



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Grado

PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN EL
DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER:
MECANISMOS DE ACCIÓN Y APLICACIÓN
CLÍNICA

ROLE OF PLATELETS IN CANCER
DEVELOPMENT AND PROGRESSION:
MECHASNISMS OF ACTION AND CLINICAL
APPLICATION

Autor:

Estropá Zapater, Andrés

Directora:

Piazuelo Ortega, Elena

Facultad de medicina

Curso 2016-2017

ÍNDICE:

•Resumen y palabras clave.....	2
•Abstract and keywords.....	3
•Introducción.....	4
•Objetivos.....	9
•Material y métodos.....	10
•Resultados.....	11
•Conclusiones.....	39
•Bibliografía.....	41
•Anexo 1: Glosario de abreviaturas.....	47
•Anexo 2.....	48
•Anexo 3.....	50

RESUMEN

Tradicionalmente las plaquetas han sido consideradas uno de los elementos clave en los procesos de hemostasia primaria y trombosis. Sin embargo, desde hace algunos años se conoce y estudia el papel que juegan estas células en el desarrollo, crecimiento y extensión tumoral. El objetivo de este trabajo ha sido revisar la evidencia científica disponible que investigue las relaciones entre las plaquetas y las células tumorales, así como la posible aplicación clínica que esta interacción podría tener en el diagnóstico y tratamiento oncológico. Las plaquetas promueven el desarrollo de los tumores estimulando la angiogénesis, la inducción de la transición epitelio-mesenquimal en las células tumorales, la migración transendotelial, y confiriendo protección a las células tumorales circulantes frente a la acción citolítica de las células NK, lo que contribuye a la formación de metástasis. A su vez, las células tumorales inducen aumento del número de plaquetas (trombocitosis), así como la agregación y activación plaquetaria mediante la secreción de diversos mediadores, y transfieren biomoléculas del tumor a las plaquetas modificando así su contenido de ARN y proteínas. Estos cambios en el perfil de ARN y de proteínas plaquetarias han demostrado ser útiles para la detección precoz de diferentes tumores así como para evaluar la respuesta al tratamiento quimioterápico, de forma que se ha propuesto que las plaquetas podrían ser una nueva forma de biopsia líquida. Existen numerosas evidencias a nivel preclínico y clínico de que los fármacos antiplaquetarios ejercen un efecto antitumoral. De todos ellos, el ácido acetilsalicílico (aspirina) es el más estudiado, observándose que disminuye, incluso a dosis bajas como las utilizadas en prevención cardiovascular, la incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer, especialmente del tracto gastrointestinal. Además, el uso de aspirina en pacientes oncológicos se ha asociado con un descenso en el número de metástasis. A pesar de las evidencias que avalan el uso de la terapia antiplaquetaria en pacientes oncológicos quedan todavía muchas cuestiones por definir, como el tipo de droga, la dosis, y duración óptimos así como el tipo de paciente y tumor candidato idóneos.

Palabras clave: Plaquetas, aspirina, quimioprevención en cáncer, biopsia líquida, microambiente tumoral, angiogénesis, metástasis.

ABSTRACT

Platelets have traditionally been considered as one of the key elements in the primary hemostasis and thrombosis processes. However, the role of these cells in tumor development, growth and extension has been known and studied for some years. The objective of this study was to review the available scientific evidence to investigate the relationships between platelets and tumor cells, as well as the possible clinical application that this interaction might have on cancer diagnosis and treatment. Platelets promote the development of tumors by stimulating angiogenesis, induction of the epithelial-mesenchymal transition in tumor cells, transendothelial migration, and conferring protection to circulating tumor cells against the cytolytic action of NK cells, which contributes to the formation of metastases. In turn, tumor cells induce increased platelet count (thrombocytosis), as well as platelet aggregation and activation through the secretion of various mediators, and transfer biomolecules from the tumor to the platelets thus modifying their RNA and protein content. These changes in the RNA and platelet protein profile have been shown to be useful for the early detection of different tumors as well as to evaluate the response to chemotherapeutic treatment, so it has been proposed that platelets could be a new form of liquid biopsy. There is considerable evidence at the preclinical and clinical level that antiplatelet drugs exert an antitumor effect. Of these, acetylsalicylic acid (aspirin) is the most studied, and it is observed that the incidence and mortality of different types of cancer, especially those of the gastrointestinal tract, decrease even at low doses such as those used in cardiovascular prevention. In addition, the use of aspirin in cancer patients has been associated with a decrease in the number of metastases. Despite the evidence supporting the use of antiplatelet therapy in cancer patients, many questions still remain to be defined, such as the optimal type of drug, dosage and duration as well as the type of patient and tumor candidate.

Key words: Platelets, aspirin, chemoprevention in cancer, liquid biopsy, tumor microenvironment, angiogenesis, metastases.

INTRODUCCIÓN

Plaquetas: biogénesis y estructura.

Las plaquetas son pequeños fragmentos subcelulares (2-3 μm de diámetro, $\sim 0,5 \mu\text{m}$ de espesor y 6-10 fL de volumen) que circulan por el torrente sanguíneo a una concentración de 150 y 350 $\times 10^6$ /mL en condiciones fisiológicas. Se originan a partir de los megacariocitos, células hematopoyéticas poliploides, que sufren un proceso de diferenciación y maduración denominado trombopoyesis en respuesta a la acción de las interleucinas IL-3, IL-6, IL-11, y trombopoyetina. Si bien tradicionalmente se ha considerado a la médula ósea el principal órgano productor de plaquetas, un estudio realizado en ratones recientemente publicado en Nature, ha demostrado que los pulmones pueden contribuir de forma importante a la producción de plaquetas, siendo responsables de hasta un 50% de la misma, lo que suponen 10 millones de plaquetas por hora^{1,2}. La vida media de las plaquetas es de 7-10 días, siendo destruidas por las células de Kupffer en el hígado y en el bazo. A pesar de su pequeño tamaño y su ausencia de núcleo, las plaquetas presentan una gran complejidad estructural y bioquímica. Desde un punto de vista conceptual, en la estructura de la plaqueta pueden diferenciarse cuatro zonas: la zona periférica, la zona sol-gel, la zona de organelas y el sistema de membranas. La zona periférica está formada por la membrana plasmática que contiene numerosos receptores protéicos que interaccionan con diferentes agonistas externos desencadenando diversas reacciones plaquetarias, y el glicocáliz que está compuesto por glicoproteínas y permite que la plaqueta se adhiera a las superficies tales como el colágeno de los vasos dañados. La zona de sol-gel es la zona periférica del citoplasma que observada al microscopio presenta una apariencia de gel líquido transparente. Contiene microtúbulos organizados y microfilamentos, que constituyen el sistema contráctil de las plaquetas, lo que permite a las plaquetas cambiar de forma cuando se activan. La zona de organelas, con mitocondrias, lisosomas, y dos tipos de gránulos, los alfa gránulos y los gránulos densos. Los primeros contienen factores de coagulación, factores fibrinolíticos, factores de crecimiento, y citoquinas. Los segundos son ricos en calcio, fosfato, magnesio, serotonina, ATP y ADP. Por último, el sistema de membranas está formado por un sistema de canalículos abierto, que son conductos membranosos que se prolongan desde la membrana plasmática hacia el interior de la célula, y el sistema tubular denso derivado del retículo endoplasmático rugoso de los megacariocitos.

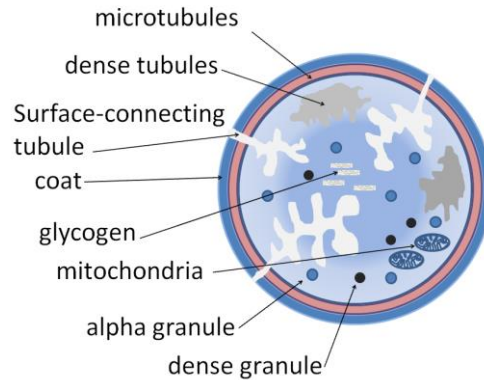


Figura1: Autor Dr G.Beards. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Platelet_structure.png#filelinks

A pesar de que las plaquetas, al no tener núcleo, carecen de ADN genómico, contienen cierta cantidad de ARN de los megacariocitos y se ha demostrado que son capaces de sintetizar proteínas de novo. Así, en respuesta a la activación plaquetaria se ha demostrado la traslación de proteínas con actividades biológicas relevantes ²

En estado basal, las plaquetas presentan forma de disco y circulan libres por el torrente sanguíneo. Cuando se produce daño o disfunción del endotelio vascular, las plaquetas se activan, sufriendo un cambio estructural en el que se forman protuberancias de la membrana plasmática a modo de pseudópodos y la plaqueta se expande, adheriéndose al endotelio lesionado. Entonces, las plaquetas liberan una serie de factores de crecimiento y mediadores inflamatorios que sirven para reclutar células inflamatorias. En esta situación, las plaquetas liberan ADP y sintetizan prostanoïdes, principalmente Tromboxano A₂, que se sintetiza en la plaqueta como consecuencia de la liberación de ácido araquidónico por la acción de la fosfolipasa A₂. El ácido araquidónico es el sustrato de la ciclooxigenasa-1 (COX-1). La COX-1 producirá endoperóxidos cíclicos de las prostaglandinas, PGG₂ y PGH₂ como productos iniciales, que se transformarán en Tromboxano A₂ (TxA₂) por acción de una sintasa específica, la TxA₂ sintasa. De esta forma se produce lo que se conoce como fenómeno de reclutamiento plaquetario que consiste en la amplificación de la respuesta plaquetaria mediante la activación de otras plaquetas, lo que conduce finalmente a la formación de agregados plaquetarios. El TxA₂, además de activar más plaquetas, contraerá las células del músculo liso vascular³.

Si bien tradicionalmente se ha considerado que el mantenimiento de la hemostasia constituye el principal rol de las plaquetas, en la actualidad se sabe que también juegan un papel crucial en muchas otras funciones biológicas, algunas beneficiosas como el mantenimiento de la integridad vascular, y otras patológicas como la inmunidad, la inflamación, la aterotrombosis o el cáncer.

Cáncer y tromboembolismo.

En 1865, Armand Trousseau advirtió que algunos de sus pacientes presentaban episodios trombóticos previamente al diagnóstico de un proceso canceroso subyacente. Fue el primer autor en relacionar la disregulación del sistema hemostático con el desarrollo de neoplasias. En sus estudios, Trousseau describió 182 casos de tromboflebitis primaria en pacientes con un carcinoma oculto, haciendo especial énfasis en la presencia de microtrombos ricos en plaquetas en la vasculatura tanto arterial como venosa^{4,5}.

Las células cancerígenas son el principal componente para la formación y progresión de tumores. Sin embargo, existen evidencias que demuestran que estas células cancerígenas por si solas no podrían llevar a cabo los procesos de crecimiento e invasión tumoral. Para ello requieren la ayuda de numerosos elementos tales como fibroblastos, células del sistema inmune, factores de crecimiento, células endoteliales, citoquinas, moléculas formadoras de matriz extracelular y también las plaquetas. Todo ello forma el llamado microambiente tumoral, que juega un papel crucial habilitando la progresión y supervivencia tumoral⁶.

La relación entre cáncer y tromboembolismo está claramente demostrada, y de hecho el tromboembolismo representa la segunda causa de muerte en el cáncer por detrás de las metástasis a distancia. La tromboprofilaxis primaria con heparinas de bajo peso molecular ha demostrado disminuir significativamente el índice de eventos trombóticos en pacientes oncológicos bajo tratamiento quimioterápico⁷.

Esta relación entre cáncer y tromboembolismo ha sido confirmada mediante estudios retrospectivos que demuestran un aumento significativo del riesgo de padecer un cáncer subyacente en aquellos pacientes en los que se diagnostica un proceso tromboembólico primario. Así, en un estudio realizado en Dinamarca, se seleccionaron casos de pacientes con diagnóstico previo de trombosis venosa profunda o de tromboembolismo pulmonar primarios, definiéndose como primarios los casos de pacientes sin un proceso canceroso conocido subyacente, no embarazadas, y con un periodo de tiempo de más de 6 meses desde la última intervención quirúrgica. Se seleccionaron 15348 pacientes con diagnóstico de trombosis venosa profunda primaria y 11305 con diagnóstico de tromboembolismo pulmonar primario. Basándose en las tasas de incidencia nacional ajustadas por sexo y edad se calculó la incidencia esperada de cáncer en estos pacientes si tuvieran el mismo riesgo que la población general. La tasa de diagnóstico de cáncer fue multiplicada por 3 durante los seis primeros meses de seguimiento. En los pacientes no diagnosticados de cáncer en estos primeros 6 meses de seguimiento post-evento, la tasa de diagnóstico se acercaba a la de la población general. Así,

se demuestra que el cáncer es la causa provocadora y no la consecuencia de muchos procesos tromboembólicos primarios, y alerta sobre la necesidad de descartar la presencia de neoplasias ocultas en pacientes con un evento embólico de nuevo diagnóstico sin causa primaria conocida⁸.

La trombocitosis puede encontrarse en un 10-57% de los pacientes con cáncer, variando este número en función del tipo de cáncer⁹. De acuerdo a un estudio realizado en 1998⁵, la trombocitosis previa a la cirugía en pacientes con cáncer colorrectal era un factor independiente de mayor mortalidad, y por tanto se considera un factor independiente de mal pronóstico.

Del cáncer a la trombocitosis.

Dada la relación entre cáncer y trombocitosis, resulta de gran interés conocer los mecanismos que conducen de un proceso a otro. El proceso de agregación plaquetaria inducida por células tumorales es conocido como TCIPA por sus siglas en inglés (tumor cell-induced platelet aggregation).

Son varios los mecanismos que permiten a la célula tumoral favorecer un estado de trombocitosis, el cual, como veremos más adelante, le beneficia de cara a los procesos de desarrollo tumoral, angiogénesis, extravasación y metástasis.

Algunas células tumorales tienen la capacidad de secretar la hormona trombopoyetina, la cual estimula la maduración de los megacariocitos y la formación por tanto de plaquetas. En un estudio se analizó la presencia de trombopoyetina en 27 tumores, encontrándose dicha hormona en la mayoría de los casos. Sin embargo, los niveles de trombopoyetina no se correspondían con los niveles de trombocitosis, lo cual sugería la necesaria participación de otros factores ¹⁰.

Otra posible molécula relacionada con la activación de TCIPA se trata de la podoplanina, expresada en diversas líneas tumorales como mesotelioma, glioblastoma, carcinoma pulmonar o carcinoma colorrectal. El receptor CLEC-2 (C-Type lectin –like receptor) se expresa en las plaquetas y es uno de los receptores de las podoplaninas. La interacción entre podoplanina y CLEC-2 activa la proliferación y agregación plaquetaria^{7,11}.

Las células tumorales, además de los mecanismos descritos, pueden provocar un aumento en el recuento plaquetario por métodos indirectos. Uno de ellos es la producción de factor tisular. El factor tisular, el principal iniciador de la cascada de la coagulación en humanos, activa

también las plaquetas. Se ha demostrado que, en los carcinomas colorrectales, un aumento en la expresión de factor tisular se asocia a un mayor número de metástasis tanto linfáticas como hepáticas. La inhibición de este factor tisular ha conseguido disminuir el número de estas metástasis en experimentos in vitro y en ensayos con ratones. La expresión aberrante de factor tisular por parte de los carcinomas colorrectales podría estar directamente ligada a la expresión del oncogen k-ras o a la pérdida de supresión tumoral derivada de las mutaciones en el gen p53^{12,13}.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido investigar la evidencia científica disponible acerca de:

- 1- El papel de las plaquetas en el desarrollo y la progresión de los tumores así como los mecanismos moleculares implicados.
- 2- La aplicación clínica que la interacción de las plaquetas con las células tumorales podría tener desde dos puntos de vista: el uso de las plaquetas como biomarcadores para establecer el diagnóstico y pronóstico de los tumores y la utilidad de los fármacos antiplaquetarios en la prevención y/o tratamiento del cáncer.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos del trabajo, se ha realizado una búsqueda sistemática en la base de datos PUBMED de estudios observacionales (casos-control y cohortes), revisiones bibliográficas, revisiones sistemáticas, metaanálisis y ensayos clínicos controlados y aleatorizados publicados en inglés o español, durante el periodo de tiempo comprendido entre 1995 y 2017, que evaluaran las relaciones existentes entre las plaquetas y el cáncer, así como las potenciales aplicaciones diagnósticas, pronósticas, preventivas y terapéuticas.

Para la búsqueda se emplearon términos clave como “platelets and cancer”, “platelets angiogenesis”, “platelets metastasis”, “platelets cancer”, “aspirin cancer”, “antiaggregant”, “biomarker”. Tras revisar los resúmenes de los artículos, se seleccionaron aquellos relacionados con los objetivos del presente trabajo.

Igualmente, se ha realizado una búsqueda en la página web clinicaltrials.gov con los términos de búsqueda “aspirin and cancer” para obtener información sobre los ensayos clínicos que se están llevando a cabo en la actualidad y todavía no han sido publicados.

RESULTADOS

1) Mecanismos implicados en la interacción plaquetas-cáncer

1.1 Relación entre plaquetas y angiogénesis.

Los tumores, para crecer en tamaño y poder llevar a cabo los procesos de extravasación y metástasis, necesitan de un continuo aporte de nutrientes y oxígeno. Es por ello que la red de vasos que nutre el tumor tiene que crecer en la misma medida que lo hace el tumor en sí mismo. Para ello, debe darse el proceso de neovascularización conocido como angiogénesis. Está demostrado que los tumores, sin la producción de nuevos vasos, no serían capaces de crecer más allá de 2-3 milímetros. Es por ello que la angiogénesis es considerada uno de los procesos absolutamente claves en la supervivencia tumoral y por tanto una diana terapéutica.

La primera publicación que establecía un vínculo entre plaquetas y angiogénesis fue elaborada por Pinedo y Folkman en 1998. Los autores propusieron que las plaquetas contribuían a la angiogénesis tumoral, basando su hipótesis en que las plaquetas son una fuente importante de elementos estimuladores e inhibidores de la angiogénesis¹⁴.

La relación entre angiogénesis y plaquetas ha sido demostrada en experimentos *in vivo* como el realizado en 2004 por Rhee Js et al¹⁵. Este experimento fue realizado en ratones, a los cuales se sometió a unas condiciones de hipoxia retiniana con el objetivo de que desarrollaran retinopatía hipóxica y se produjera el fenómeno de angiogénesis. Tras esto, se indujo artificialmente en los ratones unas condiciones de trombocitopenia y se inhibió el proceso de agregación plaquetaria a través del bloqueo de receptores específicos como el alfaIIb betaIII-integrina o la administración de Aspirina. El resultado fue una reducción del 35-50% en la neovascularización retiniana, quedando así demostrada *in vivo* la conexión entre plaquetas y angiogénesis.

El proceso de angiogénesis tiene lugar debido a un desbalance entre la liberación de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Las plaquetas contienen en su interior partículas tanto pro-angiogénicas como anti-angiogénicas, aunque en los procesos tumorales el balance global es a favor de la angiogénesis. El principal factor pro-angiogénico conocido es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), existiendo otros como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF I) y el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF II), mientras

que los anti-angiogénicos más importantes son la endostatina, el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- beta) o el factor plaquetario 4(PF-4) ¹⁶.

Existen estudios que sugieren que la secreción de factores pro o anti-angiogénicos es un proceso regulado. Las plaquetas almacenan estos mediadores en su interior en alfa-gránulos separados, y la estimulación de los receptores PAR-1 o PAR-4 provoca la secreción de pro-angiogénicos o anti-angiogénicos. Ma et al fueron los primeros en demostrar la relación entre la estimulación de los receptores de trombina presentes en las plaquetas PAR-1 y PAR-4 y la secreción de sustancias pro o anti-angiogénicas ¹⁷. Así, la estimulación del receptor PAR-1 provoca un aumento en la secreción de VEGF y un descenso en la secreción de endostatina, mientras que la estimulación del receptor PAR-4 provoca un aumento en la secreción del angiostático endostatina y un descenso en la secreción del angiogénico VEGF. De hecho, en un experimento realizado en ratas, la inhibición selectiva de los receptores PAR-1 provocó un descenso en la secreción de VEGF y por tanto una menor tasa de curación de úlceras gástricas, ya que necesitan del VEGF para estimular la neoformación vascular y lograr así la cicatrización.

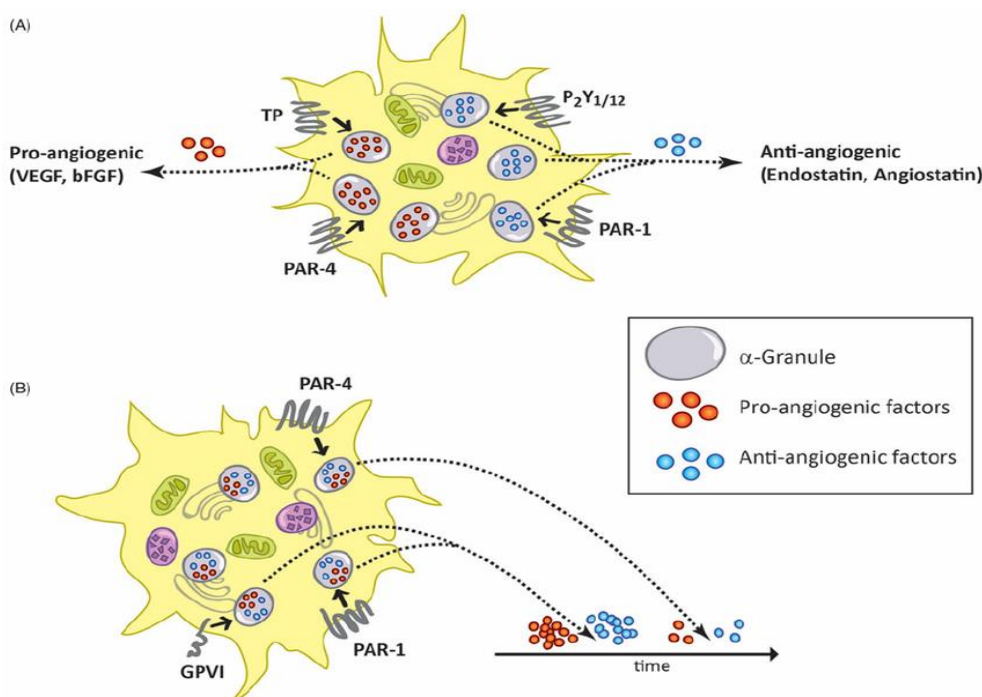


Figura 2: Secreción de factores reguladores de la angiogénesis almacenados en los alfa-gránulos plaquetarios tras estimulación de los receptores PAR-1 y PAR-4. Platelets. 2015;26(3):199-211¹⁸.

Además de los receptores de trombina explicados, existen unos receptores de adenosin difosfato (ADP) en la superficie de las plaquetas que han demostrado estar también implicados en la angiogénesis. Son los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂. La estimulación de estos receptores provoca un aumento en la secreción de VEGF y prácticamente no se observa secreción de

endostatina, por lo que el efecto neto es claramente angiogénico¹⁶. Aun así, la potencia angiogénica de estos receptores de ADP es mucho menor que la de los receptores de trombina, lo cual concuerda con el papel más débil que tiene el ADP en el proceso de activación celular en comparación con la trombina.

En una investigación llevada a cabo por Battinelli et al en la cual se analizó el efecto angiogénico del ADP, los autores investigaron otras moléculas que tuvieran un efecto contrario sobre la plaqueta. Se probaron otros agonistas plaquetarios como la epinefrina, colágeno, trombina y TXA₂. Se demostró que la exposición de las colonias plaquetarias al TXA₂ provocaba un efecto contrario al ADP. Mediante microscopía de inmunofluorescencia, se determinó que los alfa-gránulos que contenían VEGF se mantenían constantes, mientras que los gránulos que contenían endostatina ya no eran visibles tras la exposición a TXA₂¹⁹.

Klement *et al* demostraron que las plaquetas eran capaces de secuestrar y acumular grandes cantidades de reguladores angiogénicos como VEGF en presencia de tumores²⁰. La concentración de mediadores angiogénicos en el interior de las plaquetas se mantiene constante en condiciones fisiológicas. Sin embargo, se demostró en ratones cómo estas concentraciones se elevaban significativamente en presencia de tumores microscópicos. Las concentraciones de otras proteínas plaquetarias como la albúmina no sufrían esta variación, lo que demuestra que se trata de un proceso selectivo. En esta investigación se trabajó estudiando el proteoma de las plaquetas. Se comparó este proteoma plaquetario de ratones con tumores microscópicos con el proteoma plaquetario de ratones sin tumores, y se observaron importantes diferencias en las concentraciones de mediadores angiogénicos, fundamentalmente VEGF. Estos cambios se observaron meses antes de que los tumores fueran visibles por métodos de diagnóstico convencionales, y también antes de que estos mediadores sufrieran modificaciones en sus concentraciones plasmáticas. Por tanto el estudio de estos proteomas plaquetarios podría ser de utilidad en el diagnóstico precoz de procesos tumorales²⁰.

Más allá de la liberación, almacenaje o secuestro de mediadores, se ha propuesto que las plaquetas pueden participar en la angiogénesis mediante una regulación directa con las células endoteliales. Se demostró como las plaquetas promovían el desarrollo de vascularización de vena umbilical humana en un experimento en matrigel²¹. Esta acción angiogénica de las plaquetas era independiente de la liberación de mediadores, y no se veía modificada al añadir sustancias como ácido acetil salicílico u óxido nítrico.

Otro aspecto importante en el papel de las plaquetas en la angiogénesis son las micropartículas plaquetarias (PMP). Las PMP son microvesículas formadas a partir de membrana plasmática. Su rol en los procesos fisiológicos de hemostasis o trombosis está bien definido, y las plaquetas liberan estas PMP en el sitio de la lesión tras ser activadas. El papel de las PMP en procesos patológicos no está todavía bien definido. Se cree que, tras su liberación, estas microvesículas podrían unirse a células tumorales introduciendo en ellas proteínas citoplasmáticas y material ARN, funcionando así como transportadores de material bioactivo entre células. Este proceso de transmisión de información estaría involucrado en los procesos de trombosis, inmunidad, inflamación, crecimiento tumoral y metástasis. En algunos tumores como el cáncer gástrico, la presencia de niveles elevados de PMP se ha asociado a un peor pronóstico y una mayor tasa de metastatización¹⁶.

Sin embargo, la actividad plaquetaria no solo interviene en la vascularización tumoral promoviendo el proceso de angiogénesis. Un estudio realizado en 2008²² en ratones demuestra que las plaquetas son importantes también en la estabilización de la vascularización tumoral, evitando la excesiva fragilidad capilar y la hemorragia tumoral consiguiente. Es decir, las plaquetas no solo afectan al crecimiento en número de vasos sanguíneos que nutren al tumor, sino que además provocan que estos vasos se muestren más estables y no sufran hemorragias. En este mismo estudio se demostró que este fenómeno no se debía a la capacidad hemostática de las plaquetas mediante adhesión a la pared vascular, sino que se debe a la secreción de factores almacenados en los alfa-gránulos.

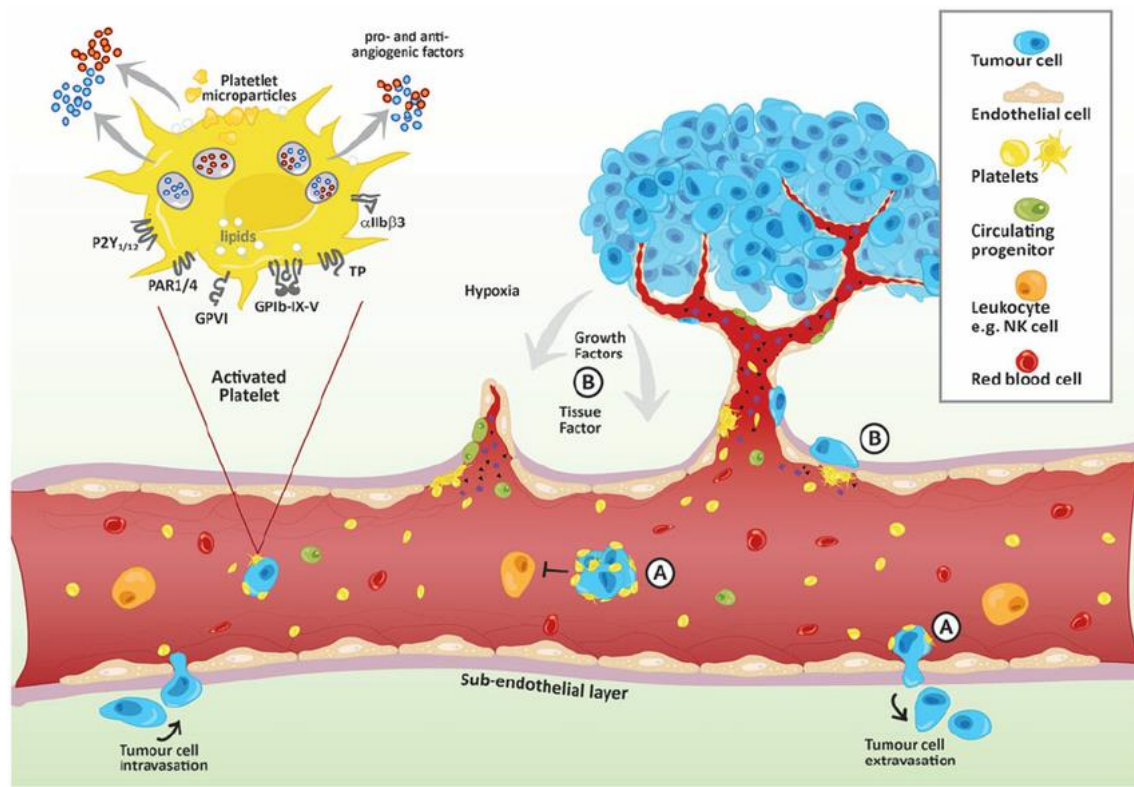


Figura 3: En esta imagen se muestran esquematizadas algunas de las relaciones entre las células tumorales y las plaquetas, las cuales liberan sustancias pro-angiogénicas y anti-angiogénicas. Platelets. 2015;26(3):199-211¹⁸

1.2 Relación entre plaquetas y metástasis.

Las metástasis son la causa número uno de muerte en pacientes con cáncer. Para llevar a cabo la metastatización, las células tumorales deben superar varios pasos: desprendimiento del tumor primario, extravasación a través del sistema sanguíneo o linfático, supervivencia en la circulación, intravasación y supervivencia en el nuevo órgano donde establecerán la metástasis. Todo ello necesita del apoyo del ya nombrado microambiente tumoral, en el cual las plaquetas una vez más jugarán un importante papel ⁷.

El primer investigador en demostrar la relación entre trombocitosis y metástasis fue Gasic GJ en 1968 ²³. Este investigador había advertido cómo el número de metástasis que se producían tras la inyección de células tumorales ascíticas en ratones se veía reducido en un 50% si, previa a esta inoculación, se les administraba neuraminidasa a los ratones. Al inicio se pensó que este efecto era debido a la interacción de la neuraminidasa con el ácido siálico que cubría las células tumorales. Sin embargo, advirtieron que, si se trataban las células tumorales con neuraminidasa para dañar la cubierta de ácido siálico previamente a ser inoculadas, el efecto

antimetastásico era mínimo. Por tanto, la atención se fijó más en la actividad de la neuraminidasa en el huésped y no en su relación directa con las células tumorales. Así, se descubre que la neuraminidasa tiene un potencial trombopénico. Mediante la administración de diversos agentes que también inducían a la trombopenia, se obtienen unos resultados similares en términos de reducción de metástasis, concluyendo así que este efecto observado de reducción de metástasis por la inyección de neuraminidasa era debido, al menos en parte, a la trombopenia.

Un estudio realizado en 2016 pone en relación la trombocitosis con el crecimiento y las metástasis del carcinoma hepatocelular²⁴. En este estudio se mide la cantidad de plaquetas y el ratio entre plaquetas/linfocitos (llamado este ratio PLR por sus siglas en inglés) en 1428 pacientes: 1008 de ellos padecían cirrosis hepática y 420 hepatocarcinoma. El número de plaquetas y el PLRs era mayor en los pacientes con hepatocarcinoma. No solo el recuento plaquetario era mayor, sino también la cantidad de ciertos mediadores plaquetarios como IL-6, IL-1, FGF, G-CSF, Trombopoyetina y VEGF. Además, los pacientes cirróticos que acabaron desarrollando un hepatocarcinoma también desarrollaron una elevación en estos marcadores y en el recuento plaquetario. Las cifras de estos mediadores intercelulares y de plaquetas se vieron disminuidas en los pacientes tras ser tratados de su enfermedad oncológica. Los pacientes que sufrieron una recaída de su enfermedad tenían unos niveles plaquetarios superiores que aquellos que alcanzaron la remisión completa. Todo ello indica que la actividad plaquetaria favorece el crecimiento, desarrollo, invasión y metástasis en el carcinoma hepatocelular. Los autores llegaron a la conclusión de que altos niveles plaquetarios en pacientes post-tratamiento eran una indicación de respuesta incompleta al tratamiento o de recurrencia a distancia del tumor primario²⁴.

Las células NK son una de las principales amenazas para las células tumorales una vez que éstas circulan por el torrente sanguíneo. Estas células del sistema inmune son capaces de reconocer a las células tumorales y acabar con ellas, protegiendo al huésped de la metastatización. Sin embargo, es evidente que existen células tumorales capaces de metastatizar a pesar de la presencia de un sistema NK eficiente. En 1999, Bernhard Nieswandt *et al* demuestran por primera vez que las plaquetas protegen a los tumores de la acción de las NK tanto in vitro como in vivo mediante un experimento en ratones. Usando tres líneas tumorales celulares, se observa cómo los ratones sometidos a trombocitopenia experimentaban un descenso en el número de metástasis, pero este efecto solo se observaba, y esto es importante, en aquellas líneas celulares sensibles al efecto de NK. In vitro, la agregación de las plaquetas alrededor de los nichos tumorales también protegía a las células

tumorales de la acción del NK. Por tanto se concluye que las plaquetas protegen a las células tumorales de la acción citolítica de NK cuando éstas están en la circulación, proponiendo que esto se produce al rodear las plaquetas los agregados tumorales ²⁵.

El mecanismo molecular por el cual las plaquetas interfieren con la actividad antitumoral de las NK no es conocido con claridad todavía. Hans George Kopp muestra en un estudio que las plaquetas secretan unos factores, los cuales alteran esta función antitumoral de NK disminuyendo su capacidad de degranulación, su citotoxicidad y la secreción de IFN-Gamma. La disminución de la reactividad de las NK no es debida a una apoptosis inducida de las células, sino a una alteración en la regulación de NKG2D, un receptor de membrana de las NK. Esto es producido debido a la acción de TFG-beta. La neutralización de este TFG-beta no solo acaba con la disregulación de NKG2D sino que restaura la capacidad citolítica de las células NK ²⁶.

Una de las causas por las que las células tumorales son reconocidas por las NK es la falta de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I). Las células cancerígenas llevan a cabo una disregulación del MHC I previsiblemente como estrategia para evadir el sistema de inmunovigilancia mediado por linfocitos T. En un estudio de 2011 realizado por Packle et al, se evidenció en primer lugar el hecho de que las células tumorales eran rápidamente cubiertas por plaquetas (in vitro). Más importante, estos investigadores demostraron cómo las plaquetas son capaces de transmitir a las células tumorales moléculas de MHC I. Este hecho ayudaría a las células tumorales a evitar el reconocimiento y ataque de las NK. ²⁷.

La transición epitelio-mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) es un elemento central en los procesos de desarrollo embriológico, reparación de heridas y migración de células tumorales. EMT es un proceso por el cual las células pierden características propias de células epiteliales, como la adhesión intercelular, y adquieren características propias de células mesenquimales, como la capacidad migratoria. Este proceso, cuando ocurre en células tumorales, dota a los tumores de mayor agresividad y capacidad metastásica, y se correlaciona con una peor respuesta a las terapias oncológicas y por tanto con un peor pronóstico ²⁸.

Se han realizado estudios in vitro que tratan de relacionar a las plaquetas con la EMT. Para ello, se empleó un agonista del receptor PAR-1 para activar a las plaquetas. Estas plaquetas activadas fueron co-cultivadas con una línea de células tumorales de cáncer de colon. Tras esto, las células tumorales mostraron una sobreexpresión de vimentina y una disminución de e-cadherina, adoptando por tanto una expresión fenotípica propia de células mesenquimales, las cuales tienen capacidades migratorias en contraposición a las células con fenotipo epitelial,

las cuales se mantienen estrechamente unidas unas con otras y por tanto carecen de capacidad migratoria. Las plaquetas activadas a través del uso de agonistas de los receptores PAR-1 produjeron una mayor cantidad de TGF-Beta, lo cual induce la EMT en células de cáncer de colon²⁹.

Otro de los procesos clave en las metástasis tumorales en el cual las plaquetas podrían estar implicadas es el de la migración transendotelial, por el cual las células son capaces de atravesar la barrera endotelial e introducirse en el torrente sanguíneo, siendo por tanto un proceso absolutamente clave para que se produzcan metástasis. En un estudio realizado por Schumacher et al ³⁰, se buscaron los mecanismos moleculares a través de los cuales las plaquetas participan en este proceso. En este estudio se demuestra que las moléculas implicadas son los nucleótidos Adenosín trifosfato (ATP) y Adenosín Difosfato (ADP), almacenadas en los gránulos densos de las plaquetas y liberadas ante la activación de las mismas por parte de las células tumorales (TCIPA). Para demostrar la participación específica de estas moléculas, se emplearon ratones con deficiencia de la proteína “exocytosis-priming protein munc13-4”(Munc 13-4) la cual está implicada en la liberación de mediadores almacenados en los gránulos densos de las plaquetas. Estos ratones tenían cifras normales de plaquetas totales, así como capacidad de adhesión a colágeno o formación de agregados con células tumorales. Asimismo, tenían intacta la capacidad de liberación de trombina y de mediadores almacenados en los alfa-gránulos de las plaquetas como PF4 o Factor Von Willebrand. En cambio, estos ratones con deficiencia selectiva de Munc 13-4 tenían afectada la liberación de ATP y ADP almacenados en los gránulos densos.

Para evaluar si la degranulación de los gránulos densos era requerida para que se formaran metástasis, se comparó a ratones normales con ratones con deficiencia de Munc 13-4. A ambos grupos se les inocularon células tumorales provenientes de melanoma y de Lewis Lung Carcinoma. Al realizar la comparación, se vio que, mientras el crecimiento tumoral en ambos grupos no mostraba diferencias significativas, las metástasis se veían reducidas en los ratones con deficiencia de Munc 13-4. Una vez demostrado este hecho, estos investigadores analizaron qué receptores endoteliales están implicados en el proceso, y responden por tanto a las señales enviadas por las plaquetas a través de la secreción de ADP y ATP almacenado en los gránulos densos. De los receptores de purinas que se pueden encontrar en las células endoteliales (P2Y₂, P2Y₁, P2X₄), se prueba la implicación del receptor P2Y₂. Así, el bloqueo de este receptor de ATP demuestra reducir significativamente la migración transendotelial mediada por plaquetas. Se comparó la habilidad de células tumorales para traspasar la barrera endotelial en ratones normales, ratones con deficiencia en la secreción de ATP y en ratones

con bloqueo del receptor P2Y₂, evidenciándose en los últimos dos casos una reducción significativa en la capacidad de las células tumorales para traspasar la barrera endotelial. Esto por tanto demuestra que las plaquetas participan eficientemente en el proceso de extravasación tumoral, y lo hacen a través de la secreción de las moléculas ATP y ADP almacenadas en los gránulos densos, moléculas que activan selectivamente al receptor endotelial P2Y₂.

La regulación genética en las células cancerígenas es diferente de la de las células normales debido a múltiples defectos genéticos. Como resultado de estos defectos, algunos genes son silenciados, mientras que otros genes que normalmente estarían silenciados se expresan. Estos errores se van acumulando y expresando progresivamente hasta la muerte del huésped. Como resultado de esta disregulación en la expresión genética, se produce un cambio en la expresión fenotípica de las células cancerígenas en comparación con las células no cancerígenas del tejido del que provienen. Este proceso es conocido como desdiferenciación celular. Debido a estas alteraciones, las células tumorales son capaces de imitar el comportamiento de las células madre y trans-diferenciarse hacia otros tipos celulares no relacionados con las células originales, siendo un ejemplo de esto la ya nombrada EMT. A esta capacidad de las células tumorales se le conoce en inglés con el término "mimicry", de mímica. Se ha observado que ciertos tipos de células cancerígenas (melanoma, próstata, mama, colon y aparato urogenital) son capaces de expresar genes propios de los megacariocitos, precursores de las plaquetas³¹. Debido a ello, esas células cancerígenas son capaces de mostrar ciertas funciones plaquetarias (auto agregación, inicio de la cascada de la coagulación o fenómenos de agregación plaquetaria), produciéndose por tanto un fenómeno de imitación plaquetaria por parte de las células tumorales. Como han demostrado ciertos estudios³², el receptor alfa2beta3-integrina es la principal molécula a nivel de interacción con las células cancerígenas en referencia a la relación entre células tumorales y el microambiente tumoral. La cadena alfa2beta3-integrina suele aparecer exclusivamente en las células de origen megacariocítico. Sin embargo, se observó la expresión ectópica de la molécula alfa2beta3 en varias líneas celulares.

Igualmente, los receptores CD31 pertenecen a la superfamilia de las moléculas de adhesión de las inmunoglobulinas, y son expresados principalmente por las plaquetas y las células endoteliales en sus uniones intercelulares³³. CD31 participa en la regulación positiva de las funciones de las integrinas. Se encontró expresión ectópica de CD31 en linfomas y leucemia, así como en otras líneas celulares. Como ya se nombró anteriormente, uno de los más potentes activadores de las plaquetas es la trombina. Los receptores plaquetarios de trombina

son los llamados PAR(protease-activated receptors). Aunque estos receptores se consideran exclusivamente plaquetarios, se ha encontrado expresión ectópica de los mismos en células tumorales de cáncer de mama, colon o melanomas, mostrando actividad funcional ya que la exposición de estas células a trombina era capaz de provocar la adhesión celular, expresión de integrina y aumento de las metástasis. Tras analizar molecularmente células cancerígenas de colon y carcinoma epidermoide, se observa la expresión de los genes WT1 y c-kit. La expresión de estos genes, característicos de las células madre de la médula ósea, podría ser la causa probable de este fenotipo propio de células plaquetarias que muestran ciertas células tumorales³³.

2) Aplicación clínica de la interacción de las plaquetas con las células tumorales.

2.1 Las plaquetas como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer.

Hoy en día, las biopsias son empleadas como elemento central en el diagnóstico y manejo del paciente oncológico. El análisis histológico del tumor permite un diagnóstico de certeza y revela detalles sobre el perfil genético del tumor que son empleados tanto como marcadores pronósticos como dianas terapéuticas. A pesar de la innegable utilidad de esta técnica, en los últimos años se ha hecho énfasis en sus limitaciones, debido al concepto de “heterogeneidad intratumoral”. Este concepto, introducido por Gerlinger et al ³¹, indica que en dependencia de la localización en un tumor las células tumorales expresan mutaciones y aberraciones genéticas diferentes. Este hecho pone en evidencia la limitación de la biopsia única de tumor sólido para elaborar un perfil genético del tumor y en base a ello asignar un pronóstico y una estrategia terapéutica concreta. En los últimos años, ha surgido un creciente interés en el campo de la oncología en la técnica de “biopsia líquida” como herramienta para diagnosticar, monitorizar o caracterizar los tumores sólidos. La biopsia líquida se basa en el estudio de material tumoral presente en distintos fluidos biológicos como orina, saliva y fundamentalmente sangre.

La presencia de ADN libre en la circulación sanguínea fue descrita por Mandel y Metais en 1948³⁴. Más tarde, se descubre la presencia de ADN circulante en la sangre proveniente de células tumorales³⁵, así como la utilidad de su análisis para determinar la carga tumoral,

evaluar respuestas a tratamientos oncológicos y la detección de mutaciones genéticas que hagan posible la comprensión de la heterogeneidad genética de cada tumor ³⁶.

Además de las células tumorales y sus productos, el resto de células que forma parte del microambiente tumoral y que interaccionan con las células tumorales pueden albergar información importante del proceso neoplásico. En este sentido, en los últimos años se han publicado diversos estudios que postulan que las plaquetas sanguíneas podrían utilizarse como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer. Estos estudios han demostrado que las células tumorales transfieren biomoléculas del tumor a las plaquetas. Este fenómeno se ha denominado “educación” y se ha acuñado el término de “plaquetas educadas por el tumor” (TEP, tumor-educated platelets) para definir este tipo de plaquetas que contienen material tumoral. Las plaquetas educadas por el tumor podrían ser una nueva forma de biopsia líquida, tal y como se ha propuesto recientemente, a raíz de un estudio llevado a cabo por investigadores holandeses³⁷ que analizaron mediante secuenciación masiva el ARN plaquetario de 228 pacientes con diferentes tipos de cáncer (pulmón, glioblastoma, colon, páncreas, hepatobiliar y mama) y 55 individuos sanos, logrando distinguir a partir del perfil de ARN plaquetario los pacientes sanos de los que tenían cáncer con una precisión del 96%. Además, el perfil de ARN consiguió identificar la localización de los diferentes tipos de cáncer con una precisión del 71%. Esta técnica logró detectar eficazmente los tumores con mutaciones Her2, KRAS, EGFR o PIK3CA, lo que podría ser realmente útil en el futuro de cara a elaborar estrategias terapéuticas más personalizadas para cada tipo de tumor.

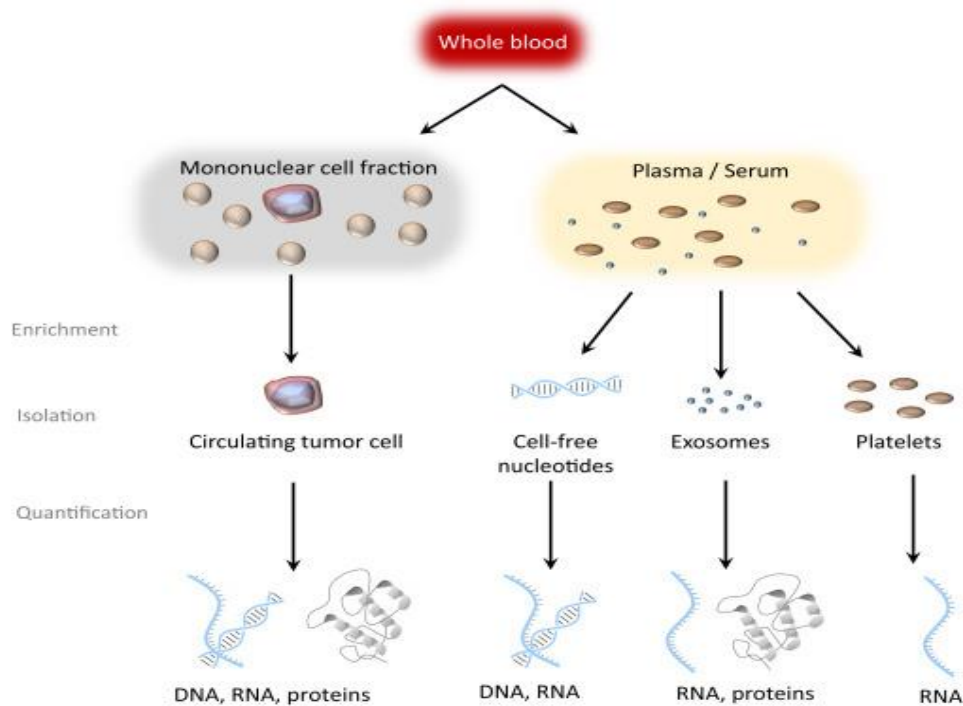


Figura 4: De la sangre podemos obtener células tumorales circulantes las cuales nos proporcionan información sobre el genoma tumoral, transcriptoma, e información sobre las proteínas del tumor. Del plasma podemos estudiar también los nucleótidos de circulación libre así como exosomas, ya que son partículas potencialmente segregadas por el tumor. Las plaquetas educadas por los tumores (TEPs) aportan información adicional sobre la localización del tumor primario en su mARN. Imagen obtenida de: Simon A. Joosse¹ and Klaus Pantel¹: Tumor-Educated Platelets as liquid biopsy in cáncer patients. Rev cancer cell³⁸.

Resulta interesante el hecho de que las principales diferencias observadas en el estudio dependieran mayormente del tipo de tumor primario y no tanto del grado de extensión tumoral o de la presencia o no de metástasis. Según Joosse et al³⁸, una explicación a esto podría ser el bajo número de pacientes que se han estudiado para cada tipo de tumor, así como la gran diversidad que existe entre estos tumores en términos de extensión tumoral y metástasis. Por ejemplo, mientras que en el glioblastoma no es frecuente la formación de metástasis, los carcinomas pancreáticos o pulmonares suelen ser ya metastásicos en el momento del diagnóstico. Por ello, según los autores, se necesitan estudios más grandes y homogéneos para responder a la cuestión de si la secuenciación de TEPs puede ser útil de cara a evaluar el riesgo de extensión metastásica.

En 2008, Nilsson et al³⁹ llevan a cabo una investigación para demostrar la transferencia de ARN portador de mutaciones desde las células tumorales a las plaquetas. Para ello, comparan plaquetas co-cultivadas con células de glioma portadoras de mutación en el receptor de crecimiento epidérmico variante tres (EGFRvIII), con plaquetas co-cultivadas con células de glioma negativas para dicha mutación. Al estudiar los resultados, observaron que las plaquetas del primer grupo contenían estas mutaciones en su ARN mientras que las plaquetas cultivadas

junto a células de glioma sin esta mutación no contenían ARN mutante. Este fenómeno fue igualmente demostrado in vivo. Para ello, los investigadores inocularon células de glioma con la mutación EGFRvIII en el cerebro de ratones y, al cabo de dos semanas, realizaron una extracción sanguínea. Las plaquetas fueron aisladas de dicha muestra sanguínea y se comprobó la presencia de ARN con la mutación EGFRvIII en las mismas. Finalmente, los investigadores seleccionaron un grupo de pacientes con gliomas que expresaban la mutación EGFRvIII y un grupo de pacientes sanos como grupo control. Tras analizar las plaquetas extraídas en ambos grupos de pacientes, se objetivó que en el 80% de los pacientes del primer grupo se expresaba la mutación en su ARN plaquetario, mientras que ningún paciente del grupo control contenía plaquetas con dicha mutación. Para demostrar que la presencia de mutaciones propias de células tumorales en las plaquetas no es un fenómeno exclusivo de los gliomas, se realizó el mismo experimento con células de cáncer prostático y la mutación PCA3. También en este caso, las plaquetas de los pacientes que padecían este cáncer con esta mutación expresaban el ARN mutante en su interior.

En el año 2015, el mismo grupo de investigadores ⁴⁰ desarrollan un estudio para evaluar la utilidad de TEP en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Concretamente, su objeto de estudio son los tumores pulmonares portadores de la mutación genética EML4-ALK, los cuales son sensibles al fármaco crizotinib. El estudio fue diseñado con tres objetivos. El primero, determinar la sensibilidad y especificidad del análisis de las plaquetas de los pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas en la detección de la mutación EML4-ALK, evaluando la correlación entre el resultado obtenido del estudio de las plaquetas y el obtenido mediante la biopsia de tejido sólido. El segundo, observar los cambios que se producen en las plaquetas a la hora de expresar la mutación EML4-ALK después de recibir el tratamiento con crizotinib. El tercero, comprobar la viabilidad de monitorizar el seguimiento de los pacientes sometidos a tratamiento con crizotinib a través del análisis de sus plaquetas. Los investigadores querían asimismo comprobar si el desarrollo de resistencias al tratamiento podía ser detectado mediante la evaluación de las plaquetas del paciente antes de que hubiera evidencia radiográfica de la progresión de la enfermedad. Para ello, trabajan en el caso de una paciente de 37 años con carcinoma pulmonar de células no pequeñas. La mutación EML4-ALK fue detectada tanto en el estudio del tumor como en el estudio plaquetario en Marzo de 2012. La paciente respondió al tratamiento con crizotinib y la presencia de la mutación EML4-ALK desapareció de sus plaquetas. Tras la interrupción del tratamiento con crizotinib durante un mes debido a una apendicitis, la mutación reapareció en el estudio de sus plaquetas y volvió a desaparecer tras la reanudación del tratamiento. En

Junio de 2014, la mutación volvió a aparecer en su estudio plaquetario, aunque fue dos meses más tarde cuando, mediante tomografía por emisión de positrones (PET), se detectó la progresión de la enfermedad. Por tanto, en este caso el desarrollo de resistencia al tratamiento y la consecuente progresión de la enfermedad fue anticipada mediante el estudio del ARN plaquetario. Este experimento, aunque se llevó a cabo mediante el seguimiento de una sola paciente, demostró que el estudio de las plaquetas mediante la biopsia líquida podría ser de utilidad en el futuro como marcador diagnóstico de enfermedades oncológicas, y también para evaluar la respuesta de los tumores al tratamiento, así como para anticipar las resistencias creadas al tratamiento por parte del tumor.

En 2016, Hanze et al⁴¹ estudian la expresión del gen de cáncer prostático PCA3 y otros genes en el ARN de las plaquetas de pacientes con cáncer de próstata y la comparan con un grupo de sujetos sanos. El objetivo del estudio es comprobar la utilidad de la determinación de productos plaquetarios para el diagnóstico precoz y el pronóstico del cáncer de próstata. Tras la comparación entre el grupo casos y el grupo controles, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas. La expresión de ARN con la mutación PCA3 por parte de las plaquetas de ambos grupos es equiparable, y no resulta útil en comparación con la determinación de PSA sérico que se emplea actualmente. Los autores concluyen que, para evaluar si la cuantificación de PCA3 plaquetario puede ser útil como indicador de desarrollo neoplásico o como factor pronóstico, son necesarios estudios prospectivos longitudinales más importantes.

La aplicación de técnicas proteómicas al estudio de las plaquetas constituye otra novedosa área de investigación que se está llevando a cabo en diversas patologías en las que están implicadas las plaquetas con objeto de identificar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas de estos trastornos. De esta forma, cada vez son más las evidencias científicas que demuestran que la proteómica plaquetaria constituye una importante herramienta diagnóstica en patologías tan variadas como trastornos de la función plaquetaria, fibrosis quística, trombosis arterial, enfermedad cardiovascular o enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer. En relación a la investigación de los cambios en el proteoma plaquetario en los procesos tumorales, los estudios llevados a cabo por el grupo de Folkman demostraron en un modelo experimental que las concentraciones plaquetarias de proteínas angiogénicas aumentaban en presencia de tumores de tamaño microscópico sin que existiera un aumento paralelo en la concentración sérica de estas proteínas. Así, Cerci et al⁴⁷ llevan a cabo un estudio en el cual evalúan el secuestro de factores reguladores de la angiogénesis en el interior de las plaquetas y su utilidad como marcador para el diagnóstico precoz de neoplasias. Los

autores creen que estos mediadores se encuentran en cantidades mucho más elevadas en el interior de las plaquetas en lugar de en el plasma libre, debido a un proceso de secuestro de los mismos por parte de las plaquetas para protegerlos de las acciones de las enzimas proteolíticas del plasma. En su estudio evalúan el factor plaquetario 4 (PF-4). Este factor es producido casi en exclusiva por los megacariocitos, y en condiciones fisiológicas solo una pequeña parte es captado por las plaquetas en circulación. Es almacenado en los alfa-gránulos de las plaquetas y liberado por las mismas en presencia de daño endotelial, cumpliendo una función de factor antiangiogénico. Los autores demuestran en su estudio que los cambios en las concentraciones plaquetarias de PF-4 pueden ser usadas como biomarcador para detectar neoplasias humanas. Para ello, implantan líneas celulares tumorales de liposarcoma, osteosarcoma y adenocarcinoma mamario en ratones, y evalúan los niveles plasmáticos y plaquetarios de PF-4. Como resultado, los valores de PF-4 plaquetario se multiplican por 7 en los ratones implantados con células de liposarcoma angiogénico y no angiogénico, sin diferencias entre ambos, comparados con los valores de PF-4 plaquetario en ratones sin implantación tumoral. Respecto a los ratones implantados con tumores mamarios u osteosarcoma, la elevación de PF-4 fue más importante en caso de tumores angiogénicos que en caso de aquellos no angiogénicos, aunque en ambos casos se encontraba elevado respecto a los ratones sin tumor. Para evaluar la utilidad de este marcador en la detección precoz de tumores, los autores exploraron la habilidad de PF-4 para detectar la presencia de tumores no angiogénicos microscópicos del tipo liposarcoma. En el momento del implante del tumor en ratones, las cantidades de PF-4 sérico y plaquetario eran similares. Sin embargo, los niveles de PF-4 plaquetario se elevaron en las primeras dos semanas post-implante y se mantuvieron elevados durante el seguimiento por tiempo de 120 días, mientras que los niveles de PF-4 sérico decayeron. A lo largo de estos 120 días de estudio, el tamaño del tumor no superó el tamaño de 1mm. Los autores concluyen por tanto que la determinación del factor antiangiogénico PF-4 plaquetario puede ser de mucha mayor utilidad en el diagnóstico precoz de tumores que la determinación de los niveles plasmáticos del mismo. Presumiblemente este efecto sea equiparable a otros factores relacionados con la angiogénesis que son almacenados en las plaquetas como el VEGF.

En 2011 Peterson et al⁴⁸ compararon los niveles de proteínas angiogénicas en plaquetas de 34 pacientes con CCR respecto a 84 controles sanos ajustados por edad mediante ELISA. Los factores estudiados fueron el factor de crecimiento endotelial (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), PF4, trombospondina-1 (TSP-1) y endostatina. El estudio concluyó que los niveles de PDGF, PF4, y

VEGF se mostraban elevados en las plaquetas, pero no en el plasma de los pacientes con CCR en comparación con los controles. Los niveles elevados de las tres proteínas se correlacionaban con el estadio tumoral. Por el contrario, TSP-1, endostatina y bFGF no estaban elevados en comparación con el grupo control.

Además de los cambios en el ARN o proteínas de las plaquetas, existen otros parámetros plaquetarios que podrían ser útiles tanto para el diagnóstico como para establecer el pronóstico de diferentes tumores. Uno de estos parámetros es el recuento plaquetario. En 2011 Buergy *et al*⁴² realizan un metaanálisis en el cual recopilan datos de más de 25 estudios y 2500 pacientes, relacionando las cifras de trombocitosis en pacientes oncológicos con la supervivencia global. Se concluye que la trombocitosis es considerada como un factor de mal pronóstico independiente, y podría estar relacionada con hasta el 50% de las muertes por cáncer en EEUU. Se ha incluido en el presente trabajo una tabla resumen con información sobre los ensayos clínicos que fueron empleados por los autores del citado metaanálisis para llegar a sus conclusiones. La tabla se encuentra en el Anexo 2.

Asimismo, Viganó *et al*⁴³ llevan a cabo un estudio de cohortes de 2 años de duración (1996-1998), en el cual estudian a 227 pacientes con diagnóstico de cáncer en estadio terminal, con objeto de identificar factores con mayor valor pronóstico en términos de supervivencia, y demuestran que un recuento de linfocitos bajo era un factor independiente de mal pronóstico.

Por tanto existen evidencias de que son factores de mal pronóstico tanto el recuento bajo en linfocitos como la trombocitosis. Debido a ello, surge la idea de emplear el ratio plaquetas/linfocitos (PLR de platelets-lymphocyte ratio en inglés) como un marcador pronóstico independiente en el cáncer. Tradicionalmente, se habían empleado marcadores inflamatorios más clásicos como el recuento de proteína C reactiva (PCR), hipoalbuminemia, o el recuento leucocitario. Para cuantificar el impacto pronóstico de este biomarcador (PLR), Templeton *et al*⁴⁴ realizan un metaanálisis, identificando publicaciones que contuvieran datos sobre la asociación entre PLR y supervivencia global en pacientes con cáncer. Analizaron 20 estudios comprendiendo 12,754 pacientes. Como resultado de su análisis, se vio que un alto valor en el parámetro PLR se correlacionaba con un empeoramiento significativo de la supervivencia en los cánceres colorrectal, gastroesofágico, hepatocelular, pancreático, y de ovario. Dentro del análisis, se observaron diferencias importantes dependiendo del tipo de cáncer, posiblemente debido al hecho de que la inflamación juega papeles diferentes en función del tipo de cáncer. Como ejemplo, en el cáncer colorrectal, que se relaciona con una gran elevación de los marcadores inflamatorios como PCR, se observa una fuerte asociación

entre PLR y la supervivencia. Los investigadores concluyen que un alto PLR es un factor independiente asociado a peor pronóstico en muchos tumores sólidos, y es comparable a otros marcadores de inflamación hematológicos ya establecidos. Siendo una determinación coste-efectiva y de fácil interpretación, el PLR podría ser de utilidad.

Hong -xin *et al*⁴⁵ desarrollan igualmente un meta-análisis sobre 12 artículos, incluyendo 3541 pacientes con carcinoma colorrectal para estudiar el valor de PLR como herramienta pronóstica en este tipo concreto de cáncer. Estos investigadores no van a evaluar el rendimiento pronóstico de este biomarcador únicamente a través de la medición de la supervivencia global en los pacientes, sino que van a emplear otras mediciones como supervivencia libre de enfermedad, supervivencia libre de recurrencia o supervivencia cáncer-específica. Tras el análisis estadístico de los datos, concluyen que un elevado PLR se asociaba de manera significativa con un peor pronóstico en términos de supervivencia global. El estudio muestra que esta correlación se da con especial fuerza cuando se trata de pacientes metastásicos, pacientes caucásicos, y en aquellos pacientes que como tratamiento oncológico se habían sometido únicamente a la cirugía. Por otro lado, no se encontró asociación significativa en pacientes sometidos a tratamiento quimioterápico, en aquellos con enfermedad localizada no metastásica, ni en la población asiática. Asimismo, un PLR elevado se relacionó con una menor supervivencia libre de enfermedad en paciente metastásico y caucásico, y con una menor supervivencia en términos de supervivencia cáncer-específica, mientras que no se encontró asociación significativa entre PLR y supervivencia libre de recurrencia. Por tanto, los investigadores concluyen que el PLR es un prometedor biomarcador pronóstico, especialmente en pacientes caucásicos con cáncer colorectal metastásico, y podría ser empleado en un futuro próximo debido a su fácil determinación y su bajo coste.

En la misma línea, Joy You⁴⁶ *et al* realizan un estudio en 1314 pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal, determinando los valores preoperatorios de PLR y buscando una relación entre estos y la supervivencia global de los pacientes. Como resultado del análisis de estos 1314 pacientes, se observa que un nivel alto de PLR se asociaba de manera significativa e independiente con un peor pronóstico en términos de supervivencia global. Los valores de PLR mostraban una relación estrecha con elementos como el estadio tumoral, niveles de CEA o estado nutricional del paciente. Por tanto los autores concluyen que el PLR podría ser usado como un potencial predictor de mortalidad.

2.2 Las plaquetas como diana terapéutica en el cáncer.

Existiendo evidencias científicas de la participación de las plaquetas con las células tumorales, se han desarrollado estudios que evalúan la eficacia de terapias antiplaquetarias como fármacos anticancerosos, tanto a la hora de prevenir el desarrollo tumoral como de minimizar su capacidad metastatizante.

A continuación se incluye un breve resumen sobre los mecanismos de acción de la aspirina, pues es el fármaco antiplaquetario cuyos efectos en la quimioprevención del cáncer (especialmente CCR) han sido más estudiados, y se nombrarán repetidas veces de aquí en adelante.

-Farmacodinámica de la aspirina:

El mecanismo de acción mejor descrito de la aspirina es el de la inactivación permanente de la COX-1 y la COX-2. Estas isoenzimas catalizan el primer paso en la biosíntesis de prostanoides, es decir la transformación de ácido araquidónico en prostaglandina H_2 (PGH_2). PGH_2 es el precursor inmediato de prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina F_2 (PGF_2), prostaglandina I_2 (PGI_2) y Tromboxano A_2 (TXA_2)⁴⁹.

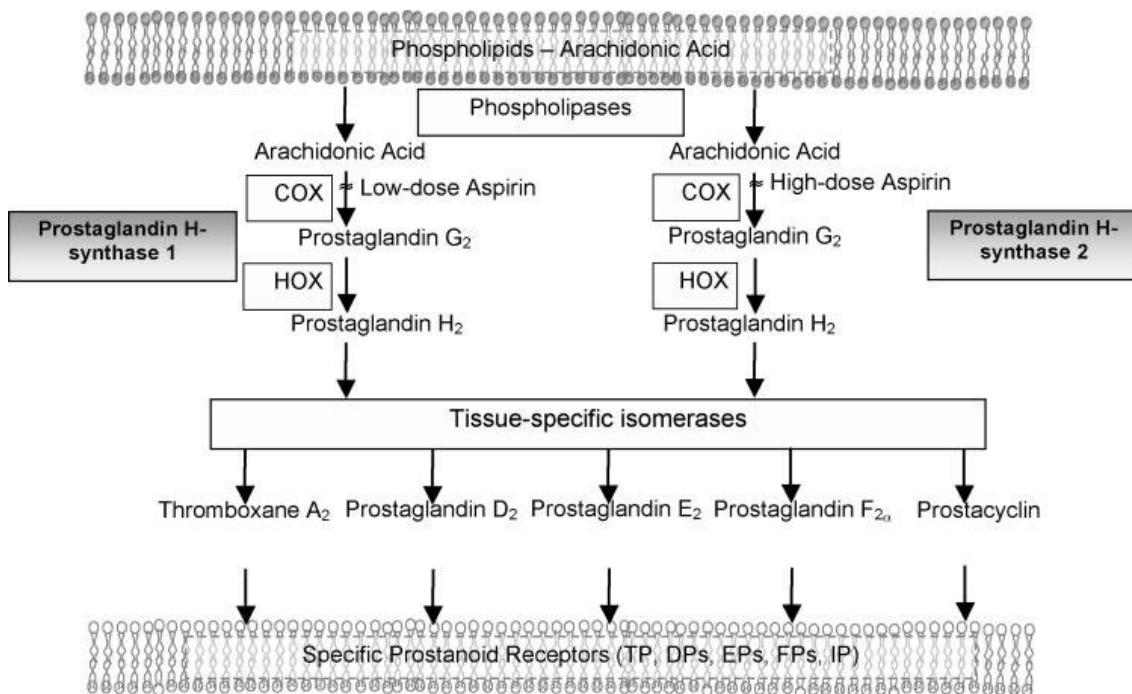


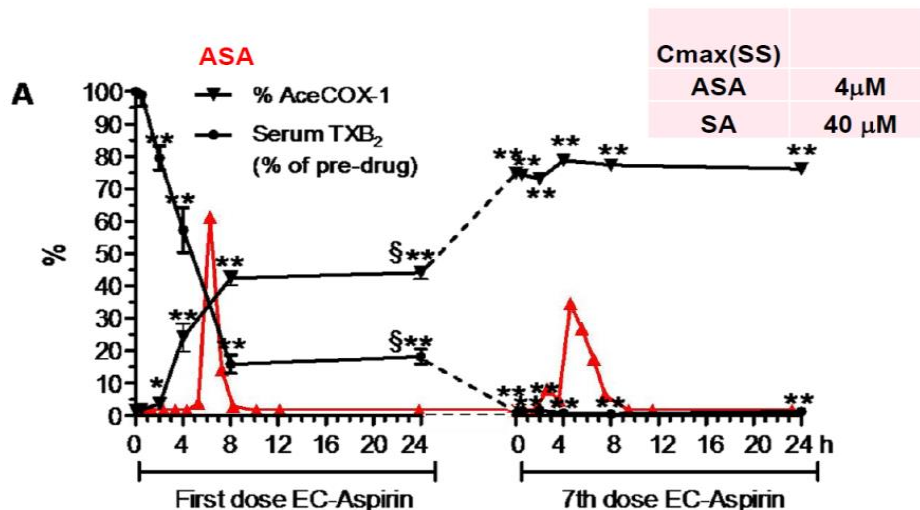
Figura 5: Metabolismo del ácido araquidónico y mecanismo de acción de Aspirina. Imagen obtenida de: Antiplatelet Drugs American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest journal 2008;133;199-233⁴⁹.

El mecanismo molecular por el cual la aspirina inactiva de forma permanente la COX es a través de la acetilación de un residuo de serina, que evita el acceso de los sustratos al sitio de catalización de la enzima. Para conseguir el bloqueo de la COX-1, se requieren bajas dosis de aspirina con una sola toma diaria, mientras que la inactivación permanente de COX-2 requiere dosis de aspirina más grandes e intervalos de administración más cortos.

Las plaquetas humanas y el endotelio vascular procesan PGH_2 para producir TXA_2 y PGI_2 , respectivamente. TXA_2 induce vasoconstricción y agregación plaquetaria, mientras que PGI_2 inhibe la agregación e induce vasodilatación. Mientras que TXA_2 deriva principalmente de la actividad de la COX-1 plaquetaria y por tanto es sensible a la inhibición por aspirina, PGI_2 deriva de COX-1 y, en mayor medida, de COX-2, siendo por tanto insensible a la inhibición por aspirina a dosis bajas. Este hecho es importante pues existen dos líneas de evidencia que demuestran que PGI_2 es tromboprotector, como son la observación de un aumento en el número de eventos tromboticos en ratones carente de receptor PGI_2 ⁴⁹, y el aumento de eventos cardiovasculares asociados al uso de inhibidores selectivos de COX-2 (Coxibs), como muestra un metaanálisis que analizó el uso de estos fármacos comparado con placebo donde el número de eventos cardiovasculares se incrementaba en un 42%, siendo el evento principal el infarto de miocardio⁵⁰. COX-1 es la única isoforma presente en las plaquetas maduras y es la fuente de la producción de TXA_2 . COX-2 se encuentra en varios tejidos (endotelio vascular, riñón y cerebro) y su expresión es inducida en otros tejidos durante la inflamación, reparación de heridas y desarrollo de neoplasias. La COX-2 es la fuente principal de PGI_2 en el endotelio vascular. Aunque la aspirina comparte la misma diana molecular que otros antiinflamatorios no esteroideos (AINES), se diferencia de ellos en cómo inhibe las isoenzimas de COX. Mientras que la aspirina inactiva irreversiblemente las isoenzimas COX-1 y COX-2, los AINES compiten con el ácido araquidónico de manera reversible. Por tanto, la recuperación de la función COX después del tratamiento con aspirina requiere la síntesis de novo de la enzima, mientras que la inhibición por otros AINES es reversible. Las plaquetas maduras, que contienen únicamente COX-1, son particularmente sensibles a los efectos duraderos de las bajas dosis de aspirina, porque carecen de núcleo. Otras células nucleadas son capaces de resintetizar la COX en unas pocas horas. Además, las plaquetas están expuestas a una mayor concentración de aspirina durante su paso por la circulación portal, donde las concentraciones de aspirina son un 50% mayor que en la circulación sistémica. La vida media de la aspirina en la concentración sistémica es además corta (15-20 min) debido al metabolismo hepático y a las enzimas esterazas del plasma. Por tanto, el régimen de aspirina empleado hasta ahora como dosis cardioprotectoras (75-100 mg al día) tiene muy pocos efectos sobre dianas extraplaquetarias.

Las dosis antiinflamatorias de aspirina (> 2000mg al día) alcanzan concentraciones sistémicas suficientes para inhibir tanto la COX-1 como la COX-2, pero este efecto puede mantenerse en las células nucleadas mediante la repetición de la dosis 3 o 4 veces al día. El principal efecto adverso de la aspirina es el sangrado, predominantemente el sangrado del tracto gastrointestinal alto y raramente involucrando la hemorragia intracraneal. Los niveles de dosis de 75-325mg al día aproximadamente doblan el riesgo de sangrado gastrointestinal mayor, y este riesgo de sangrado aumenta con la edad. Con dosis más altas de aspirina, normalmente usadas con intención analgésica (por ejemplo, 650 mg tres veces al día), se obtienen suficientes concentraciones plasmáticas del fármaco para inhibir la COX-1 en la mucosa gastrointestinal, aboliendo por tanto el efecto citoprotector que PGE2 y PGI2 ejercen sobre la mucosa gastrointestinal. Las dosis analgésicas de aspirina multiplican por 10 el riesgo de sangrado gastrointestinal y perforación respecto a la ausencia de toma de aspirina. Por fortuna, estas dosis son mucho mayores que las dosis propuestas como profilaxis en el desarrollo de CCR⁵¹.

Time-dependent acetylation of platelet COX-1 and reduction of serum TXB₂ generation after chronic dosing with low-dose EC-aspirin (100 mg/d) in healthy subjects



Data are reported as mean±SEM, n=24; *P<0.05, **P<0.01 versus predrug(time 0h); §P<0.01 versus all time-points of 7th aspirin dose. Patrignani et al., JTH 2014; 12:1-11

Figura 6: En esta gráfica se relaciona la concentración de ácido salicílico con el porcentaje de COX-1 que ha sido acetilado y el porcentaje de TXB₂ encontrado en el plasma en relación a las concentraciones del mismo antes de la administración del fármaco. Como se observa en la gráfica, a partir de la séptima dosis de Aspirina, la cantidad de TXB₂ es indetectable. Efecto del ácido acetilsalicílico a dosis baja en la acetilación de la ciclooxygenasa-1 plaquetaria y de la mucosa colónica y su repercusión en el cáncer colorrectal. Paola Patrignani et al., JTH 2014; 12:1-11.

Guillem- Lobat *et al*⁵² realizan un estudio en 2016 para averiguar los mecanismos moleculares de acción de la aspirina en la prevención del desarrollo de metástasis de carcinoma colorrectal. Su objetivo era determinar si la inhibición selectiva de la COX-1 plaquetaria mediante aspirina podía evitar el desarrollo de un fenotipo mesenquimal (el ya nombrado proceso EMT) en células HT29 de carcinoma colorrectal. Asimismo, exploraron si los efectos antitumorales de la aspirina se debían a una acción común compartida con otros antiplaquetarios con otros mecanismos de acción diferentes, como el ticagrelor, un antagonista del receptor plaquetario de ADP P2Y12, y DG-401, un antagonista del receptor de prostaglandina E2 (PGE2) plaquetario.

El objeto del estudio era determinar si la exposición de HT29 a plaquetas humanas *in vitro* mejoraba su capacidad para formar metástasis pulmonares *in vivo*. Se emplean ratones inmunodeficientes en los cuales se inyecta por vía intravenosa células HT29 y se cuantifica la formación de metástasis pulmonares a los 7 días. Para investigar la influencia de las plaquetas, se expone a las células HT29 a plaquetas humanas *in vitro* durante 40 horas, y posteriormente se lavan estas células tumorales, dejándolas libres de plaquetas. De esta forma, liberando a las células tumorales de las plaquetas a las 40 horas, los investigadores se aseguran de estar evaluando qué cambios han podido acontecer en las células solo por estar en contacto con plaquetas humanas durante ese periodo. Tras inocular a los ratones las células tumorales, se objetiva un incremento sustancial en el desarrollo de metástasis. Debido a que PGE2 posee efectos biológicos asociados al cáncer, los investigadores miden los niveles urinarios de PGE-M, metabolito de PGE2, observando niveles más altos en los ratones inyectados con células tumorales cultivadas con plaquetas en comparación con los ratones inyectados con células tumorales sin exposición a plaquetas previa.

Tras esto, se estudia los efectos de la aspirina en la formación de metástasis *in vivo*, con la administración de 20mg/kg de aspirina diarios mediante alimentación forzada unos 4-7 días después de la inyección de HT29. Esta dosis empleada correspondería a una dosis de 150 mg diarios en humanos. Se observa que el incremento de metástasis producido por la exposición de las células tumorales a plaquetas se contrarresta mediante la administración de aspirina. Además, el incremento en los niveles de TXA2 y de PGE2 también se ve contrarrestado.

Este mismo estudio también investiga los efectos de aspirina en la EMT. Para ello, cultivan células HT29 junto con plaquetas y miden los niveles de expresión de e-cadherina, marcador de fenotipo epitelial. La interacción de las plaquetas con las células HT29 se asociaba a una reducción significativa en los niveles de e-cadherina. Tras determinar esto, se repite el proceso

pero empleando plaquetas previamente expuestas a aspirina, y se observa como desaparece la reducción en los niveles de e-cadherina.

Los investigadores evaluaron el efecto de un antagonista del receptor plaquetario P2Y₁₂ llamado ticagrelor. El empleo de ticagrelor evitó el descenso en los niveles de E-cadherina en las células HT29 cultivadas junto a plaquetas, y también disminuyeron los niveles de PGE₂ y Tromboxano B₂ (TXB₂).

En 2007, el servicio de actividades preventivas de los estados Unidos (USPSTF por sus siglas en inglés) hizo una recomendación en contra del uso de aspirina como tratamiento preventivo del CRC⁵³. Sin embargo, 9 años más tarde, el mismo organismo expresaba lo siguiente: " USPSTF recomienda iniciar el uso de aspirina a bajas dosis para la prevención primaria de enfermedad cardiovascular (CVD por sus siglas en inglés) y CCR en adultos con edad comprendida entre 50 y 59 años que tengan un riesgo cardiovascular a 10 años del 10% o más, no tengan un riesgo incrementado de sangrado, tengan una esperanza de vida de al menos 10 años, y estén dispuestos a tomar aspirina a bajas dosis diariamente durante al menos 10 años".⁵⁴

Una revisión realizada en el 2016 por Paola Patrignani y Carlos Patrono⁵⁵ revisa las evidencias más recientes en torno al efecto quimiopreventivo de la aspirina que han motivado este cambio en las recomendaciones del USPSTF.

En 1988, Kune et al ⁵⁶ realizan un estudio de casos-controles, incluyendo 715 casos de pacientes con diagnóstico histológico confirmado de CCR y 727 controles ajustados por sexo y edad, con la intención de adivinar factores de riesgo o protectores para el desarrollo de CCR. Estudian por tanto la relación del CCR con ciertas enfermedades crónicas, intervenciones quirúrgicas o tratamientos prolongados. Al analizar el consumo de fármacos previos, encuentran una disminución significativa en la incidencia de CCR en aquellos sujetos que han tomado de manera crónica aspirina o medicamentos que contengan aspirina. Estos hallazgos son consistentes tanto para hombres como para mujeres. En cambio, el uso de AINES, esteroides, anticonceptivos orales, sedantes o pastillas para dormir era similar para los casos y los controles. Existía por tanto un déficit significativo en el consumo de aspirina entre los casos comparándolos con los controles. En opinión de los autores, este mecanismo, con independencia de su explicación fisiopatológica, tenía un potencial impacto en la quimiopreención del cáncer colorrectal y requería una confirmación rápida, pues podía suponer en el futuro ampliar las indicaciones quimiopreventivas de la aspirina, empleándose no solo como fármaco cardioprotector.

Estos hechos fueron confirmados posteriormente por numerosos estudios epidemiológicos, los cuales fueron analizados en un metaanálisis llevado a cabo por Algra y Rothwell⁵⁷. Estos autores realizan una búsqueda de estudios casos-control y estudios de cohortes publicados entre 1950 y 2011 que informaran sobre asociaciones entre el uso de aspirina y el riesgo de desarrollar cáncer. En los estudios de casos-controles, el uso regular de aspirina se asociaba con una reducción del riesgo de desarrollar CCR, con pequeñas diferencias entre los estudios, y con una buena correlación con el efecto asociado al uso de aspirina diaria que se observaba en ensayos clínicos aleatorizados. Reducciones similares fueron observadas en el riesgo de cáncer esofágico, gástrico, biliar o mamario, siendo los efectos más notables en cánceres que afectaran el tracto gastrointestinal.

En 2009, Cole *et al*⁵⁸ diseñan un metaanálisis combinando datos de ensayos clínicos aleatorizados con doble ciego que compararan la incidencia de adenomas colorrectales o lesiones más avanzadas (adenomas tubulovelloso, adenomas vellosos, adenomas con diámetro mayor a 1 cm, adenomas con displasia de alto grado o cáncer invasivo) en pacientes consumidores de aspirina con un grupo placebo. Identifican 4 ensayos clínicos con 2967 participantes. Las dosis de aspirina asignadas iban de 81-375 mg/día. 33 meses después de comenzar el estudio, se encontró adenomas en un 37% de los participantes asignados a placebo y en un 33% de los participantes asignados al grupo aspirina. Respecto a lesiones avanzadas, se encontraron en un 12% de los asignados a placebo y en el 9% de los asignados al grupo aspirina. En el estudio no se objetivan fenómenos de dosis-dependencia. De hecho, una comparación directa entre dosis altas (300-325 mg/día) con dosis bajas (81-160 mg/día) de aspirina mostraba una reducción del riesgo de adenoma significativamente más alta cuando se empleaban dosis bajas de aspirina. Estos hechos apoyan la teoría de que la aspirina a bajas dosis interfiere con las primeras etapas de transformación de la mucosa intestinal en adenoma, lo que es considerado el precursor de la mayoría de CCR. En la misma línea, en 2014 se lleva a cabo en Japón un ensayo clínico para probar la eficacia de aspirina en dosis de 100mg/día en la prevención de CCR en pacientes con lesiones preneoplásicas⁸¹. El tiempo de tratamiento fue de dos años, y se observó un descenso en el desarrollo de CCR aquellos sujetos asignados al grupo aspirina en comparación con el grupo placebo. Este efecto quimiopreventivo fue mucho más eficaz en pacientes no fumadores.

El síndrome de Lynch es la causa más importante de CCR hereditario⁵⁹. Los individuos con síndrome de Lynch tienen un riesgo de 50-70% de desarrollar CCR y un 40-60% de desarrollar cáncer endometrial. Está causado por mutaciones genéticas autosómico dominantes que

provocan defectos en la función de reparación del ADN. Los CCR en el síndrome de Lynch están caracterizados por un ratio de progresión adenoma- carcinoma de 1:1, comparado con los casos de CCR espontáneo que tienen un ratio de 30:1. Es decir, si se permite su evolución, la gran mayoría de los pólipos existentes en un paciente afecto de síndrome de Lynch se malignizarán⁵⁹. Por todo ello, es importante la búsqueda de estrategias preventivas que impidan o dificulten el desarrollo de CCR en pacientes diagnosticados de síndrome de Lynch.

Así, en 2008, Burn et al realizan un ensayo clínico⁶⁰ en el que comparan los efectos de la aspirina (600mg/día) con la ingesta de 30g/día de almidones resistentes -la ingesta de almidones resistentes se ha asociado a efectos antineoplásicos en el colon- en pacientes afectados con el síndrome de Lynch, ambos grupos comparados con placebo. Tras un periodo de seguimiento medio de 29 meses, el 18.9% de los pacientes asignados al grupo aspirina desarrollaron neoplasias, porcentaje muy similar al de grupo placebo (19%). De entre los pacientes asignados al grupo del almidón resistente, desarrollaron neoplasias un 18.7%, comparado con un 18.4% en el grupo placebo. Los investigadores por tanto concluyen que el uso de aspirina o de almidones resistentes durante 4 años no tiene efectos en la incidencia de adenoma colorrectal o carcinoma entre los pacientes con síndrome de Lynch.

Sin embargo, este mismo grupo de investigación lleva a cabo un seguimiento a largo plazo de este mismo grupo de pacientes a estudio⁶¹ y, con un periodo medio de seguimiento de 55.7 meses desde la intervención, encuentran reducciones significativas en la incidencia de CCR en los pacientes asignados al grupo de aspirina, concluyendo por tanto que el tratamiento con aspirina a 600mg/día durante una media de 25 meses reduce la incidencia de cáncer a los 55.7 meses en pacientes con síndrome de Lynch.

En el año 2010, Rothwell et al⁷⁶ evalúan el efecto de la toma de aspirina sobre la incidencia y mortalidad debida a CCR mediante el análisis de 4 ensayos clínicos que estudiaban el efecto de aspirina comparada con placebo en la prevención de eventos cardiovasculares. Aunque el objetivo primario de estos ensayos clínicos no era evaluar el papel de la aspirina como agente quimiopreventivo, la información podía ser obtenida con fiabilidad mediante un seguimiento post-ensayo y la consulta de datos en los registros de mortalidad y cáncer. La duración media del tratamiento en estos 4 ensayos clínicos fue de 6 años. De los 14033 pacientes que participaron en ellos, 391 (2.8%) desarrollaron CCR durante un periodo de seguimiento medio de 18.3 años, de los cuales 240 murieron. Las dosis de aspirina empleadas en los ensayos variaban desde 75mg a 1200mg al día. La asignación al grupo aspirina redujo la incidencia de CCR en un 24% y la mortalidad CCR-específica en un 35%.

De nuevo Rothwell y sus colaboradores⁷⁷ se sirvieron en 2011 de ensayos clínicos con aspirina diseñados inicialmente para evaluar el efecto de la misma en la prevención de eventos

cardiovasculares, para estudiar el efecto de la aspirina en la incidencia y mortalidad debida al cáncer, en esta ocasión evaluando cánceres tanto gastrointestinales como no gastrointestinales. El estudio se llevó a cabo con los datos recolectados en 8 ensayos clínicos, en los cuales participaron un total de 25570 pacientes. Cuando se analizaron los datos individuales de los pacientes, el beneficio de la toma de aspirina era evidente tras solo 5 años de seguimiento. El riesgo de muerte por cáncer a los 20 años permaneció más bajo en los grupos asignados a aspirina respecto a los grupos control. El periodo de latencia tras el tratamiento que debía transcurrir antes de verse un efecto en las muertes fue de alrededor de 5 años para el carcinoma esofágico, pancreático, cerebral y pulmonar, y de más tiempo para el carcinoma gástrico, colorrectal y prostático. Respecto a los carcinomas de esófago y pulmón, el efecto quimiopreventivo de aspirina se observó solo en los adenocarcinomas. El beneficio se demostró independiente a la dosis de aspirina empleada (siempre que la dosis fuera de mínimo 75mg/día), e incrementaba con la edad, alcanzando una reducción absoluta del 7.08% en el riesgo de muerte por cáncer a los 20 años en pacientes a partir de 65 años.

Los dos ensayos clínicos más grandes hasta la fecha que han evaluado el efecto de la aspirina como prevención primaria son el Physicians' Health Study (PHS) y el Women's Health study (WHS). En el PHS⁷⁸, llevado a cabo en 1989, se comparó el efecto de la toma de aspirina 325mg en días alternos contra placebo por parte de 22.071 hombres, y tras 5 años de seguimiento, no se observaron diferencias en la incidencia de CCR. Tras esto se extendió el periodo de seguimiento a 12 años, pero tampoco se observaron diferencias. En el WHS⁷⁹ se emplearon dosis de aspirina 100mg en días alternos, y fue el único ensayo clínico específicamente diseñado para examinar el efecto de la aspirina como prevención primaria del cáncer y como prevención cardiovascular. En el estudio participaron 39876 mujeres. Tras 10 años de seguimiento, los autores concluyeron que la asignación al grupo aspirina no se asoció con una reducción en el riesgo de CCR ni de ningún otro tipo de cáncer, con la excepción del carcinoma pulmonar, donde sí se observó una ligera reducción del riesgo. Sin embargo, en un análisis de los datos posterior que incluyó un seguimiento post-ensayo de 18 años de media, se observó una reducción del 20% en la incidencia de CCR en aquellos sujetos asignados al grupo aspirina⁸⁰. A día de hoy no se ha encontrado una explicación al hecho de que los ensayos PHS y WHS mostraran unos resultados diferentes, ya que ambos comparaban el efecto de aspirina tomada en días alternos respecto a placebo.

Para indicar el uso de aspirina a bajas dosis como prevención del CCR, se deben realizar estudios de beneficio riesgo. El principal efecto secundario de la aspirina es el sangrado mayor, especialmente el sangrado mayor cerebral. En 2012 Rothwell et al⁶² desarrollan un

metaanálisis donde estudian el uso de aspirina a largo plazo y su asociación con el desarrollo de cáncer, los eventos cardiovasculares, y el sangrado cerebral, considerándose este último el principal riesgo derivado de la toma de aspirina. Al estudiar estos tres parámetros, descubren que, al contrario de lo que sucede con la incidencia de cáncer la cual disminuye cuando el tratamiento de aspirina se alarga, tanto los eventos cardiovasculares como los sangrados cerebrales tienen a igualar sus incidencias respecto a placebo cuando el tiempo de seguimiento es mayor a tres años. Es decir, el potencial efecto perjudicial de aspirina en forma de sangrados cerebrales tiende a disminuir si el tratamiento con la misma se realiza a largo plazo, mientras que el efecto preventivo en CCR aumenta. Por ello, se entiende que el efecto de reducción de la mortalidad asociado al uso de aspirina a largo plazo es debido a su acción preventiva sobre el desarrollo de neoplasias, ya que la muerte por accidentes vasculares no disminuye y la muerte por sangrados cerebrales no aumenta ⁶². Además, la proporción de episodios de sangrado cerebral que resultaron fatales fue mayor en los pacientes asignados al grupo placebo que en los pacientes asignados al grupo aspirina. En un análisis de este mismo estudio se afirma que, aunque los beneficios vasculares y anticancerosos sobrepasan los daños por sangrado cerebral mayor, estos análisis no tienen en cuenta efectos adversos menos serios como sangrados menores, que, aunque no comprometen la vida del paciente, pueden afectar a su calidad de vida⁶³.

En 2015, Mammadova et al⁶⁴ realizan una revisión sobre las evidencias publicadas hasta ese momento que evalúen el papel de las plaquetas en el cáncer, y se centran en las implicaciones terapéuticas existentes. Respecto a la aspirina, estudios prospectivos han demostrado que la toma de aspirina (300 mg al día) durante un mínimo de 5 años es efectiva en la prevención primaria de CCR, con una latencia de 10 años, es decir que es a los 10 años del comienzo del tratamiento cuando se observa un descenso en la incidencia de CCR ⁶⁵. En 2012, un estudio prospectivo estudia el efecto de la toma de aspirina en el desarrollo de metástasis⁶⁶. Para ello, emplean una base de 17285 pacientes que tomaban aspirina diariamente como prevención de enfermedad cardiovascular, y la comparan con un grupo control. Se compara la incidencia de metástasis en los pacientes que desarrollaran un tumor a lo largo del estudio. Los pacientes que tomaban aspirina tenían un riesgo menor de presentar metástasis en el momento del diagnóstico de la enfermedad tumoral así como un riesgo menor de aparición de metástasis durante el tiempo de seguimiento de la enfermedad en aquellos que no las hubieran presentado desde el inicio. Reimers et al ⁶⁷declaran tras un estudio que el uso de aspirina tras el diagnóstico de cáncer de colon mejora la supervivencia.

Recientemente, en 2013, Zhang et al⁶⁸ elaboran un meta-análisis para estudiar el efecto de la aspirina en el desarrollo de adenocarcinoma de esófago en pacientes con esófago de Barreth.

El resultado del estudio, que comprendió más de 5446 participantes, fue que el uso de aspirina reducía la incidencia tanto de adenocarcinoma de esófago como de displasia de alto grado.

Una revisión publicada recientemente (Mayo del 2017) por Contursi et al⁶⁹ agrupa los resultados obtenidos con terapias antiplaquetarias como tratamiento oncológico, revisando no solo los resultados obtenidos con aspirina sino evaluando el efecto de otros fármacos antiagregantes.

El receptor de ADP plaquetario P2Y₁₂ es la diana farmacológica de algunos agentes antitrombóticos, incluyendo las tiopiridinas (ticoplidina, clopidogrel y prasugrel), que inhiben el receptor de manera irreversible, y los antagonistas directos y reversibles del mismo (ticagrelor, cangrelor y elinogrel)⁶⁹.

Según los autores, aunque diversas líneas de evidencia obtenidas en experimentación animal apoyan un posible efecto antitumoral de estos fármacos, su eficacia no ha sido probada en humanos. Los autores revisan las evidencias experimentales realizadas con los fármacos inhibidores del receptor P2Y₁₂ en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Así, Wang et al⁷⁰ prueban que los ratones con una deficiencia en la expresión del receptor P2Y₁₂ muestran un menor número de metástasis cuando padecen un carcinoma pulmonar (Lewiss Lung Carcinoma). Además Sitia et al⁷¹ demuestran que la coadministración de clopidogrel y aspirina evitaba o retrasaba la formación de hepatocarcinoma y mejoraba la supervivencia en ratones con hepatitis B. Respecto al receptor GPIIb/IIIa, Boukerche et al⁷² demuestran su implicación en la comunicación entre las plaquetas y las células de melanoma. Estos investigadores emplean un anticuerpo monoclonal (LYP18) dirigido contra GPIIb/IIIa e inhiben tanto las interacciones entre las plaquetas y las células del melanoma como el fenómeno de agregación plaquetaria. Asimismo, Nierodzik et al⁷³ descubren que el bloqueo de GPIIb-IIIa empleando el anticuerpo monoclonal 10E5 provoca un descenso en la colonización pulmonar por parte de células cancerosas en experimentos con ratones. Los autores de esta revisión también evalúan el efecto de los receptores PAR, cuyos efectos han sido expuestos previamente en este trabajo. Un estudio demostró que, tras la inyección de células de melanoma en varios grupos de ratones, el número de metástasis pulmonares era menor en aquellos ratones que no expresaban los receptores PAR4, debido a su implicación en los fenómenos de angiogénesis⁷⁴. Además, otro estudio reciente demuestra que el uso de heparina y de fondaparinux reducía la activación de las plaquetas por parte de células cancerígenas mamarias debido a la no activación del receptor PAR1 por parte de trombina⁷⁵.

Las evidencias publicadas que demuestran la eficacia de aspirina como fármaco quimiopreventivo en el cáncer son numerosas. En la actualidad, hay una gran cantidad de

ensayos clínicos en marcha evaluando este efecto, los cuales se han resumido en el **anexo 3** al final de este trabajo en una tabla informativa.

CONCLUSIONES

- 1- Existe un vínculo demostrado entre las funciones plaquetarias y el desarrollo tumoral. Las plaquetas participan activamente promoviendo los procesos de angiogénesis y metástasis tumoral.
- 2- La interacción con las células tumorales induce en las plaquetas su activación así como modificaciones en su perfil de ARN y proteínas. El análisis del transcriptoma y proteoma plaquetario ha demostrado ser útil como biomarcador tanto para el diagnóstico precoz del cáncer, como para evaluar la respuesta al tratamiento quimioterápico y la detección de recidivas. Sin embargo, dado que el número de evidencias es todavía limitado, son necesarios nuevos estudios antes de que pueda tener aplicación clínica.
- 3- El recuento plaquetario aumentado (trombocitosis) así como la elevación del ratio entre el número de plaquetas y linfocitos representan un factor de mal pronóstico independiente para pacientes con cáncer.
- 4- Las terapias antiplaquetarias han demostrado ejercer un efecto antitumoral. De todas ellas la más estudiada es la aspirina, que ha demostrado de forma reiterada en estudios observacionales y ensayos clínicos de prevención cardiovascular, ejercer un efecto protector, disminuyendo tanto la incidencia como la mortalidad de diferentes tipos de cáncer, especialmente del tracto gastrointestinal.
- 5- El empleo diario de aspirina a dosis bajas en pacientes de riesgo ha mostrado tener un efecto quimiopreventivo a largo plazo para el desarrollo de neoplasias colorrectales, superando los potenciales beneficios al riesgo de sangrado que implica la toma del fármaco.
- 6- La toma de aspirina asociada al tratamiento quimioterápico en pacientes oncológicos ha demostrado disminuir la tasa de metástasis, las recidivas tumorales una vez alcanzada la curación y mejorar la supervivencia de los pacientes

- 7- A pesar de existir evidencia científica del efecto antitumoral de las terapias antiplaquetarias quedan por definir muchas cuestiones como qué drogas son las más efectivas, la dosis y duración óptimas, así como la población de pacientes idónea para beneficiarse de este tipo de tratamiento. Los numerosos ensayos clínicos que se están desarrollando en la actualidad contribuirán sin duda a aclarar estos aspectos.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017;544:105-109.
2. Contursi A, Sacco A, Grande R, Dovizio M, Patrignani P. Platelets as crucial partners for tumor metastasis: from mechanistic aspects to pharmacological targeting. *Cell Mol Life Sci*. 2017. doi: 10.1007/s00018-017-2536-7.
3. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(B):2-7
4. Varki A. Review in translational hematology Trousseau ' s syndrome : multiple definitions and multiple mechanisms. *Library*. 2007;110(6):1723–1729.
5. Monreal M, Fernandez-Llamazares J, Piñol M, Julian JF, Broggi M, Escola D et al. Platelet count and survival in patients with colorectal cancer--a preliminary study. *Thromb Haemost*. 1998;79(5):916-8.
6. Hanahan D, Coussens L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*.2012; 21(3): 309–322.
7. Mammadova-Bach E, Mangin P, Lanza F, Gachet C. (2015). Platelets in cancer: From basic research to therapeutic implications. *Hamostaseologie*.2015; 35(4):325–336
8. Sørensen HT, Mellekjær L, Steffensen FH, Olsen JH, Nielsen GL. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 1998; 338(17):1169-1173
9. Bambace N. M, Holmes C. E. The platelet contribution to cancer progression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.2011; 9(2): 237–249.
10. Sasaki Y, Takahashi T, Miyazaki H, Matsumoto A, Kato T, Nakamura K et al. Production of thrombopoietin by human carcinomas and its novel isoforms. *Blood*. 1994;94(6):1952–60.
11. Lowe KL, Navarro-Nunez L, Watson SP. Platelet CLEC-2 and podoplanin in cancer metastasis. *Thrombosis Research*. 2012;Vol 139:30-37
12. Tian M, Wan Y, Tang J, Li H, Yu G, Zhu J et al. Depletion of tissue factor suppresses hepatic metastasis and tumor growth in colorectal cancer via the downregulation of MMPs and the induction of autophagy and apoptosis. *Cancer Biology and Therapy*.2011; 12(10), 896–907.
13. Tang JQ, Fan Q, Wan YL, Liu YC, Wang X, Wu T et al. Ectopic expression and clinical significance of tissue factor/coagulation factor VII complex in colorectal cancer. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2009; 41(5):531-6.
14. Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet*. 1998;352(9142):1775-7.
15. Rhee JS, Black M, Schubert U, Fischer S, Morgenstern E, Hammes HP et al. The functional role of blood platelet components in angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2004;92(2):394-402.
16. Siamack S, Arjan W.G, Mirjam G.A. The role of blood platelets in tumor angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)*.2011;Vol 1815:189–196.

17. Ma L, Perini R, McKnight W, Dicay M, Klein A, Hollenberg MD et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(1):216-20.
18. Walsh TG, Metharom P, Berndt MC. The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis. *Platelets*. 2015;26(3):199-211.
19. Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE Jr. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood*. 2011; 118:1359-1369.
20. Klement GL, Yip TT, Cassiola F, Kikuchi L, Cervi D, Podust V et al. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood*. 2009;113(12):2835-42.
21. Pipili-Synetos E, Papadimitriou E, Maragoudakis ME. Evidence that platelets promote tube formation by endothelial cells on matrigel. *Br J Pharmacol*. 1998;125(6):1252-7.
22. Sørensen HT, Mellekjaer L, Steffensen FH, Olsen JH, Nielsen GL. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 1998; 338(17):1169-1173.
23. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;61(1):46-52.
24. Chhagan B, Archana R, Saggere MS, Meenu B, Ajeet SB, Rajesh S et al. Platelets contribute to growth and metastasis in hepatocellular carcinoma. *APMIS*. 2016;124:776–786.
25. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN: Lysis of Tumor Cells by Natural Killer Cells in Mice Is Impeded by Platelets. *Cancer Res*. 1999;59(6):1295-300.
26. Kopp HG, Placke T, Salih HR: Platelet-Derived Transforming Growth Factor-β Down-Regulates NKG2D Thereby Inhibiting Natural Killer Cell Antitumor Reactivity. *Cancer Res*. 2009;69(19):7775-83.
27. 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;72(2):440-8.
28. Steinestel K, Eder S, Schrader AJ, Steinestel J. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Transl Med*. 2014; 3: 17.
29. Yitao J, Suqiao Z, Lingling M, Jingbao W, Zujian J, Bin G et al. Activation of platelet protease-activated receptor-1 induces epithelial-mesenchymal transition and chemotaxis of colon cancer cell line SW620. *Oncol Rep*. 2015;33(6):2681-8.
30. Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. Platelet-Derived Nucleotides Promote Tumor-Cell Transendothelial Migration and Metastasis via P2Y2 Receptor. *Cancer Cell*. 2013;24(1):130-7.
31. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10): 883–892.
32. Honn KV, Tang DG. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer Metastasis Rev*. 1992 Nov;11(3-4):353-75.
33. Tímár J, Tóvári J, Rásó E, Mészáros L, Bereczky B, Lapis K. Platelet-Mimicry of Cancer Cells: Epiphenomenon with Clinical Significance. *Oncology* 2005;69:185–201.

34. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142(3-4):241-3
35. Sausen M, Parpart S, Diaz L.A. Circulating tumor DNA moves further into the spotlight. *Genome Med.* 2014 May 28;6(5):35.
36. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A.. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(8):472-84.
37. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman B, Rustenburg F et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell.* 2015;28(5): 666–676.
38. Joosse SA, Pantel K. Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients. *Cancer Cell.* 2015;28(5):552-4.
39. Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E, van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood.* 2011;118(13):3680-3683.
40. Nilsson RJ, Karachaliou N, Berenguer J, Gimenez-capitán A, Schellen P, Teixeira C et al. Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016 7(1):1066-75 .
41. Hänze J, Jakubowski P, Heers H, Hegele A, Timmesfeld N, Hofmann R et al. Assessing blood platelets as RNA biomarker source for prostate cancer. *Biomarkers.* 2016;21(7):653-9.
42. Buerge D, Wenz F, Groden C, Brockmann MA. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer* 2012;130:2747–60.
43. Vigano A, Bruera E, Jhangri GS, Newman SC, Fields AL, Suarez-Almazor ME. Clinical survival predictors in patients with advanced cancer. *Arch Intern Med* 2000;160:861–8.
44. Templeton AJ, Ace O, McNamara MG, Al-Mubarak M, Vera-Badillo FE, Hermanns T et al. Prognostic Role of Platelet to Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(7):1204-12
45. Peng H, Lin K, He B, Pan Y, Ying H, Hu X et al. Platelet-to-lymphocyte ratio could be a promising prognostic biomarker for survival of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *FEBS Open Bio.* 2016;6(7): 742–750.
46. You J, Zhu GQ, Xie L, Liu WY, Shi L, Wang OC et al. Preoperative platelet to lymphocyte ratio is a valuable prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7(18):25516-27.
47. Cervi D, Yip TT, Bhattacharya N, Podust VN, Peterson J, Abou-Slaybi A et al. Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. *Blood.* 2008;111(3):1201-7.
48. Peterson J, Zurakowski D, Italiano JE Jr, Michel LV, Connors S, Oenick M et al. VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis.* 2012;15(2):265-73
49. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet Drugs American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest journal.* 2008;133;199-233.
50. Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature.* 1997.14;388(6643):678-82.

51. Thorat MA, Cuzick J. Role of aspirin in cancer prevention. *Curr Oncol Rep.* 2013;15(6):533-40.
52. Guillem-Llobat P, Dovizio M, Bruno A, Ricciotti E, Cufino V, Sacco A et al. Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cell. *Oncotarget.* 2016;7(22):32462-77.
53. U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. Routine Aspirin or Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs for the Primary Prevention of Colorectal Cancer: *Annals of Internal Medicine.* Ann Intern Med. 2007;146(5):361-4
54. Bibbins-Domingo K, on behalf of the U.S. Preventive Services Task Force. Aspirin use for the primary prevention of cardiovascular disease and colorectal cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2016;164:836–45.
55. Patrignani P, Patrono C. Aspirin and Cancer. *Journal of the American college of cardiology.* J Am Coll Cardiol. 2016;68(9):967-76.
56. Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications: case-control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res.* 1988 Aug 1;48(15):4399-404.
57. Algra AM, Rothwell PM. Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Lancet Oncol* 2012; 13: 518–27.
58. Cole BF, Logan RF, Halabi S, Benamouzig R, Sandler RS, Grainge MJ et al. Aspirin for the Chemoprevention of Colorectal Adenomas: Meta-analysis of the Randomized Trials. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(4):256-66.
59. Sehgal R, Sheahan K, O'Connell PR, Hanly AM, Martin ST, Winter DC. Lynch Syndrome: An Updated Review. *Genes (Basel).* 2014;5(3):497-507.
60. Burn J, Bishop DT, Mecklin JP, Macrae F, Möslin G, Olschwang S et al. Effect of Aspirin or Resistant Starch on Colorectal Neoplasia in the Lynch Syndrome. *N Engl J Med.* 2008;359:2567-78.
61. Burn J, Gerdes AM, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2011; 378: 2081–87.
62. Rothwell PM, Price JF, Fowkes FG, Zanchetti A, Roncaglioni MC, Tognoni G et al. Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials. *Lancet* 2012; 379: 1602–12.
63. Chan AT, Cook NR. Are we ready to recommend aspirin for cancer prevention? *Lancet.* 2012;379(9826):1569-71.
64. Mammadova-Bach E, Mangin P, Lanza F, Gachet C. Platelets in cancer. From basic research to therapeutic implications. *Hamostaseologie.* 2015;35(4):325-36.
65. Flossmann E, Rothwell PM, on behalf of the British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet* 2007; 369: 1603–13.

66. Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* 2012; 379: 1591–601.
67. Reimers MS, Bastiaannet E, van Herk-Sukel MP, Lemmens VE, van den Broek CB, van de Velde CJ et al. Aspirin use after diagnosis improves survival in older adults with colon cancer: a retrospective cohort study. *J Am Geriatr Soc*. 2012 Dec;60(12):2232-6
68. S Zhang, X-Q Zhang, X-W Ding, R-K Yang, S-L Huang, F Kastelein,. Cyclooxygenase inhibitors use is associated with reduced risk of esophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2014;110(9):2378-88.
69. Contursi A, Sacco A, Grande R, Dovizio M, Patrignani P. Platelets as crucial partners for tumor metastasis: from mechanistic aspects to pharmacological targeting. *Cell Mol Life Sci*. 2017. doi: 10.1007/s00018-017-2536-7.
70. Wang Y, Sun Y, Li D, Zhang L, Wang K, Zuo Y et al. Platelet P2Y12 is involved in murine pulmonary metastasis. *PLoS One*. 2013; 8(11).
71. Sitia G, Aiolfi R, Di Lucia P, Mainetti M, Fiocchi A, Mingozi F et al. Antiplatelet therapy prevents hepatocellular carcinoma and improves survival in a mouse model of chronic hepatitis B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(32):E2165-72.
72. Boukerche H, Berthier-Vergnes O, Tabone E, Dore' JF, Leung LL, McGregor JL. Platelet–melanoma cell interaction is mediated by the glycoprotein IIb–IIIa complex. *Blood*. 1989;74(2):658-63.
73. Nierodzik ML, Klepfish A, Karparkin S. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thromb Haemost*. 1995;74(1):282-90.
74. Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood*. 2004 104(2):397–401.
75. Battinelli EM, Markens BA, Kulenthirarajan RA, Machlus KR, Flaumenhaft R, Italiano JE Jr. Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood*. 2014;123(1):101-12.
76. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*. 2010;376(9754):1741-50.
77. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2011;377(9759):31-41.
78. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med*. 1989;321(3):129-35.
79. Cook NR, Lee IM, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE et al. Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005;294(1):47-55.

80. Cook NR, Lee IM, Zhang SM, Moorthy MV, Buring JE. Alternate-day, low-dose aspirin and cancer risk: long-term observational follow-up of a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2013;159(2):77-85.
81. Ishikawa H, Mutoh M, Suzuki S, Tokudome S, Saida Y, Abe T. The preventive effects of low-dose enteric-coated aspirin tablets on the development of colorectal tumours in Asian patients: a randomised trial. *Gut.* 2014 Nov;63(11):1755-9.