



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**FUNCION DE LAS PLAQUETAS EN EL  
DESARROLLO TUMORAL**

**Autor: Moisés Juárez Melchor**

**Tutora: Almudena Porras Gallo**

**Convocatoria: Julio 2020**

## RESUMEN

Las plaquetas son estructuras anucleadas que circulan por el torrente sanguíneo. En su interior contienen multitud de moléculas bioactivas tales como factores de crecimiento, moléculas pro- y anti-angiogénicas, quimioquinas y citoquinas proinflamatorias almacenadas en compartimentos denominados gránulos, entre los que destacan: gránulos  $\alpha$  y gránulos densos. Las plaquetas liberan estas sustancias tras su activación, lo que contribuye, no solo a funciones homeostáticas, sino a otras funciones importantes como es el desarrollo y progresión tumoral.

Las plaquetas participan de forma activa en las diferentes etapas del proceso tumoral. En este trabajo resaltaremos su influencia y la de moléculas bioactivas contenidas en su interior como VEGF o TFG- $\beta$  que parecen tener un papel fundamental en la angiogénesis y el proceso metastásico en el cáncer de mama, dos de las características más determinantes durante el crecimiento y desarrollo tumoral.

Asimismo, daremos un nuevo enfoque a los mecanismos de generación de resistencia en pacientes con cáncer frente a los tratamientos antitumorales debido a la acción plaquetaria como, por ejemplo, la regulación de genes relacionados con la apoptosis en células tumorales o el aumento en la expresión de proteínas que contribuyen al proceso.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 1. Plaquetas

Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados obtenidos mediante la escisión citoplasmática de los megacariocitos mediante un proceso conocido como trombopoyesis. A su vez, los megacariocitos proceden de células madre hematopoyéticas (HSCs) de la medula ósea y se forman mediante un proceso conocido como megacariopoyesis (1,2). La diferenciación de megacariocitos generados a partir de HSCs se ve favorecida por la presencia de la trombopoyetina (TPO) y su unión al receptor MPL en HSCs. La acción de moléculas como la interleuquina-3 (IL-3), factores estimuladores de colonias (CSFs), IL-6 o IL-11 también inducen este proceso. La interacción de los megacariocitos con células endoteliales en los sinusoides vasculares, gracias a la acción de quimioquinas como el factor derivado de células estromales (SDF-1), y con proteínas de matriz extracelular como colágeno IV, fibronectina, fibrinógeno o factor von Willebrand (vWF), entre otros, promueven la formación de prolongaciones citoplasmáticas que darán lugar a las denominadas proplaquetas. La fragmentación de estas prolongaciones origina las plaquetas individuales (2). Una vez formadas, las plaquetas circulan principalmente en sangre periférica debido a las propiedades físicas y biológicas de la sangre que dificultan su integridad. Otra parte, es almacenada en el bazo. Su concentración normal en sangre es de 150 a 350 x 10<sup>6</sup> /mL y su vida media es de 7 a 10 días hasta ser destruidas por células fagocíticas del

bazo e hígado (3). La presencia de fosfatidilserina en su superficie o la pérdida de un resto de azúcar con ácido siálico en glucoproteínas de superficie promueven su destrucción (1).

Las plaquetas presentan una estructura en la que destaca una membrana externa, conocida como glicocálix, compuesta por glucoproteínas y fosfolípidos que le confieren carga negativa (4). Las proteínas de membrana permiten la unión de ligandos y moléculas excretadas, tanto de forma autocrina como paracrina que favorecen la activación plaquetaria. La presencia de invaginaciones en la membrana da origen al sistema canalicular abierto que permite el intercambio de moléculas bioactivas con el medio extraplaquetario y al sistema tubular denso que es el principal regulador de iones calcio en el interior (3,4).

En el interior plaquetario se puede observar diferentes orgánulos citoplasmáticos como mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, gránulos  $\alpha$  y gránulos densos. Estos gránulos contienen numerosas sustancias como factores de crecimiento, entre los que se distinguen, el factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (*platelet derived growth factor*), el factor de crecimiento epidérmico EGF (*Epidermal growth factor*), el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) o el factor de crecimiento transformante de tipo  $\beta$  (*TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$* ). También se encuentran en su interior, moléculas de adhesión como la P-selectina, citoquinas proinflamatorias, aminas biógenas como la serotonina (5 HT), iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , ADP (*adenosine diphosphate*) y ATP (*adenosine triphosphate*), entre otros (3,4). Estas moléculas son obtenidas en su mayor parte durante su síntesis por transferencia directa desde los megacariocitos. Sin embargo, también pueden ser endocitadas durante la circulación, así como ser obtenidas por *síntesis de novo* tras la activación plaquetaria (5).

Las plaquetas circulan de forma inactiva por la sangre, su activación se inicia con un cambio conformacional ante una lesión en el endotelio vascular. Este cambio en su morfología favorece la exposición de receptores de membrana que facilitan la adhesión y posterior agregación plaquetaria. Tras ello, se produce la liberación de moléculas contenidas en el interior de sus gránulos que contribuyen a sus acciones fisiológicas (6).

Como bien es sabido, las plaquetas participan de forma activa en la hemostasia y la coagulación sanguínea mediante la formación de trombos. No obstante, presentan otras funciones muy heterogéneas entre las que se incluyen regulación de la inflamación, inmunidad, angiogénesis o metástasis tumoral (7).

## **2. Cáncer y sus características**

El cáncer es una de las principales causas de muerte y morbilidad en todo el mundo. En el año 2018, se estimó que hubo 18 millones de nuevos casos de cáncer y que acabó con la vida de más de 9,5 millones de personas (8). Uno de los cánceres más prevalentes a nivel mundial es el cáncer de mama, tratándose de la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial. Se estima que la tasa de supervivencia promedio a 5 años de las mujeres con cáncer de mama invasivo es del 90 %. No obstante, en aquellas pacientes que presentan metástasis el porcentaje disminuye a tan solo un 27%. Entre las localizaciones metastásicas más frecuentes en este tipo de cáncer se encuentran el cerebro, el tejido óseo, los pulmones y el hígado (9).

Las células tumorales presentan unas propiedades que difieren del resto de células normales de nuestro organismo. Hanahan y Weiberg establecieron en el año 2000 seis características que poseen la mayoría de las células tumorales y que contribuyen a su malignidad. Estas características son las siguientes:

- i) Crecimiento sostenido
- ii) Falta de respuesta a señales antiproliferativas
- iii) Evasión de la apoptosis
- iv) Potencial replicativo ilimitado
- v) Angiogénesis sostenida
- vi) Invasión de tejidos y metástasis

### **Crecimiento sostenido**

Las células cancerígenas son capaces de alterar y mantener las señales proliferativas mediante la liberación de forma autocrina o paracrina de moléculas bioactivas regulando así su propio crecimiento. (10). Un ejemplo de ello, son los factores de crecimiento. En tumores de mama o estómago se ha visto una sobreexpresión o alteración estructural del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (11). También, el TGF- $\beta$  en diferentes tumores, ve alteradas sus funciones fisiológicas lo que favorece la desdiferenciación celular. Además, mutaciones en genes supresores de tumores como *p53* o mutaciones en proteínas como Ras participantes en vías de señalización proliferativas son otros ejemplos que contribuyen al crecimiento tumoral (12).

### **Falta de respuesta a señales antiproliferativas**

Las células neoplásicas requieren evitar la acción de señales antiproliferativas que controlen su crecimiento. La proteína de Retinoblastoma (pRb) es la encargada principal de modular estas acciones antiproliferativas. Mutaciones en su gen codificante, receptores o moléculas que regulan su acción contribuyen a esta falta de respuesta. El TGF $\beta$  contribuye al mantenimiento de pRb en su forma activa

hipofosforilada mediante el bloqueo de proteínas quinasa dependiente de ciclina (CDK). Estas proteínas originan el cambio a su forma hiperfosforilada inactivándola. Cambios en la acción del TGFβ reprimen las acciones antiproliferativas. Otro ejemplo, es la sobreexpresión del oncogén Myc. Myc forma complejos con otros factores de transcripción que alteran las señales antiproliferativas (11).

### **Evasión de la apoptosis**

La supervivencia celular está regulada por señales antiapoptóticas y proapoptóticas. Cuando se observan alteraciones celulares se induce la apoptosis mediante la acción del citocromo c mitocondrial o la activación de receptores de muerte (p. ej. FAS o TNF α). Esta acción apoptótica está regulada por proteínas como son las de la familia de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) o el gen supresor de tumores *p53* que puede verse mutado. También, la evasión de la apoptosis puede deberse a alteraciones en la vía PI3 quinasa/AKT. Esta vía puede sufrir modificaciones, gracias a la activación mediante expresión de ligandos pro-tumorales como los factores de crecimiento de tipo insulínico (IGF) o por alteraciones en genes como *PTEN* que regulan dicha vía (11).

### **Potencial replicativo ilimitado**

El número de divisiones que puede sufrir una célula somática es limitado. Este hecho, es producto de la pérdida progresiva durante los ciclos celulares de los telómeros, estructuras presentes en los extremos de los cromosomas. Su acortamiento progresivo da lugar a la senescencia celular (13). Las células tumorales evitan este proceso mediante la reactivación de la enzima telomerasa. Esta reactivación, favorece la replicación de los extremos cromosómicos, evitando la pérdida telomérica, adquiriendo así un potencial replicativo ilimitado. El alargamiento de telómeros mediante el empleo de ADN de repetición telomérica extracromosómica (ECTR) también propicia esta capacidad replicativa ilimitada (13).

### **Angiogénesis sostenida**

En condiciones fisiológicas, la angiogénesis está regulada por señales antiangiogénicas y proangiogénicas y limitada a procesos como la reparación de tejidos o al ciclo reproductivo femenino. Las células tumorales son capaces de alterar estas señales y dar lugar a una angiogénesis continua, aunque el crecimiento de nuevos vasos será un proceso anormal y caótico. Las células tumorales mediante diferentes mecanismos aumentan el número de inductores angiogénicos como en el caso del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), entre otros (11). El factor de transcripción, HIF-1, induce la expresión de VEGF en situaciones de hipoxia, evento que ocurre en la mayoría de los tumores (14). Del mismo modo, la expresión de oncogenes como *Ras* o *Myc* o la represión del gen supresor de tumores *Von Hippel-Lindau (VHL)*

también aumentan su expresión (12). También, existen inhibidores angiogénicos como la trombospondina-1 (TSP-1) o el interferón beta, entre otros. La expresión de TSP-1 está regulada por el gen supresor de tumores *p53*. Como hemos visto, este gen se encuentra alterado en numerosos tumores, luego puede afectar a la expresión de la misma, lo que disminuye los estímulos antiangiogénicos y favorece así la angiogénesis (11). Además, las células del microambiente tumoral como células derivadas de la médula ósea, pericitos o células inmunes presentan un papel crucial en la angiogénesis mediante la liberación de factores angiogénicos (12).

### **Invasión de tejidos y metástasis**

La invasión y metástasis dependen de células tumorales que sean capaces de abandonar el tumor primario, pero, para ello, requieren modificar sus características. Una de ellas, es la adhesión célula-célula (CAM). Numerosos estudios sugieren que la mayoría de células tumorales sufre un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT) que hace que aumente su motilidad y capacidad invasiva (11). Las células tumorales son capaces de modular la acción de células en el ambiente tumoral que favorece, entre otros procesos, la degradación de la matriz extracelular (ECM) y su posterior extravasación a sangre al liberar moléculas como MMP o citoquinas. También, este control sobre células del ambiente tumoral contribuye a su supervivencia por el torrente sanguíneo, facilita la adhesión en zonas distantes del organismo y promueve el establecimiento de nuevas colonias de células tumorales en órganos secundarios, dando lugar así al proceso metastásico completo (12).

Tras establecer estos rasgos distintivos que identifican al cáncer, Hanahan y Weiberg llevaron a cabo otra revisión en el año 2011, estableciendo nuevos atributos no estudiados anteriormente, pero que presentan un papel fundamental en el desarrollo del cáncer.

- vii) Inestabilidad genómica y mutaciones
- viii) Inflamación
- ix) Reprogramación del metabolismo energético
- x) Evasión de la respuesta inmune

### **Inestabilidad genómica y mutaciones**

Como hemos visto anteriormente, las mutaciones génicas son un evento necesario para su desarrollo. Estas mutaciones no son las únicas, ya que la metilación del ADN o la acetilación de histonas producen mutaciones epigenéticas que no afectan a la regulación de la expresión génica. Estas mutaciones afectan a los genes encargados del correcto mantenimiento del ADN como son los genes denominados “guardianes” del genoma o genes supresores de tumores. Los análisis de células tumorales mediante

la técnica de hibridación genómica comparativa (CGH) han detectado una pérdida de integridad en el conjunto genómico en células neoplásicas (12).

### **Inflamación**

La presencia de células promotoras de la inflamación como las células inmunes son un hecho probado en el ambiente tumoral. Su presencia favorece el desarrollo tumoral mediante la liberación de factores de crecimiento, factores angiogénicos, moléculas modificadoras de la matriz extracelular, factores de supervivencia, etc. Además, estas células que promueven la inflamación pueden provocar la generación de especies reactivas que aumentan las mutaciones, lo que favorece aún más el proceso tumoral (12).

### **Reprogramación del metabolismo energético**

Las células tumorales tienen alterada su forma de obtener energía. Llevan a cabo un proceso conocido como glucólisis aeróbica, por la cual, aún en presencia de oxígeno, obtienen su energía mediante la transformación de glucosa a lactato en vez de emplear la fosforilación oxidativa. Este proceso se conoce como el “Efecto Warburg”. Mutaciones en el gen *Ras* o la ausencia de oxígeno en el ambiente tumoral promueven la expresión de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ , que, a su vez, modulan el aumento de transportadores de glucosa (GLUT) supliendo así la deficiencia en ATP que genera el proceso. La consecuencia de este cambio en el metabolismo energético permite la formación de productos intermedios que sirven como base para la obtención de moléculas a través de rutas biosintéticas necesarias para el desarrollo y progresión tumoral como por ejemplo la síntesis de DNA (12).

### **Evasión de la respuesta inmune**

El sistema inmune, en presencia de células tumorales, lleva a cabo un proceso conocido como inmunoedición, por el cual, las células tumorales más inmunogénicas son eliminadas, mientras que las más resistentes escapan de esta vigilancia, lo que favorece su desarrollo. Esta resistencia y, por consiguiente, la evasión de la respuesta inmune es debido a la secreción de factores solubles. Algún ejemplo, es la liberación de quimioquinas como CCL21 que modifican la acción de linfocitos o TGF $\beta$  que hace lo propio con linfocitos T CD8 o natural killers (NK) (12).

## **3. Papel de las plaquetas en desarrollo tumoral**

Ya en el s. XIX se observó una relación causal entre pacientes con cáncer y una mayor presencia de enfermedades tromboembólicas. La trombocitosis es un rasgo observado con frecuencia en dichos pacientes, lo que sugiere una implicación directa entre la coagulación sanguínea, las plaquetas y su acción sobre el desarrollo tumoral (15). Estudios en ratones con cáncer ovárico mostraron que las células tumorales pueden liberar citoquinas como la IL-6 que estimulen la formación de factores claves

en la producción plaquetaria, como en el caso de la trombopoyetina (TPO) (16). Hoy en día, se sabe que altos niveles de plaquetas están asociados a un peor pronóstico en la evolución de la enfermedad como se ha observado en cánceres de mama, próstata, pulmón o colon, entre otros (15,17).

Las células tumorales son capaces de inducir la activación y agregación plaquetaria independientemente de las señales fisiológicas del organismo mediante la secreción de moléculas solubles como ADP y trombina o la expresión de integrinas (p. ej. GPIIb-IIIa y  $\alpha_v \beta_3$ ) y moléculas de adhesión como la podoplanina que favorecen la activación. Este proceso se conoce como agregación plaquetaria inducida por células tumorales (TCIPA) (16,18). Además, pueden inducir la activación y agregación plaquetaria de forma indirecta modulando la acción de células como macrófagos y granulocitos en su interacción con las plaquetas o promoviendo la coagulación sanguínea, gracias a la expresión del factor tisular (FT) en su superficie (16,19).

TCIPA induce la liberación de moléculas bioactivas contenidas en sus gránulos que promueven la angiogénesis y el aumento en la capacidad metastásica tumoral. El papel de las plaquetas sobre la angiogénesis tumoral se debe, principalmente, a la liberación de factores proangiogénicos contenidos en sus gránulos  $\alpha$  como VEGF, PDGF o TGF- $\beta$ 1, entre otros. Sin embargo, también pueden liberar factores con propiedades antiangiogénicas. La endostatina, el factor plaquetario 4 (PF4) o la trombospondina (TSP-1) son algunos de los más destacados (19). Se ha observado que la liberación de estos factores al encontrarse almacenados en diferentes gránulos es dependiente del estímulo. De esta forma, la estimulación de receptores plaquetarios como PAR-1, GPVI o  $P_2 Y_{12}$  promueve la liberación de factores angiogénicos como VEGF, en contraste con la activación de PAR-4 o TXA2 que aumenta los niveles en suero de la molécula antiangiogénica, endostatina (19). Diversos estudios en ratones mostraron que los factores reguladores de la angiogénesis tumoral contenidos en gránulos densos no parecen tener un efecto determinante sobre la misma (20). Igualmente, tanto la presencia de fosfolípidos en la membrana plaquetaria (p. ej. ácido lisofosfatídico (LPA) y la esfingosina-1-fosfato (S1P)) como las micropartículas derivadas de plaquetas (PMPs) contribuyen a la neovascularización tumoral. Las PMPs promueven la transferencia de mRNA a células endoteliales, la expresión del FT en su superficie o la liberación de factores proangiogénicos como VEGF, PDGF o metaloproteinasas de matriz (MMP) contenidos en su interior (16). Además de favorecer la angiogénesis, las plaquetas mediante la liberación continua de moléculas como la angiopoyetina 1 (ANGPT-1) y la serotonina (5-HT) de los gránulos plaquetarios evitan la hemorragia intratumoral (21).

Por otra parte, el papel de las plaquetas en la metástasis se ha observado en los numerosos eventos que constituyen el proceso metastásico. Una de las etapas claves en el proceso, es la transición epitelio-mesénquima (EMT) en las células tumorales. Este cambio, disminuye la adhesión entre

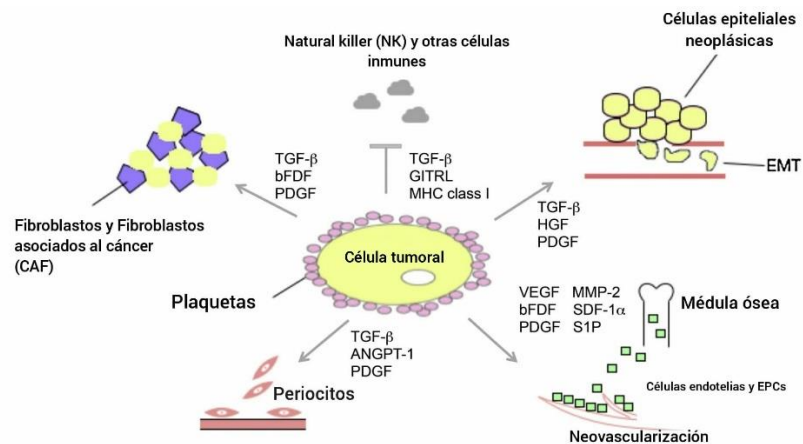


células tumorales, provoca una pérdida de la polaridad y de marcadores epiteliales, adquiriendo características mesenquimales, lo que hace que aumente su motilidad y capacidad migratoria, favoreciendo su salida a sangre (21–23). El proceso de EMT se activa en condiciones fisiológicas como la embriogénesis y la cicatrización de heridas. Sin embargo, las células tumorales son capaces de reactivar este proceso lo que favorece la metástasis (22,23). Las plaquetas, al igual que en el proceso angiogénico, liberan moléculas contenidas en sus gránulos que contribuyen a esta transformación de las células tumorales. El TGF $\beta$  liberado por las plaquetas y los contactos directos de células tumorales con plaquetas activan principalmente la vía TGF $\beta$ /Smad en las células cancerosas. Esta vía activa la expresión de proteínas de células mesenquimales como vimentina, N-cadherina o MMPs. Las MMPs favorecen la degradación de la matriz extracelular, lo que facilita su migración e invasión. Por otra parte, también reprime la expresión de proteínas características de células epiteliales como E-cadherina o Claudina, lo que favorece una transición a un fenotipo mesenquimal, adquiriendo capacidad invasiva y metastásica (23). Además, diferentes estudios en animales mostraron que la inhibición del TGF $\beta$  provocaba una menor intravasación y capacidad metastásica pulmonar (24). El TGF $\beta$  también modula la acción de células del sistema inmune como las células NK al bloquear la vía NKG2D, lo que deriva en una disminución en su acción citotóxica contra las células tumorales, favoreciendo su supervivencia (19). Otras moléculas derivadas de plaquetas como el PDGF, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o mi-RNAs (“*micro Ribonucleic acids*”) procedentes de PMPs también contribuyen a esta transición celular (21).

Una vez en circulación sanguínea, las células tumorales circulantes (CTCs) forman agregados con plaquetas y reciben moléculas antigénicas MHC-I (Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I) procedentes de estas mismas. Todo esto dificulta su reconocimiento por células inmunitarias, lo que contribuye aún más a su supervivencia y facilita el avance en la cascada metastásica (19). Del mismo modo, la formación de estos agregados permite a las células tumorales anclarse al endotelio vascular gracias a moléculas de adhesión de las plaquetas como P-selectina o integrinas como GPIIb $\alpha$  o  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 expresadas en la superficie plaquetaria. Asimismo, las plaquetas gracias a moléculas contenidas en sus gránulos como Tromboxano A<sub>2</sub>, ATP, ADP, histamina y serotonina pueden modular la permeabilidad de los vasos al exponer la membrana basal e inducir la retracción de las células endoteliales lo que favorece otra etapa del proceso metastásico, la extravasación celular (7). El reclutamiento de otras células como granulocitos, fibroblastos, pericitos o macrófagos al microambiente tumoral mediante la liberación de quimioquinas (RANTES, MCP - 2 o CXCL7) o factores de crecimiento (TGF $\beta$ , PDGF) por parte de las plaquetas favorece el establecimiento de nichos metastásicos (5,7,17).

La contribución de las plaquetas al desarrollo tumoral mediante la promoción de la angiogénesis y metástasis es evidente. Sin embargo, no parece ser la única forma que presentan para favorecer dicho

desarrollo. Recientemente, se ha estudiado la posible implicación de las plaquetas en la aparición de resistencia frente a los tratamientos antitumorales, lo que contribuiría aún más al proceso tumoral (21).



**FIGURA 1 (5).** Acciones derivadas de la interacción plaqueta-célula tumoral sobre células del microambiente tumoral.

## OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo es estudiar el papel de las plaquetas en el desarrollo tumoral. En concreto, los objetivos específicos son:

- 1- Determinar la influencia directa de las plaquetas sobre la angiogénesis y la generación de metástasis en el cáncer de mama.
- 2- Estudiar la participación de las mismas en la generación de resistencia a fármacos durante el tratamiento antitumoral.

## METODOLOGÍA

La elaboración de este trabajo se ha realizado en base a una revisión bibliográfica de artículos procedentes de diversas fuentes y bases de datos, entre las que se encuentran, Pubmed (NCBI), MedlinePlus (NIH), revistas científicas internacionales y libros de ámbito científico. Para la elaboración del mismo se han empleado palabras claves como "*platelets*", "*cancer*", "*platelets and breast cancer*", "*angiogenesis*", "*metastasis*", "*platelets and chemoresistance*".

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Plaquetas y su influencia en el cáncer de mama

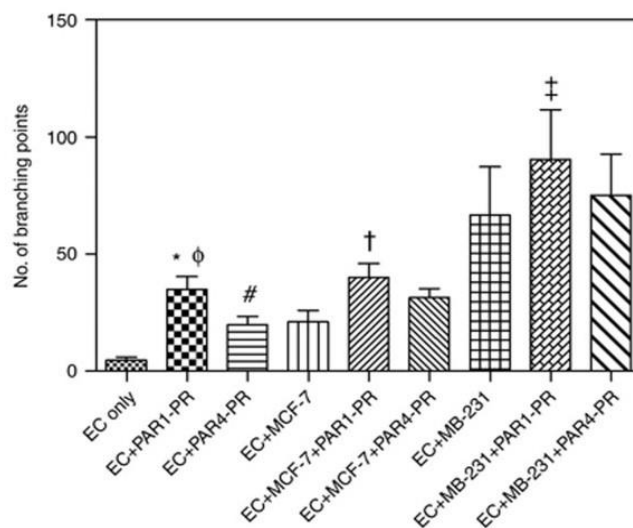
#### a) Acción de las plaquetas sobre la angiogénesis

El papel central de las plaquetas en la angiogénesis tumoral es evidente. Diferentes estudios mostraron que la ausencia de plaquetas no solo disminuye la formación de nuevos vasos, sino que retrasa las etapas iniciales de la angiogénesis (16,20). Las plaquetas, como hemos mencionado anteriormente, modulan la angiogénesis tumoral al liberar factores contenidos en sus gránulos.

Para observar la influencia de estos factores liberados por plaquetas en el crecimiento tumoral y la angiogénesis, *Jiang et al* (25) emplearon líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) cultivadas con plaquetas activadas mediante la estimulación de sus receptores activados por proteasas (PAR1 y PAR4).

La estimulación de los receptores con factores liberados por plaquetas (PAR1-PR y PAR4-PR) indujo un mayor aumento en la proliferación y división celular en las células tumorales que la estimulación de los mismos receptores plaquetarios con péptidos activadores (PAR1-AP y PAR4-AP). Además, se determinó la capacidad de división celular empleando técnicas fluorimétricas mediante tinción CFSE (“*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*”). Tras 96h, los resultados arrojaron una disminución en las señales de fluorescencia en células tumorales tratadas con PAR1-PR y PAR4-PR debido a una intensa proliferación celular con respecto al cultivo de células tumorales sin tratar que no presentó una disminución tan evidente (25).

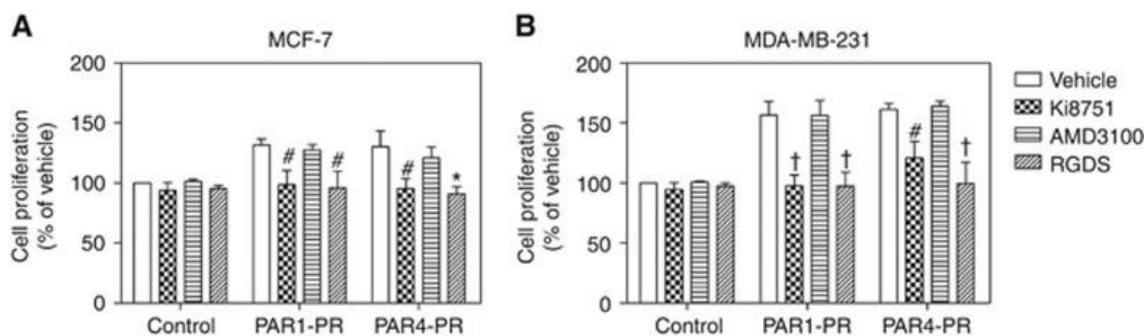
Por otra parte, el cultivo *in vitro* de células MCF-7 y MDA-MB-231 con los factores liberados por plaquetas, PAR1-PR y PAR4-PR, en presencia de células humanas endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) fue clave para observar un aumento destacado en la formación de nuevos vasos. Este aumento no fue tan notorio tras el cultivo de las células tumorales únicamente con HUVEC. Además, al igual que en estudios anteriores se observó una mayor potencia angiogénica tras la estimulación con PAR1-PR que con respecto a PAR4-PR (25,26). La cuantificación de la actividad angiogénica en base a los puntos de ramificación de la red capilar confirmaron estos hechos (25).



**FIGURA 2.** Número de puntos de ramificación de red capilar que hace referencia a la actividad angiogénica endotelial de los diferentes cultivos del estudio.

Estudios *in vivo* en ratones desnudos a los que se les inyectaron células MDA-MB-231 confirmaron estos resultados al mostrar un mayor crecimiento de aquellos tumores que presentaban estimulación por PAR1-PR y PAR4-PR frente a aquellos que no presentaban dicha estimulación. Del mismo modo, se observó un mayor índice angiogénico en aquellos tumores que presentan estimulación por PAR1-PR frente a PAR4-PR (25).

Se estudiaron, además, las posibles moléculas liberadas por plaquetas que estimulaban el proceso, así como las vías de señalización que se activaban durante el mismo. La inhibición del receptor VEGFR2 mediante el inhibidor Ki8751, así como de integrinas plaquetarias por el péptido bloqueante de RGD, presente en integrinas, causó una atenuación importante en la proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231 con respecto al cultivo de las células tumorales en presencia de otros inhibidores que no indujeron una regresión en la proliferación (25).



**FIGURA 3.** Porcentaje de proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231 tras el bloqueo de posibles moléculas que participan en el proceso.

En cuanto a las vías de señalización, el bloqueo de la vía PI3K y PKC mostró un crecimiento en las células neoplásicas similar al cultivo celular tratado con vehículo (25).

VEGF se libera en mayor medida por las plaquetas y sus niveles elevados en suero se relacionan con un aumento en el recuento plaquetario, así como con una disminución en la supervivencia del paciente (16,19) Además, diferentes estudios muestran que las células de cáncer de mama tratadas con el agente antitumoral, tamoxifeno, así como con fármacos antiplaquetarios como fondaparinux o diferentes clases de heparinas presentan una menor capacidad angiogénica tumoral debido a una regulación negativa en la liberación de VEGF (27,28).

Por otra parte, Wang *et al* (29). mediante el estudio de la influencia de estos factores proangiogénicos sobre la angiogénesis en líneas celulares del cáncer de mama, demostraron que la disminución de los niveles séricos de PDGF-B, debido al empleo del fármaco antidiabético metformina, se tradujo en una disminución en la angiogénesis tumoral y en una mayor maduración de la vasculatura (29). PDGF participa en la angiogénesis tumoral al llevar a cabo acciones como el reclutamiento de pericitos al

microambiente tumoral, lo que favorece la maduración de los nuevos vasos, promover la proliferación endotelial o contribuir a la linfangiogénesis (30).

Aunque la contribución de los factores almacenados en los gránulos de plaquetas promueve de forma ostensible la angiogénesis tumoral en células de cáncer de mama, no es la única aportación plaquetaria al proceso. Las plaquetas presentan fosfolípidos en su membrana como el ácido fosfatídico (PA), el ácido lisofosfatídico (LPA) o esfingosina-1-fosfato (S1P), que son capaces de favorecer el reclutamiento y la adhesión de células endoteliales para la formación de nuevos vasos en las células tumorales de mama, lo que contribuye al proceso angiogénico (31,32).

Los últimos descubrimientos referentes al papel de las plaquetas en la angiogénesis tumoral residen en la transferencia de mRNA, así como de otras moléculas contenidas en las denominadas micropartículas derivadas de plaquetas (PMPs). La activación plaquetaria, la activación de la cascada de coagulación o la hipoxia generada en el microambiente tumoral son eventos claves en la progresión del tumor y estimulan la formación de estas microvesículas. Las PMPs contienen en su interior factores proangiogénicos como VEGF, PDGF o MMP (16). De este modo, pueden presentar una acción directa en la angiogénesis tumoral como se observó en un estudio sobre células tumorales de próstata, donde las PMPs favorecieron la liberación de MMP-2, lo que contribuyó a un aumento en la permeabilidad vascular (33). La acción de los mRNA derivados de PMPs sobre la angiogénesis en cáncer de mama no ha sido estudiada aún. Bien es cierto, que recientemente se ha observado su acción en otras etapas de la progresión tumoral como la metástasis. La transmisión del mRNA TPM3 procedente de PMPs favoreció un fenotipo tumoral agresivo en células tumorales de mama (34). Este hecho, sumado al que se observó en un estudio donde las células endoteliales fueron capaces de captar mRNA derivado de PMPs lo que se tradujo en la expresión de moléculas implicadas en el proceso tumoral, hacen indicar un posible papel de PMPs en la formación de nuevos vasos (35).

Estos resultados sugieren un papel central de las plaquetas en la angiogénesis en células de cáncer de mama y que dicho papel radica principalmente en la acción de factores angiogénicos contenidos en sus gránulos. *Jiang et al* demostraron que los factores liberados por plaquetas mediante la estimulación de los receptores PAR1 y PAR4 favorecieron la división y proliferación celular en células MCF-7 y MB-MDA-231 además de presentar un papel clave en la angiogénesis tumoral al potenciar la formación de nuevos vasos tras el contacto con dichas células. La mayor potencia angiogénica observada tras la estimulación mediante PAR1-PR insinúa un mayor contenido de moléculas proangiogénicas que se liberan tras la activación de este receptor plaquetario. Estos hechos, también fueron confirmados *in vivo*, lo que refuerza aún más la idea de la influencia de los factores liberados por plaquetas sobre el crecimiento y la angiogénesis tumoral. La acción conjunta entre VEGF e

integrinas plaquetarias parece ser la responsable en la consecución de estos eventos mediante la activación de vías de señalización como PI3K y PKC.

Del mismo modo, otros estudios demostraron la implicación de otros factores plaquetarios como PDGF-B sobre la angiogénesis tumoral en este tipo de células tumorales. Sin embargo, estos factores plaquetarios no son la única forma que tienen las plaquetas de contribuir al proceso, la acción de PMPs o de lípidos presentes en su superficie también parecen promover la formación de nuevos vasos tumorales.

#### **b) Efecto de las plaquetas sobre su capacidad metastática**

Las plaquetas como hemos visto anteriormente participan de forma activa en todas las etapas del proceso metastático, lo que contribuye directamente al desarrollo tumoral.

*Zuo et al* (36). llevaron a cabo un estudio con el que pretendían dilucidar el papel de las plaquetas sobre la transición epitelio mesénquima (EMT) en células tumorales, así como su influencia en la capacidad metastática. Para ello, exploraron la posible relación existente entre las plaquetas y fragmentos plaquetarios en líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7. Se emplearon diferentes grupos de compuestos:

1. Grupo control (vehículo)
2. Plaquetas activadas procedentes de sangre humana
3. Componentes activos procedentes de plaquetas activas (factores liberados por plaquetas)
4. Membranas plaquetarias sin componentes activos (gránulos)

Se determinó la capacidad invasiva de las células MCF-7 cultivadas en presencia de cada uno de estos compuestos, así como los niveles de expresión tanto de mRNA de factores de transcripción inductores de la EMT (Snail, Slug) o proteínas relacionadas con ella como E-cadherina, así como niveles de proteínas asociadas a la remodelación de la matriz extracelular (ECM) (Fibronectina, COL1A1 y MMP-9) (36).

- Tanto en el grupo de plaquetas activadas como en el grupo de gránulos se demostró que el contacto directo con las células MCF-7 promovió un aumento en la capacidad invasiva de las células tumorales. En contraste, el cultivo de MCF-7 con los factores plaquetarios no influyó de forma relevante en dicho evento, obteniendo niveles semejantes al cultivo control (36).
- El aumento en la expresión de los mRNA de factores de transcripción como Slug, Snail, así como la disminución del marcador mesenquimal, E-cadherina, tras el contacto fue significativamente mayor en el grupo de plaquetas y gránulos, mientras que los niveles de expresión de estos factores tras el contacto con los factores liberados por plaquetas fueron similares al observado en el cultivo único de células tumorales. Por otra parte, los niveles de proteínas de remodelación de ECM

mostraron, al igual que en el caso anterior, valores más altos en el cultivo de las células neoplásicas con plaquetas y gránulos que con el liberado de plaquetas (36).

Tras conocer la influencia de las plaquetas en la progresión tumoral, Zuo et al (36) pretendieron, mediante la inhibición de proteínas de adhesión de la superficie de células tumorales MCF-7, deducir cuales eran las que mediaban la interacción con plaquetas, así como las vías de señalización que se activaban tras dicho contacto (36).

Los resultados mostraron que la inhibición de la integrina tumoral  $\alpha_2\beta_1$  derivó en una mayor disminución en la síntesis de Snail y provocó un aumento en la expresión de E-cadherina, moléculas que participan en la EMT. E-cadherina está implicada en la adhesión célula-célula (CAM) y dificulta la motilidad y la capacidad invasiva tumoral. En cuanto a las vías de señalización, la molécula  $\beta$ -catenina presentó un aumento de sus niveles en citoplasma y núcleo tras el contacto entre las células MCF-7 con plaquetas y gránulos.  $\beta$ -catenina participa en la vía WNT/  $\beta$ -catenina, lo que sugiere la participación de dicha vía en el proceso metastásico. Además, tanto el bloqueo de la vía WNT/  $\beta$ -catenina como el bloqueo de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  provocaron una disminución en los niveles de  $\beta$ -catenina y una menor capacidad invasiva (36).

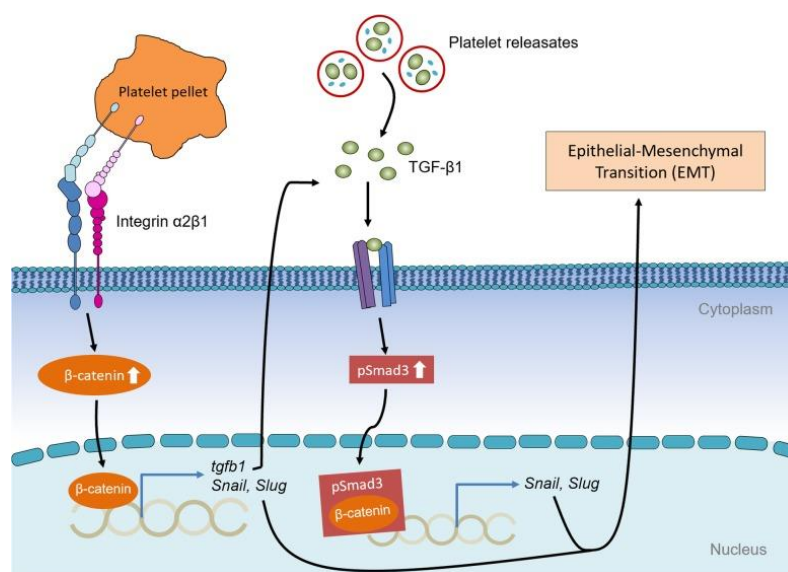
Por otra parte, se determinaron los niveles del mRNA *tgf- $\beta$ 1*, así como de proteína TGF- $\beta$ 1. En estudios anteriores se observó que TGF- $\beta$ 1 promueve la fosforilación de pSmad3 lo que activa la vía TGF- $\beta$ 1/Smad3 la cual se relacionó con la progresión metastásica en células de cáncer de mama (37). Tanto el mRNA *tgf- $\beta$ 1* como la proteína, TGF- $\beta$ 1, y los niveles de P-Smad3 aumentaron en las horas posteriores al contacto entre MCF-7/ plaquetas y MCF-7/gránulos. Es de destacar que el bloqueo de la vía WNT/  $\beta$ -catenina provocó una disminución en los mismos (36).

Estos estudios también fueron realizados *in vivo* en ratones desnudos mediante la inyección por vía intravenosa de células MCF-7. Los resultados obtenidos al igual que en los estudios *in vitro*, mostraron que el silenciamiento de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  en las células MCF-7 y su posterior interacción con plaquetas (Si-MCF-7/plaquetas) produjo una disminución en el tamaño tumoral de las masas metastásicas en pulmón, observado mediante tinción HE ("*Hematoxylin and eosin*") con respecto a células que no presentaban dicha inhibición (MCF-7/plaquetas). Del mismo modo, los niveles de  $\beta$ -catenina y TGF- $\beta$ 1 también disminuyeron en ratones que presentaban el silenciamiento de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  en las células MCF-7 (Si-MCF-7/Plaquetas) con respecto a aquellos que no (MCF-7/plaquetas), aunque los niveles en estos últimos fueron mayores en relación a aquellos ratones que únicamente tenían células MCF-7 (36).

De todos estos resultados se infiere que las plaquetas facilitan la adquisición de un fenotipo invasivo en células tumorales de cáncer de mama. Además, promueven la metástasis tumoral, al favorecer un

aumento o disminución en la expresión de mRNA asociados a proteínas claves en la EMT, así como de proteínas implicadas en la degradación de la matriz extracelular, que favorecen la migración e invasión.

Por otra parte, se deduce que las células tumorales MCF-7 interaccionan con las plaquetas a través de la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , hecho que también fue demostrado en estudios *in vivo*, y que, tras dicha interacción, se activa la vía WNT/  $\beta$ -catenina, que promueve la activación de la vía TGF- $\beta$ 1/Smad3 de forma autocrina (figura 4). Tanto la  $\beta$ -catenina como la interacción de P-Smad3 con  $\beta$ -catenina son capaces de promover la expresión de factores de transcripción como Snail y Slug, por lo que, presentan una influencia directa en la transición epitelio mesénquima (EMT), y, por lo tanto, sobre la capacidad metastásica de las células MCF-7. Además, el bloqueo de la vía TGF- $\beta$ 1/Smad3 mostró una inhibición parcial en la expresión de dichos factores de transcripción, mientras que el bloqueo de la vía WNT/  $\beta$ -catenina produjo una inhibición total (36). Estos hechos sugieren que la vía WNT/  $\beta$ -catenina presenta acción directa sobre la síntesis de Snail y Slug, y que para la activación de la vía TGF- $\beta$ 1/Smad3 y su posterior acción sobre la expresión de estos factores de transcripción es necesario la presencia de TGF- $\beta$ 1 inducido a través de la vía WNT/  $\beta$ -catenina (figura 4). Por lo tanto, la acción de la vía WNT/  $\beta$ -catenina juega un papel fundamental en la invasión metastásica de células MCF-7 al promover la EMT (36).



**FIGURA 4.** Vía de señalización que promueve la expresión de factores de transcripción implicados en EMT tras la interacción plaqueta-célula tumoral.

## **2. Función de las plaquetas en la generación de resistencia frente a los tratamientos antitumorales**

La eficacia en el tratamiento del cáncer se ve de forma frecuente disminuida debido a la aparición de



resistencias a los agentes antitumorales. Como se ha mencionado anteriormente, altos niveles de plaquetas en sangre de pacientes con cáncer se correlacionan con una tasa de supervivencia menor (21).

*Radziwon-Balicka et al* (38). llevaron a cabo una investigación en la que pretendieron estudiar la posible implicación de las plaquetas en la mejora de la capacidad de supervivencia de células tumorales en presencia de agentes quimioterapéuticos. Para ello, emplearon líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) y de ovario (59M), las cuales, se cultivaron con plaquetas en presencia de Paclitaxel y 5-Fluorouracilo (5-FU).

Tras el cultivo de las células tumorales con paclitaxel y 5-FU de forma independiente, así como de las células tumorales con los agentes quimioterapéuticos en presencia de plaquetas, se analizó el número total de células que presentaban apoptosis y necrosis (38).

Los resultados mostraron una menor tasa de células necróticas y apoptóticas tras el cultivo de las células neoplásicas con fármacos en presencia de plaquetas con respecto al tratamiento únicamente con fármacos. Además, la determinación de genes que regulan la apoptosis permitió observar un aumento en la expresión de genes antiapoptóticos como *BCL3*, *RIPK2*, *NF-κB1* en células 59M o *BRIC5*, *REL* y *NF-κB2* en células Caco-2 en presencia de plaquetas. Del mismo modo, se observó una disminución en aquellos que presentan acciones proapoptóticas como *PYCARD*, *CASP2*, *DAPK1*, *LRDD* y *NALP1* en células 59 M. Sin embargo, también se encontró un aumento de genes proapoptóticos en ambas líneas celulares (38).

La determinación de la expresión de las ciclinas A, B1, D1 y E, así como de la fosforilación de proteínas implicadas en reparación del DNA como *BRCA1*, *Chk1*, *Mre11* y *p95/Nbs1* fueron otra pieza fundamental del estudio. Las ciclinas son proteínas que están involucradas en la regulación del ciclo celular y se encuentran elevadas en gran cantidad de cánceres. Por su parte, las proteínas de reparación del DNA son capaces de corregir mutaciones durante la división celular, lo que evita su transmisión a la estirpe descendiente, de este modo, contribuyen al éxito en la división y supervivencia tumoral (38).

Los niveles de expresión de ciclinas en todas las fases celulares de división aumentaron en las células tumorales ováricas 59 M en presencia de plaquetas, tanto bajo el tratamiento con 5-FU como en su ausencia. No ocurrió así en presencia de paclitaxel. Con relación a las proteínas de reparación del DNA, los niveles de fosforilación de todas ellas aumentaron de forma significativa en las células 59 M en presencia de ambos agentes antitumorales y la exposición a plaquetas, aunque el aumento fue más destacado con el tratamiento con 5-FU. Sin embargo, estos resultados no fueron tan apreciables en las células de cáncer de colon (38).

Para concluir, en el estudio de *Radziwon-Balicka et al* (38), demostraron la posible implicación de factores liberados por plaquetas como TSP-1 y RANTES en la protección de células tumorales expuestas a la acción citotóxica de fármacos antineoplásicos, al observar un aumento en la supervivencia de células Caco-2 en presencia de paclitaxel combinado con estas moléculas (38). En la misma línea, otros estudios indicaron que el bloqueo de la acción de TGF- $\beta$ 1 derivado de plaquetas provocó una disminución en la supervivencia de las células de carcinoma pancreático en presencia de cisplatino (39). En células tumorales testiculares, se observó una relación directa entre PDGFR $\beta$ , PDGF y la resistencia a cisplatino, ya que, la inhibición del receptor provocó un aumento en la sensibilidad al tratamiento antitumoral (40).

Estos resultados sugieren que las plaquetas contrarrestan los efectos farmacológicos de los agentes antitumorales mediante diversos mecanismos. Uno de ellos, es la capacidad que presentan para modular la expresión de genes proapoptóticos y antiapoptóticos en células tumorales y como se ha demostrado parecen favorecer que la balanza se incline hacia los antiapoptóticos, lo cual deriva en una disminución en la muerte celular, y, por tanto, un aumento en la supervivencia tumoral. Por otra parte, contribuyendo a generar resistencia frente a tratamientos antitumorales, las plaquetas provocan el aumento en la expresión de proteínas que favorecen la progresión tumoral. El incremento en los niveles de expresión de ciclinas y la fosforilación de proteínas de reparación del DNA evitan la acción de los agentes antitumorales sobre el ciclo celular y el DNA, por lo que contrarrestan sus efectos antiproliferativos, lo que favorece también la resistencia al tratamiento. Además, la baja expresión de ciclinas durante el cultivo de las células tumorales con plaquetas en presencia de paclitaxel se atribuye a la acción de este sobre el huso mitótico, el cual, se encuentra relacionado con el ciclo de división celular.

Por último, y al igual que hemos visto anteriormente en otros procesos del desarrollo tumoral, las plaquetas a través de la liberación de factores contenidos en sus gránulos contribuyen también a un aumento en la supervivencia de células tumorales lo que confirma aún más su papel en la aparición de resistencias durante el tratamiento antitumoral.

## **CONCLUSIONES**

Numerosos estudios han evidenciado la influencia de las plaquetas sobre el desarrollo tumoral. Esta contribución se basa, como hemos analizado, en diferentes acciones entre las que destaca la liberación de moléculas bioactivas contenidas en sus gránulos. En concreto, en este trabajo, las conclusiones más relevantes sobre la función de las plaquetas en el cáncer son las siguientes:

- 1- En el cáncer de mama, la liberación de moléculas como TGF-  $\beta$  o VEGF por parte de las plaquetas

tras su activación, desencadena el inicio de diferentes rutas bioquímicas que están implicadas de forma directa en la angiogénesis y en etapas claves metastásicas como es la EMT, contribuyendo al desarrollo y progresión tumoral.

2- Las plaquetas, disminuyen la acción de los tratamientos antitumorales al evitar la destrucción de las células tumorales, y, por consiguiente, aumentar su supervivencia lo que favorece aún más la progresión tumoral. Esto lo consiguen a través de diversos mecanismos como:

- La regulación de genes relacionados con procesos apoptóticos.
- El aumento en la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular y la reparación del ADN.
- La liberación de moléculas bioactivas contenidas en sus gránulos.

Por tanto, las plaquetas, no solo favorecen el desarrollo tumoral, sino que, además parecen tener una labor fundamental en la generación de resistencia frente a los tratamientos antitumorales lo que puede derivar en una menor tasa de supervivencia en pacientes con cáncer.

## BIBLIOGRAFÍA

1. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2019 Mar 14 [cited 2020 Apr 7];16(3):166–79. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41569-018-0110-0>
2. Transcriptional Regulation of Platelet Formation: Harnessing the Complexity for Efficient Platelet Production In Vitro | SpringerLink [Internet]. [cited 2020 Apr 7]. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-39562-3\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-39562-3_2)
3. Milagros García Mesa L, Cristina Coma Alfonso L. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS PLAQUETAS. Vol. 1, *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc*. 2000.
4. E B. Plaquetas [Internet]. [cited 2020 Mar 23]. Available from: <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/06-Vol 21-extra.pdf>
5. Yan MJ, Jurasz P. The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia. Vol. 1863, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier; 2016. p. 392–400.
6. Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas - Aura Rosa Manascero Gómez - Google Libros [Internet]. [cited 2020 May 22]. Available from: [https://books.google.com.pe/books?id=apSP3g\\_oXNoC&pg=PA78&hl=es&source=gbs\\_selected\\_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=apSP3g_oXNoC&pg=PA78&hl=es&source=gbs_selected_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false)
7. Li N. Platelets in cancer metastasis: To help the “villain” to do evil. *Int J Cancer* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2020 May 28];138(9):2078–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29847>
8. Cáncer mañana [Internet]. [cited 2020 Mar 23]. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>

9. Cáncer de mama | Cancer.Net [Internet]. [cited 2020 May 30]. Available from: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/cáncer-de-mama>
10. Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. Vol. 9, RNA Biology. Taylor and Francis Inc.; 2012. p. 703–19.
11. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Vol. 100, Cell. Elsevier; 2000. p. 57–70.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, Cell. Elsevier; 2011. p. 646–74.
13. Sommer A, Royle NJ. ALT: A multi-faceted phenomenon. Vol. 11, Genes. MDPI AG; 2020.
14. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. Vol. 7, American Journal of Cancer Research. E-Century Publishing Corporation; 2017. p. 1016–36.
15. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. Vol. 11, Nature Reviews Cancer. NIH Public Access; 2011. p. 123–34.
16. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Hempel D, Tucker SC, Honn K V. Platelets and cancer angiogenesis nexus. Cancer Metastasis Rev. 2017 Jun 1;36(2):249–62.
17. Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. Vol. 33, Cancer Cell. Cell Press; 2018. p. 965–83.
18. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW. Platelet-cancer interactions: Mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. Vol. 143, British Journal of Pharmacology. Wiley-Blackwell; 2004. p. 819–26.
19. Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. Vol. 11, Journal of Hematology and Oncology. BioMed Central Ltd.; 2018.
20. Kisucka J, Butterfield CE, Duda DG, Eichenberger SC, Saffaripour S, Ware J, et al. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jan 24;103(4):855–60.
21. Huong PT, Nguyen LT, Nguyen XB, Lee SK, Bach DH. The role of platelets in the tumor-microenvironment and the drug resistance of cancer cells. Vol. 11, Cancers. MDPI AG; 2019.
22. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. Vol. 7, Science Signaling. American Association for the Advancement of Science; 2014. p. re8.
23. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. Vol. 19, Cell Research. NIH Public Access; 2009. p. 156–72.
24. Biswas S, Guix M, Rinehart C, Dugger TC, Chytil A, Moses HL, et al. Inhibition of TGF- $\beta$  with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. J Clin Invest. 2007 May 1;117(5):1305–13.
25. Jiang L, Luan Y, Miao X, Sun C, Li K, Huang Z, et al. Platelet releasate promotes breast cancer growth and angiogenesis via VEGF-integrin cooperative signalling. Br J Cancer. 2017 Aug 22;117(5):695–703.
26. Huang Z, Miao X, Luan Y, Zhu L, Kong F, Lu Q, et al. PAR1-stimulated platelet releasate promotes angiogenic activities of endothelial progenitor cells more potently than PAR4-stimulated platelet releasate. J Thromb Haemost. 2015 Mar;13(3):465–76.
27. Johnson KE, Forward JA, Tippy MD, Ceglowski JR, El-Husayni S, Kulenthirarajan R, et al.

- Tamoxifen directly inhibits platelet angiogenic potential and platelet-mediated metastasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(4):664–74.
28. Battinelli EM, Markens BA, Kulenthirarajan RA, Machlus KR, Flaumenhaft R, Italiano JE. Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood.* 2014 Jan;123(1):101–12.
  29. Wang JC, Li GY, Wang B, Han SX, Sun X, Jiang YN, et al. Metformin inhibits metastatic breast cancer progression and improves chemosensitivity by inducing vessel normalization via PDGF-B downregulation. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Jun;38(1).
  30. Zhao Y, Adjei AA. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist.* 2015 Jun;20(6):660–73.
  31. Boucharaba A, Guillet B, Menea F, Hneino M, Van Wijnen AJ, Clézardin P, et al. Bioactive lipids lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate mediate breast cancer cell biological functions through distinct mechanisms. *Oncol Res.* 2009;18(4):173–84.
  32. English D, Welch Z, Kovala AT, Harvey K, Volpert O V., Brindley DN, et al. Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J.* 2000 Nov;14(14):2255–65.
  33. Dashevsky O, Varon D, Brill A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells *via* upregulation of MMP-2 production. *Int J Cancer [Internet].* 2009 Apr 15 [cited 2020 May 20];124(8):1773–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24016>
  34. Yao B, Qu S, Hu R, Gao W, Jin S, Ju J, et al. Delivery of platelet TPM3 mRNA into breast cancer cells via microvesicles enhances metastasis. *FEBS Open Bio.* 2019 Dec 1;9(12):2159–69.
  35. Gidlöf O, Van Der Brug M, Öhman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C, et al. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood.* 2013 May 9;121(19):3908–17.
  36. Zuo XX, Yang Y, Zhang Y, Zhang ZG, Wang XF, Shi YG. Platelets promote breast cancer cell MCF-7 metastasis by direct interaction: Surface integrin  $\alpha 2\beta 1$ -contacting-mediated activation of Wnt- $\beta$ -catenin pathway. *Cell Commun Signal.* 2019 Nov 7;17(1).
  37. CD151 promotes breast cancer metastasis by activating TGF- $\beta 1$ /Smad signaling pathway.
  38. Radziwon-Balicka A, Medina C, O'Driscoll L, Treumann A, Bazou D, Inkielewicz-Stepniak I, et al. Platelets increase survival of adenocarcinoma cells challenged with anticancer drugs: mechanisms and implications for chemoresistance. *Br J Pharmacol [Internet].* 2012 Oct 1 [cited 2020 May 19];167(4):787–804. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2012.01991.x>
  39. Chen H, Lan X, Liu M, Zhou B, Wang B, Chen P. Direct TGF- $\beta 1$  signaling between activated platelets and pancreatic cancer cells primes cisplatin insensitivity. *Cell Biol Int [Internet].* 2013 May [cited 2020 May 20];37(5):478–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbin.10067>
  40. Juliachs M, Muñoz C, Moutinho CA, Vidal A, Condom E, Esteller M, et al. The PDGFR $\beta$ -AKT pathway contributes to CDDP-acquired resistance in testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res.* 2014;20(3):658–67.