas con trombina.



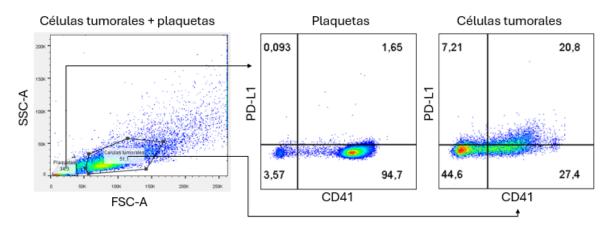
**Figura 11.** Estrategia de *gating* utilizada para el análisis por citometría de flujo de los ensayos de activación plaquetaria.



**Figura 12.** Estrategia de *gating* para el análisis por citometría de flujo de los ensayos de activación plaquetaria, subdividiendo los agregados célula tumoral-plaqueta de las plaquetas no unidas a células tumorales.



**Figura 13.** Estrategia de *gating* para el análisis por citometría de flujo de los ensayos de diferenciación de neutrófilos a MDSCs.



**Figura 14.** Estrategia de *gating* para el análisis por citometría de flujo de los ensayos de expresión de PD-L1 en Mc38.