



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

“Defensinas plaquetarias como mediadores de la actividad pro-tumoral en cáncer de páncreas.”

T E S I S

Para obtener el grado de
Doctor en Biología Experimental

PRESENTA

M.B.E JONATHAN GONZALEZ RUIZ

Matricula: 2163802008

ORCID: 0000-0003-4323-4061

Correo: jonzalezruiz@gmail.com

COMITE TUTORAL

Director: Dr. JORGE MELENDEZ ZAJGLA

Director: Dr. IVAN BAHENA OCAMPO

Asesor: Dra. KARLA ITZEL VAZQUEZ SANTILLAN

JURADO

Presidente: Dr. DIDDIER GIOVANNI PRADA ORTEGA

Secretario: Dr. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR

Vocal: Dra. MAGALI ESPINOSA CASTILLA

Vocal: Dra. KARLA ITZEL VAZQUEZ SANTILLAN

Iztapalapa, Ciudad de México a 4 de diciembre del 2025.

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de CONAHCYT, registro 001482, en nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Este Trabajo fue realizado en el laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN, bajo la dirección del doctor Jorge Meléndez Zajgla y el Laboratorio de Expresión Génica. Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa Bajo la dirección del doctor Iván Bahena Ocampo.

El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia Humanidades y Tecnología (CONAHCYT) ahora SECIHIT con el número CBF-2025-I-4446 Ciencia de Frontera Bajo la responsabilidad del Dr. Jorge Meléndez Zajgla.

Durante el transcurso del Doctorado en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa recibí la beca otorgada por el CONAHCYT, ahora SECIHIT con número de becario/CVU 6159-71/793513 en el periodo 2018-2022. Agradezco al CONAHCYT ahora SECIHIT su apoyo.

Los miembros del jurado, designados por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis “Defensinas plaquetarias como mediadores de la actividad pro-tumoral en cáncer de páncreas” que presenta Jonathan González Ruiz con fecha de examen 15 de diciembre del 2025.

MIEMBROS DEL JURADO



Dr. Diddier Prada Ortega

Presidente

Assistant Professor Institute for Health Equity Research
Department of Population Health Science and Policy
Department of Environmental Medicine
Icahn School of Medicine at Mount Sinai
New York City, NY, USA



Dr. Javier Jiménez Salazar

Secretario

Profesor titular B
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana



Dra. Magali Espinosa Castilla

Vocal

Investigador en Ciencias Médicas C
Instituto Nacional de Medicina Genómica
INMEGEN



Dra. Karla Itzel Vázquez Santillán

Vocal

Investigador en Ciencias Médicas C
Instituto Nacional de Medicina Genómica
INMEGEN

COMITE TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Jorge Meléndez Zajgla

Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica, teléfono: 5350-1900 ext.1920, jmelendez@inmegen.gob.mx


Firma

DIRECTOR

Dr. Iván Bahena Ocampo

Laboratorio de Expresión Génica. Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, Tel: 5558044749 , ivan.bahena@gmail.com.


Firma

ASESORA

Dra. Karla Itzel Vázquez Santillán

Laboratorio de Epigenética, Instituto Nacional de Medicina Genómica, teléfono: 5350-1900 ext.1188, kivazquez@inmegen.gob.mx.


Firma

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al **Dr. Jorge Meléndez** por su confianza, guía y apoyo constante, así como a todo su laboratorio por el acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo. Expreso un agradecimiento especial a las **Dras. Magali y Gisela**, así como a **Benja** por su valiosa ayuda, colaboración y amistad durante mi estancia en el laboratorio.

Extiendo también mi más sincero agradecimiento al **Dr. Iván** por su orientación, compromiso y respaldo a lo largo de mi doctorado.

Agradezco de corazón a mis amigos de toda la vida —**Jeo, Blanca, Paco, Juanma, Josué, Maly y Dante**— por su apoyo incondicional, confianza y compañía en cada etapa de este camino.

Finalmente, a **Miryam**, por su apoyo incondicional, por ayudarme a creer en mí y por brindarme siempre tu amor y confianza.

.

DEDICATORIA

A mi madre, por ser el pilar fundamental de todo lo que soy.

Por su amor incondicional, su fortaleza y su ejemplo de vida.

Gracias por enseñarme que el esfuerzo, la honestidad y el amor son la base de todo.

Tu apoyo inquebrantable y tu fe en mí han hecho posible este logro.

“Este trabajo es, en esencia, un reflejo de todo lo que me has dado.”

“Si he logrado ver más lejos,
ha sido porque me he apoyado en los hombros de gigantes.”

— ***Isaac Newton***

ABSTRACT

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive and lethal malignancies, driven by late diagnosis, limited therapeutic options, and high metastatic potential. Beyond their canonical roles in hemostasis, platelets have emerged as active modulators of tumor progression and promising noninvasive biomarkers. Among platelet-associated molecules, α -defensins, particularly Defensin Alpha 1/3 (DEFA1/3), have been implicated in inflammation and immunity; however, their contribution to PDAC pathogenesis remains unclear. We combined bioinformatic analysis of platelet transcriptomes with functional and *in vivo* zebrafish xenograft validation to investigate the impact of DEFA1/3 on PDAC aggressiveness. DEFA1/3 was significantly upregulated in PDAC-derived platelets. Defensin-enriched platelet-like particles (defensin-rich platelets, DRPs) and recombinant DEFA1/3 enhanced pancreatic cancer cell proliferation, migration, and three-dimensional growth *in vitro* and promoted tumor dissemination in zebrafish xenografts. Transcriptomic profiling revealed the upregulation of SPARC, KDM6A, and GATA6, whereas clinical data from The Cancer Genome Atlas (TCGA)-PDAC linked high DEFA1/3 expression to poor survival, increased immune infiltration, and activation of epithelial–mesenchymal transition (EMT). Platelet-derived DEFA1/3 acts as a functional modulator of PDAC progression, linking platelet granule content to tumor aggressiveness and highlighting a potential biomarker and therapeutic target within the platelet–tumor axis.

INDICE

COMITE TUTORAL	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIA.....	VI
ABSTRACT	VII
INDICE DE FIGURAS	IX
1. INTRODUCCION	1
1.1. ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PANCREAS: UNA NEOPLASIA DE ALTA LETALIDAD	1
1.2. PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS Y DEFENSINAS: COMPONENTES DE LA INMUNIDAD INNATA	3
1.3. MECANISMOS DE ACCION DE LAS DEFENSINAS	3
1.4. DEFENSINAS Y CANCER: ENTRE INFLAMACION Y PROGRESION TUMORAL	4
1.5. RELEVANCIA DE DEFA1/3 EN PLAQUETAS Y CANCER PANCREATICO	5
2. JUSTIFICACION	5
3. PREGUNTA DE INVESTIGACION	7
4. HIPOTESIS	7
5. OBJETIVOS	7
5.1. OBJETIVO GENERAL	7
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	8
6. MATERIALES Y METODOS.....	8
6.1. CULTIVO CELULAR	8
6.2. CLASIFICACION DE LOS PERFILES TRANSCRIPTOMICOS	9
6.3. DIFERENCIACION DE PARTICULAS DE TIPO PLAQUETARIAS (PLPS) A PARTIR DE CELULAS MEG-01	10
6.4. AISLAMIENTO DE PLTS DE DONADORES SANOS.....	11
6.5. GENERACION DE PARTICULAS DERIVADAS DE PLAQUETAS.....	12
6.6. ESTUDIOS GENOMICOS.....	13
6.7. TRANSFECCION	14
6.8. ENSAYOS DE MIGRACION CELULAR	16
6.9. CULTIVO DE ESFEROIDES	17
6.10. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR	18
6.11. ENSAYO DE CLONOGENICIDAD	18
6.12. ANALISIS POR WESTERN BLOT	19
6.13. MANTENIMIENTO DEL PEZ CEBRA (<i>Danio rerio</i>) Y CUMPLIMIENTO ETICO.....	20
6.14. CUIDADO Y MONITOREO DE LOS ANIMALES	21
6.15. PREPARACION DE EMBRIONES, MICROINYECCION Y ENSAYOS DE MIGRACION IN VIVO	21
6.16. ALEATORIZACION Y CONTROL DE FACTORES DE CONFUSION	23
6.17. ANALISIS TRANSCRIPTOMICO Y SUPERVIVENCIA.....	24
6.18. ANALISIS DE ENRIQUECIMIENTO GENICO	24
6.19. ANALISIS DE CORRELACION CON GENES ASOCIADOS A AGRESIVIDAD TUMORAL	25
6.20. ANALISIS ESTADISTICO	25
7. RESULTADOS	26
7.1. ALTERACIONES TRANSCRIPTOMICAS EN PLAQUETAS DERIVADAS DE PACIENTES CON PDAC 26	

7.2. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO LENTIVIRAL PLVX-DEFA1/3 Y GENERACION DE LA LINEA CELULAR MEG-01 CON SOBREEXPRESIÓN DE <i>DEFA1/3</i>	29
7.3. ESTANDARIZACION DEL SISTEMA DE INFECCION LENTIVIRAL Y VALIDACION FUNCIONAL DE LA LINEA MEG-01 CON SOBREEXPRESION DE <i>DEFA1/3</i>	32
7.4. ESTANDARIZACION DE LA PRODUCCION DE PLPS <i>IN VITRO</i>	34
7.5. VALIDACION DEL SISTEMA DE PRODUCCION DE PLPS Y DRPS <i>IN VITRO</i>	41
7.6. EVALUACION DOSIS-RESPUESTA DE DEFA1/3 RECOMBINANTE EN LINEAS CELULARES DE PDAC.....	44
7.7. LAS DRPS POTENCIAN LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CELULAS DE CANCER PANCREATICO	46
7.8. LAS DRPS PROMUEVEN LA PROLIFERACION, EL CRECIMIENTO TRIDIMENSIONAL Y LA CAPACIDAD CLONOGENICA DE LAS CELULAS DE CANCER PANCREATICO	48
7.9. LAS DRPS POTENCIAN EL CRECIMIENTO Y LA DISEMINACION TUMORAL <i>IN VIVO</i>	54
7.10. LAS DRPS INDUCEN REPROGRAMACION TRANSCRIPCIONAL EN CELULAS DE PDAC	57
7.11. CORRELACION DE <i>SPARC</i> , <i>GATA6</i> Y <i>KDM6A</i> CON PROGRAMAS TRANSCRIPCIONALES AGRESIVOS EN LA COHORTE TCGA-PDAC	60
8. DISCUSION	62
9. CONCLUSIONES	66
10. ANEXO	68
11. REFERENCIAS	93

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CARACTERIZACION BIOINFORMATICA DE LAS ALTERACIONES TRANSCRIPTOMICAS EN CÁNCER DE PANCREAS	28
FIGURA 2. CONSTRUCCION Y VALIDACION DEL PLASMIDO PLVX-DEFA1/3 PARA LA SOBREEXPRESIÓN LENTIVIRAL.....	30
FIGURA 3. ESTANDARIZACION DEL SISTEMA DE INFECCION LENTIVIRAL Y GENERACION DE LA LINEA MEG-01 CON SOBREEXPRESION DE DEFA1/3	33
FIGURA 4. OPTIMIZACION DE LA GENERACION DE PLPS A PARTIR DE CELULAS MEG-01 MEDIANTE DIFERENCIACION CON VPA.....	35
FIGURA 5. OPTIMIZACION DE LA GENERACION DE PLPS A PARTIR DE CELULAS MEG-01 MEDIANTE INDUCCIÓN CON TPO.....	38
FIGURA 6. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y VALIDACION FUNCIONAL DE PLAQUETAS DERIVADAS DE SANGRE PERIFERICA Y DEL SISTEMA IN VITRO.....	39
FIGURA 7. GENERACION Y VALIDACION DE DRPS Y PLPS DERIVADAS DE CELULAS MEG-01	42
FIGURA 8. EVALUACION DEL EFECTO DE LA DEFA1/3 RECOMBINANTE HUMANA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN LINEAS DE CANCER DE PANCREAS	45
FIGURA 9. LAS DRPS PROMUEVEN LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS LINEAS CELULARES DE CANCER DE PANCREAS	47
FIGURA 10. LAS DRPS POTENCIAN LA FORMACION DE ESFEROIDES Y LA PROLIFERACION EN CELULAS DE CANCER DE PANCREAS.....	50
FIGURA 11. LOS ENSAYOS CLONOGENICOS EN SERIE DEMOSTRARON UNA MAYOR CAPACIDAD DE AUTORRENOVACION TRAS EL TRATAMIENTO CON DRPS.....	53
FIGURA 12. LAS DRPS AUMENTAN LA MIGRACION IN VIVO EN UN MODELO DE PEZ CEBRA	56
FIGURA 13. LAS DRPS MODULAN LA EXPRESION GENICA EN CELULAS DE CANCER DE PANCREAS	59
FIGURA 14. CORRELACION DE LOS PROGRAMAS TRANSCRIPCIONALES ASOCIADOS A INVASION, MOTILIDAD Y EMT CON LA EXPRESION DE <i>GATA6</i>, <i>KDM6A</i> Y <i>SPARC</i> EN LA COHORTE TCGA-PAAD	61

1. INTRODUCCION

1.1. ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PANCREAS: UNA NEOPLASIA DE ALTA LETALIDAD

El adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) es una de las neoplasias más agresivas y letales a nivel mundial (Antunes-Ferreira et al., 2023). En 2022 se reportaron más de medio millón de casos nuevos y cerca de 470 mil muertes, lo que lo posiciona entre las principales causas de mortalidad por cáncer (Sherman et al., 2025; Wang et al., 2021). A pesar de los avances en cirugía, diagnóstico y terapias sistémicas, la tasa de supervivencia a cinco años apenas alcanza el 10%, reflejando un progreso limitado en comparación con décadas anteriores (Leiphrakpam et al., 2025). Las proyecciones epidemiológicas indican que la incidencia global podría aumentar hasta un 95% para el año 2050, con casi un millón de diagnósticos anuales (Bray et al., 2024). Esta elevada mortalidad se relaciona con el diagnóstico tardío, la resistencia intrínseca a la quimioterapia y un fenotipo altamente metastásico característico de la enfermedad (Siegel et al., 2024).

El PDAC se origina principalmente a partir de lesiones precursoras conocidas como neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanINs), que progresan gradualmente desde alteraciones ductales de bajo grado hasta lesiones malignas invasoras (Pelosi et al., 2017). Este proceso implica la acumulación progresiva de mutaciones somáticas en genes clave como *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* y *SMAD4*, acompañada de una profunda reprogramación del microambiente tumoral (Varghese et al., 2025). Las PanINs se desarrollan en un entorno caracterizado por inflamación crónica, fibrosis y una respuesta inmunitaria alterada, factores que contribuyen al establecimiento de un microambiente favorable para la tumorigénesis (Seidel et al., 2025).

En los últimos años, se ha reconocido que factores sistémicos no tumorales, como las plaquetas estas desempeñan un papel activo en la progresión del cáncer (Li et

al., 2017). Las plaquetas (PLTs) son fragmentos anucleados derivados de megacariocitos, tradicionalmente conocidas por sus funciones en la hemostasia y la trombosis (Scridon, 2022). Sin embargo, en el contexto del cáncer, adquieren funciones adicionales: regulan la angiogénesis, facilitan la invasión y contribuyen a la evasión inmunitaria (Li et al., 2023; Tian et al., 2025). En pacientes con PDAC, la trombocitosis es frecuente y se ha asociado con mal pronóstico, menor respuesta terapéutica y mayor potencial metastásico (Zhou et al., 2018).

El concepto de plaquetas educadas por tumor (Tumor-Educated Platelets, TEPs) por sus siglas en inglés describe aquellas plaquetas cuyas firmas transcriptómicas y proteómicas son remodeladas por señales derivadas del tumor (Walke et al., 2024). Estas plaquetas no solo reflejan la influencia sistémica del cáncer, sino que también pueden participar activamente en la remodelación del microambiente tumoral a través de mediadores secretados y mecanismos de comunicación intercelular (Xing et al., 2019). Por ejemplo, se ha descrito que el ARN plaquetario de *ITGA2B* constituye un biomarcador sólido para la detección de cáncer, mientras que factores plaquetarios como el TGF- β promueven la transición epitelio-mesénquima (EMT), un proceso crucial en la diseminación metastásica (Asghar et al., 2020; Xing et al., 2019).

Dentro del arsenal molecular de las plaquetas, los péptidos antimicrobianos (AMPs) representan una familia de biomoléculas de particular interés. Los AMPs son polipéptidos de menos de 100 aminoácidos, con carga neta positiva y alto contenido de residuos básicos como lisina y arginina, además de una proporción significativa de aminoácidos hidrofóbicos (Fu et al., 2023). Estas características estructurales les permiten adoptar conformaciones anfipáticas al interactuar con membranas biológicas, confiriéndoles la capacidad de desestabilizar la bicapa lipídica de patógenos (Xu & Lu, 2020). Los AMPs son componentes esenciales de la inmunidad innata y se han identificado en una amplia diversidad de organismos, desde bacterias hasta humanos, participando en la defensa del huésped y en la modulación de respuestas inflamatorias (Cho & Hahm, 2025).

1.2. PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS Y DEFENSINAS: COMPONENTES DE LA INMUNIDAD INNATA

Entre los AMPs, las defensinas constituyen una de las familias más conservadas y funcionalmente versátiles (Goldberg et al., 2025). Estas moléculas son péptidos catiónicos ricos en arginina que contienen tres puentes disulfuro intramoleculares formados por seis residuos de cisteína, responsables de su estructura tridimensional estable (Nagib et al., 2025). En los mamíferos, las defensinas se dividen en tres subfamilias principales: α -defensinas (DEFA), β -defensinas (hBD) y θ -defensinas, clasificadas según la disposición de los enlaces disulfuro (Yang et al., 2002). Las α -defensinas se encuentran principalmente en neutrófilos y células epiteliales, mientras que las β -defensinas son producidas por células epiteliales de mucosas, y las θ -defensinas, con una estructura cíclica, están restringidas a algunos primates (Lehrer & Lu, 2012).

Las α -defensinas humanas, también conocidas como péptidos de neutrófilos humanos (HNPs), incluyen seis miembros denominados DEFA1–6 (Lehrer & Lu, 2012). De estos, las DEFA1–3 se localizan en los gránulos de los neutrófilos y son producidas de manera constitutiva por precursores mieloides, aunque también pueden ser inducidas por linfocitos T CD8 activados (Zhang et al., 2025). Adicionalmente, las defensinas entéricas HD-5 y HD-6 son sintetizadas por las células de Paneth en el intestino y participan en la protección de la mucosa intestinal (Lehrer & Lu, 2012). Las α -defensinas se sintetizan como precursores inactivos (prepro-defensinas) que requieren procesamiento proteolítico para su activación, lo que asegura su liberación regulada durante la respuesta inmune o la degranulación celular (Figueredo & Ouellette, 2010).

1.3. MECANISMOS DE ACCION DE LAS DEFENSINAS

Más allá de su función antimicrobiana, las defensinas desempeñan roles inmunomoduladores y citotóxicos que las vinculan con procesos inflamatorios crónicos y cáncer (Figueredo & Ouellette, 2010). Se ha demostrado que las α -

defensinas pueden modular la proliferación, diferenciación y migración celular, así como influir en la angiogénesis y en la regulación de la apoptosis (Sabit et al., 2024). En distintos tipos de cáncer, las concentraciones plasmáticas elevadas de HNP1–3 se han asociado con el crecimiento y proliferación tumoral, sugiriendo su potencial como biomarcadores moleculares (Li et al., 2024). De hecho, se ha reportado que las defensinas α pueden estar sobreexpresadas en tejidos tumorales de colon y que sus niveles séricos son significativamente más altos en pacientes con neoplasias epiteliales, lo que las posiciona como posibles marcadores diagnósticos o pronósticos (Bonamy et al., 2018; Sabit et al., 2024).

En el contexto de las plaquetas, las α -defensinas derivadas de plaquetas representan un campo emergente de investigación. Estudios recientes han demostrado que tanto las plaquetas como los megacariocitos expresan Defensina Alfa 1/3 (*DEFA1/3*) a nivel de ARN y proteína, almacenadas en los gránulos α y liberadas tras la activación plaquetaria (Valle-Jimenez et al., 2020). Este hallazgo sugiere que las defensinas podrían contribuir a la comunicación entre las plaquetas y las células tumorales, modulando el microambiente y favoreciendo la progresión maligna.

1.4. DEFENSINAS Y CANCER: ENTRE INFLAMACION Y PROGRESION TUMORAL

La participación de las defensinas en el cáncer se ha documentado en múltiples neoplasias epiteliales (Zhao et al., 2022). En cáncer de colon, mama, pulmón y próstata se ha observado sobreexpresión de defensinas, asociada con aumento de proliferación celular, migración e invasión (Wu et al., 2021; Zhao et al., 2022). En modelos clínicos, concentraciones séricas elevadas de DEFA1–3 se han correlacionado con la progresión tumoral y el mal pronóstico, proponiéndose como biomarcadores potenciales. Su implicación no se limita a la citotoxicidad directa, sino que también abarca la modulación del microambiente tumoral, donde pueden promover la inflamación crónica, la angiogénesis y la remodelación tisular (Jeong et al., 2025). Estas evidencias sugieren que las defensinas actúan como una doble

espada biológica: protectoras frente a infecciones, pero potencialmente pro-tumorigénicas en contextos de inflamación persistente o señalización aberrante(Xu & Lu, 2020).

1.5. RELEVANCIA DE DEFA1/3 EN PLAQUETAS Y CANCER PANCREATICO

En el contexto de las plaquetas, se ha demostrado que tanto las plaquetas como los megacariocitos expresan *DEFA1/3* a nivel de ARN y proteína, almacenadas en los gránulos α y liberadas tras la activación plaquetaria (Valle-Jimenez et al., 2020). Este hallazgo sugiere que las defensinas no solo participan en la defensa antimicrobiana, sino también en la comunicación intercelular entre plaquetas, células inmunes y células tumorales. Dado que el PDAC se desarrolla en un entorno inflamatorio e hipervascularizado, donde las plaquetas son abundantes y metabólicamente activas, es plausible que las defensinas derivadas de plaquetas contribuyan a la modulación del microambiente tumoral, favoreciendo la proliferación, migración e invasión de las células cancerosas. No obstante, el papel funcional de *DEFA1/3* plaquetaria en la progresión del PDAC ha sido escasamente explorado. Entender cómo estos péptidos pueden transformar las interacciones entre plaquetas y células tumorales representa un desafío clave para identificar nuevos biomarcadores y blancos terapéuticos en esta enfermedad de alta letalidad.

2. JUSTIFICACION

El PDAC representa una de las neoplasias más agresivas y letales a nivel mundial, con una supervivencia a cinco años inferior al 10%. Su comportamiento clínico se caracteriza por una alta capacidad metastásica, diagnóstico tardío y resistencia a los tratamientos convencionales, lo que resalta la urgencia de identificar biomarcadores tempranos y nuevos blancos terapéuticos que permitan mejorar su pronóstico. En los últimos años, las plaquetas han trascendido su función hemostática clásica para ser reconocidas como moduladores activos del microambiente tumoral. Estas células, al interactuar con células malignas y componentes del sistema inmune, pueden favorecer la angiogénesis, la evasión

inmunitaria y la diseminación metastásica, estableciendo un eje funcional entre hemostasia e invasión tumoral. En este contexto, el estudio del contenido proteico y transcriptómico plaquetario ha cobrado relevancia, al revelar que las plaquetas actúan como sensores periféricos del estado tumoral, capaces de reflejar alteraciones sistémicas mediante cambios en su perfil de expresión.

Entre las moléculas plaquetarias con posible impacto biológico, las α -defensinas DEFA1/3 —péptidos antimicrobianos almacenados en los gránulos alfa— se han vinculado con procesos inflamatorios, inmunomodulación y remodelación tisular. Sin embargo, su papel en la progresión del PDAC permanece poco comprendido. Estudios preliminares sugieren que las defensinas pueden influir en la plasticidad celular, la EMT y la infiltración inmunitaria, procesos estrechamente relacionados con la agresividad tumoral. No obstante, la fuente y el mecanismo de acción de estas moléculas en el contexto del PDAC no han sido completamente dilucidados. En este proyecto se propone elucidar el rol funcional de DEFA1/3 derivada de plaquetas en la progresión del PDAC, integrando aproximaciones bioinformáticas, celulares e *in vivo*. Mediante el análisis transcriptómico de plaquetas obtenidas de pacientes, la generación de plaquetas ricas en DEFA1/3 (DRPs) y modelos de xenotrasplante en pez cebra, se busca demostrar que las plaquetas no son simples correlatos sistémicos del cáncer, sino actores activos en la modulación del comportamiento tumoral. El enfoque integrativo adoptado en este estudio ofrece una doble relevancia:

Desde la perspectiva biológica, permitirá comprender los mecanismos mediante los cuales las plaquetas y su contenido granular particularmente las defensinas contribuyen a la agresividad y diseminación del PDAC.

Desde la perspectiva clínica, el estudio propone a DEFA1/3 como biomarcador potencial de progresión tumoral y como blanco terapéutico emergente dentro del eje plaqueta–tumor, abriendo nuevas posibilidades para la detección y el tratamiento personalizado de esta enfermedad devastadora.

Así, la investigación contribuye a fortalecer la comprensión de la interacción entre el sistema hemostático e inmunitario en el cáncer pancreático, alineándose con las tendencias internacionales que promueven el estudio de biomarcadores circulantes y modelos funcionales traslacionales para el diseño de estrategias terapéuticas más eficaces.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuáles son los efectos de las plaquetas enriquecidas en defensinas DEFA1/3 sobre la agresividad de las células de adenocarcinoma ductal de páncreas y en la modulación de los programas moleculares asociados a su progresión?

4. HIPOTESIS

Si las plaquetas ricas en **DEFA1/3** participan activamente en la comunicación entre las plaquetas y las células tumorales pancreáticas, entonces su sobreexpresión y liberación modulará procesos de proliferación, migración, EMT y diseminación tumoral, mediante la activación de genes asociados a la agresividad del PDAC contribuyendo así a un fenotipo más maligno y a un peor pronóstico clínico.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel funcional de las DRPs en la progresión del PDAC, mediante el análisis transcriptómico, estudios funcionales *in vitro* y validación *in vivo* en modelos de xenoinjerto en pez cebra, con el propósito de determinar su impacto en la proliferación, migración, EMT y diseminación tumoral, así como su potencial valor como biomarcador y modulador del eje plaqueta–tumor.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar los perfiles transcriptómicos plaquetarios de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas PDAC y de controles sanos mediante enfoques bioinformáticos, con el fin de identificar genes diferencialmente expresados asociados a la progresión tumoral.
2. Desarrollar y caracterizar un modelo celular *in vitro* de megacariocitos MEG-01 con sobreexpresión estable de *DEFA1/3*, capaz de generar partículas de tipo plaquetario con el propósito de evaluar su funcionalidad y su grado de similitud estructural y biológica con plaquetas humanas.
3. Evaluar el efecto funcional de las DRPs sobre procesos asociados a la agresividad tumoral, incluyendo proliferación, migración, clonogenicidad y formación de esferoides en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático, así como su capacidad para favorecer la diseminación tumoral *in vivo* en modelos de pez cebra.
4. Correlacionar la expresión de *DEFA1/3* con parámetros clínicos y moleculares de pacientes con PDAC del consorcio TCGA-PAAD, a fin de determinar su asociación con supervivencia global, infiltración inmune y activación de programas de EMT.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares humanas 293T, AsPC-1, BxPC-3, Capan-2 y MEG-01 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Todas las líneas celulares fueron certificadas por la ATCC. Las células se cultivaron conforme a las recomendaciones del proveedor. Las células 293T se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; ATCC 30-2002) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS; Gibco, Cat. No. 16000044;

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y 1% de penicilina–estreptomicina (10,000 U/mL; Cat. No. 15140122; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las líneas AsPC-1, BxPC-3 y MEG-01 se cultivaron en RPMI-1640 (ATCC 30-2001) con 10% de FBS y 1% de penicilina–estreptomicina. Las células Capan-2 se cultivaron en McCoy's 5A (ATCC 30-2007) con las mismas condiciones. Todas las culturas se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, subcultivándose cada 2–3 días para mantener el crecimiento exponencial. En todos los experimentos, las células se emplearon entre los pases 5 y 20 para garantizar la consistencia. Antes del tratamiento, las células se sembraron en frascos T-75 (Corning, NY, EE.UU.) o en placas de 6 pozos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, el medio se reemplazó por medio libre de suero durante 12 h para sincronizar el crecimiento y reducir la variabilidad derivada del suero. Para los ensayos de estimulación con defensinas, las células se trataron con Defensina Alfa humana recombinante 1/3 (DEFA1/3; Abcam, Cambridge, Reino Unido, Cat. #ab97409) a una concentración final de 100 ng/mL durante 72 h. Los controles no tratados Nt recibieron solo el vehículo bajo las mismas condiciones. Todos los tratamientos se realizaron en triplicado biológico y cada experimento se repitió al menos tres veces de manera independiente para asegurar reproducibilidad. Todas las líneas celulares estaban libres de micoplasma.

6.2. CLASIFICACION DE LOS PERFILES TRANSCRIPTOMICOS

Para clasificar los perfiles transcriptómicos plaquetarios de pacientes y controles, se implementó un algoritmo de Support Vector Machine (SVM) por sus siglas en inglés, utilizando el paquete e1071 (v1.7-13) en R versión 4.3.0 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Las matrices de expresión de RNA-seq normalizadas se importaron en R, filtrando los genes de baja abundancia (CPM < 1 en > 80% de las muestras) para reducir el ruido. Los transcritos restantes se transformaron a log₂ y se escalaron a media cero y varianza unitaria antes del entrenamiento del modelo. El algoritmo SVM proyectó cada muestra en un espacio de características de alta dimensión, donde cada eje representa un transcrito. La posición de una muestra en

cada eje corresponde al valor de expresión normalizado de ese gen. Se aplicó una estrategia One-Versus-One (OVO) para manejar la clasificación multiclase, entrenando un modelo binario para cada par de clases. La asignación final de cada muestra se determinó por votación mayoritaria entre los clasificadores pareados. Se utilizó un kernel radial (RBF) para capturar relaciones no lineales entre perfiles de expresión génica. Los parámetros C (coste) y γ (gamma) se optimizaron mediante validación cruzada de 10 pliegues dentro de una búsqueda en malla (grid search, función tune.svm). El desempeño del modelo se evaluó usando precisión (accuracy), F1-score y área bajo la curva ROC (AUC), calculadas con los paquetes caret (v6.0-94) y pROC (v1.18.5). El error de clasificación se determinó a partir de matrices de confusión generadas con las muestras de prueba retenidas (20% del conjunto total). Todos los análisis se realizaron con scripts reproducibles en R, fijando la semilla aleatoria con set.seed(1234) para garantizar resultados consistentes.

6.3. DIFERENCIACION DE PARTICULAS DE TIPO PLAQUETARIAS (PLPS) A PARTIR DE CELULAS MEG-01

Para obtener PLPs, las células de megacariocitos MEG-01 se diferenciaron *in vitro* siguiendo un protocolo optimizado basado en (Risitano et al., 2012), con modificaciones menores, las células MEG-01 se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/mL en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina. Se añadió trombopoyetina humana recombinante (TPO; PeproTech No. 300-18, EE.UU.) a una concentración final de 100 ng/mL, manteniendo las células a 37 °C y 5% CO₂. El proceso de diferenciación duró 7 días, añadiendo TPO fresco cada tercer día para mantener la maduración de los megacariocitos y la formación de proplaquetas. Para la diferenciación con ácido valproico (VPA) se utilizó 2mM, bajo el mismo método que con TPO. La morfología celular se monitoreó diariamente mediante microscopía de contraste de fases, confirmando la aparición de extensiones citoplasmáticas y protrusiones similares a plaquetas. Al finalizar, las PLPs se purificaron mediante centrifugación diferencial: (1) 100× g por 5 min para eliminar células intactas, (2) 150× g por 15 min para retirar restos grandes, (3) 750× g por 15 min para sedimentar las PLPs (Valle-Jimenez et

al., 2020). El pellet se resuspendió en medio RPMI sin suero y se cuantificó por ensayo de Bradford y conteo en cámara de Neubauer bajo microscopía óptica. La morfología y pureza de las PLPs se verificaron mediante tinción de Giemsa antes de los ensayos funcionales.

6.4. AISLAMIENTO DE PLTS DE DONADORES SANOS

Las PLTs fueron aisladas a partir de donadores voluntarios de laboratorio bajo condiciones estériles. La sangre total se recolectó en tubos BD Vacutainer® con citrato de sodio (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) para evitar la coagulación, y las muestras fueron procesadas dentro de las 2 horas posteriores a la recolección para preservar la integridad plaquetaria. El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo mediante centrifugación de la sangre total a 100× g durante 20 minutos a temperatura ambiente sin freno. La capa superior de PRP se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo, y se añadió ácido acetilsalicílico hasta alcanzar una concentración final de **200 µM** para inhibir la activación plaquetaria. Posteriormente, el PRP fue centrifugado nuevamente a 100× g durante 20 minutos para eliminar eritrocitos residuales. Las plaquetas se concentraron mediante centrifugación del sobrenadante a 800× g durante 20 minutos a RT, y el sobrenadante fue descartado. El pellet resultante se resuspendió suavemente en buffer de Tyrode (pH 7.4) suplementado con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich; Cat. No. A2153). La concentración y pureza plaquetaria se evaluaron mediante conteo manual utilizando una cámara de Neubauer bajo microscopía óptica, y la morfología se verificó por microscopía de contraste de fases (Dhurat & Sukesh, 2014).

Las plaquetas purificadas se utilizaron inmediatamente después de su aislamiento para todos los ensayos funcionales. Las muestras de PRP se obtuvieron de donadores voluntarios que proporcionaron sangre periférica exclusivamente para investigación *in vitro*. No se recopilaban datos personales ni clínicos, y todas las muestras fueron anonimizadas antes de su procesamiento. El uso de material biológico derivado de sangre humana se llevó a cabo conforme a las normas institucionales de bioseguridad y ética, bajo clasificación de riesgo mínimo, sin

requerir consentimiento informado formal, de acuerdo con la (**NOM-012-SSA3-2012**;, Mexico City, Mexico, 2013.) y las **Directrices CIOMS (2016)** .

6.5. GENERACION DE PARTICULAS DERIVADAS DE PLAQUETAS

Para generar DRPs, la línea celular de megacariocitos MEG-01 fue modificada genéticamente mediante transducción lentiviral para sobreexpresar *DEFA1/3*. Las partículas lentivirales se produjeron mediante co-transfección de células 293T utilizando Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11668019; Waltham, MA, USA) junto con los siguientes plásmidos:

- **pLV-DEFA1/3**, vector donador que contiene la secuencia codificante de *DEFA1/3* insertada en el vector pLV-*DEFA1/3*.
- **pLJM1-GFP**, vector control utilizado para evaluar la eficiencia de transducción mediante fluorescencia verde.
- **psPAX2** (Addgene, plásmido #12260; Watertown, MA, USA), plásmido de empaquetamiento.
- **pCMV-VSV-G** (Addgene, plásmido #8454; Watertown, MA, USA), plásmido de envoltura.

Las células transfectadas se mantuvieron en DMEM con 10% de FBS durante 48 horas, y los sobrenadantes virales se recolectaron cada 12 horas durante tres días, se filtraron a través de una membrana PES de **0.45 µm**, y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Las células MEG-01 se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/mL y se infectaron con los sobrenadantes virales a una multiplicidad de infección (MOI) de 100, en presencia de **8 µg/mL de polibreno** para mejorar la eficiencia de infección. Después de 48 horas, el medio fue reemplazado y las células se cultivaron por 72 horas adicionales antes de iniciar la selección con puromicina (1 µg/mL) (Skalamera et al., 2012). Tras tres rondas de selección, se obtuvieron poblaciones estables con una eficiencia de transducción aproximada del **80%**, verificada por fluorescencia GFP. Posteriormente, las células **MEG-01-DEFA1/3** y **MEG-01-EV** (vector vacío,

control negativo) fueron estimuladas con TPO, 200 ng/mL durante 7 días para inducir la formación de PLPs *in vitro*.

Las partículas liberadas fueron recolectadas por centrifugación diferencial, como se describe en la Sección 4.3, y designadas como **DRPs** y **PLPs-EV (plaquetas control derivadas del vector vacío)**. La sobreexpresión de *DEFA1/3* en células MEG-01-DEFA1/3 y en DRPs fue confirmada mediante qPCR y Western blot antes de los ensayos funcionales posteriores.

6.6. ESTUDIOS GENOMICOS

El ARN total fue extraído, y los análisis de RT-PCR se realizaron según el protocolo descrito por (Bandala et al., 2001), con ligeras modificaciones para garantizar la reproducibilidad. En resumen, el ARN total se obtuvo de las líneas celulares AsPC-1, BxPC-3, MEG-01, PLPs-Ev y DRPs utilizando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen, Waltham, MA, USA, No. 15596026), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN se determinaron mediante espectrofotometría NanoDrop™2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), midiendo la relación A260/A280, y la integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la retrotranscripción, 1 µg de ARN total fue convertido a cDNA en una reacción final de **20 µL** utilizando ThermoScript™ Reverse Transcriptase (Invitrogen), con cebadores hexámeros aleatorios y el buffer de reacción suministrado por el fabricante. Las amplificaciones por PCR se realizaron con AmpliTaq Gold™ DNA polymerase (Applied Biosystems) en un volumen final de 25 µL, que contenía 2.5 µL de buffer 10×, 0.5 µL de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 1 µL de cada cebador (10 µM) y 1 µL de cDNA como plantilla. El ciclaje térmico se llevó a cabo en un Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 50 °C por 45 s y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1–2%, teñidos con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, No. S33102) y visualizados bajo luz UV. Las bandas correspondientes a los tamaños esperados se excisaron y purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). La eficiencia y linealidad de la amplificación se verificaron mediante curvas estándar derivadas de diluciones seriadas del cDNA, confirmando que las reacciones ocurrieron dentro de la fase logarítmica. La lista de primers utilizados se presenta en la siguiente tabla.

Gene name		Primer sequence (5' to 3')
GAPDH	Fwd	CCC CTT CAT TGA CCT CAA CT
	Rvs	TTG TCA TGG ATG ACC TTG GC
KDM6A	Fwd	TGA TCC CAG CTT TTG TCG AG
	Rvs	AGC ATT GGA CAA AGT CAA AGT GCA GG
GATA6	Fwd	GTG CCC AGA CCA CTT GCT AT
	Rvs	TGG AAT TAT TGC TAT TAC CAG AGC
Egr1	Fwd	CTTCAACCCTCAGGC GGACA
	Rvs	GGAAAAGCGGCCAGTATAGGT
SPARC	Fwd	ACA TAA GCC CAG TTC ATC ACC A
	Rvs	ACA ACC GAT TCA CCA ACT CCA
DEFA1/3	Fwd	GGCTGCTCCTTGCTATAGAAG
	Rvs	CTCATCAGCTCTTGCCTGGA
DEFA1/3 Overexpression	Fwd	ACTCCAGCTAGCATGAGGACCCTCGCCATCCT
	Rvs	ACTAACGAATTCTCAGCAGCAGAATGCCCAGA

6.7. TRANSFECCION

Para la producción de partículas lentivirales, las células 293T fueron co-transfectadas con los siguientes plásmidos: vector donador pLV-IRES-DEFA1/3, vector control pLJM1-GFP, plásmido de empaquetamiento psPAX2, y plásmido de envoltura pCMV-VSV-G, siguiendo las instrucciones del fabricante para el uso de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA).

Previo a la transfección, el ADN plasmídico fue purificado utilizando un kit **Maxiprep libre de endotoxinas** (Qiagen, Cat. No. 12362, Alemania) con el fin de asegurar una eficiencia óptima y evitar citotoxicidad. Para cada placa de 10 cm de diámetro, se emplearon 12 µg de ADN total, mezclados en una proporción **4:3:2:1**

correspondiente a pLV-IRES-DEFA1/3: psPAX2: pCMV-VSV-G: pLJM1-GFP, combinados con el reactivo Lipofectamine en medio **Opti-MEM™** e incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de adicionarlos a las células. Tras un periodo de co-transfección de 8 horas, el medio de transfección fue reemplazado por DMEM completo suplementado con 10% de FBS, y las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Los sobrenadantes virales se recolectaron a las **48 y 72 horas post-transfección**, se clarificaron mediante centrifugación a 500× g durante 10 minutos, y se filtraron a través de un filtro PES de 0.45 µm para eliminar restos celulares. La suspensión viral se concentró por ultracentrifugación a 25,000× g durante 2 horas a 4 °C utilizando un rotor SW32 Ti (Beckman Coulter). El pellet viral resultante se resuspendió en 1 mL de PBS estéril que contenía 1% de BSA, y se almacenó a -80 °C en alícuotas de un solo uso para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación. Los títulos virales se determinaron mediante la **infección de células 293T** con diluciones seriadas del stock viral y cuantificación de células GFP-positivas a las 72 horas mediante microscopía de fluorescencia, siguiendo el protocolo descrito por Schwarz-Cruz et al., 2020 (Schwarz-Cruz et al., 2020). Para determinar las condiciones óptimas de transducción, las células AsPC-1 se sembraron hasta alcanzar 80% de confluencia y se infectaron con partículas lentivirales Lv-GFP a diferentes multiplicidades de infección (MOI = 10, 20, 50, 100 y 200). Después de 48 horas, la expresión de GFP fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania). Se seleccionó un MOI de 100 como valor óptimo para los experimentos posteriores, ya que permitió una expresión robusta del transgén minimizando la citotoxicidad. La transducción se realizó a 37 °C durante 24 horas, tras lo cual el medio con virus se sustituyó por medio RPMI completo **con** 10% de FBS.

Las células se incubaron por 48 horas adicionales antes de iniciar la selección antibiótica. Para generar líneas celulares estables, se añadió puromicina (2 µg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al medio, el cual se renovó cada dos días. La selección continuó hasta que todas las células no infectadas perdieron viabilidad (aproximadamente 5–7 días).

Las clonas sobrevivientes fueron expandidos y mantenidos en 1 µg/mL de puromicina para conservar la expresión estable del transgén. Las poblaciones resultantes se designaron como MEG-01-DEFA1/3 y MEG-01-GFP, correspondientes a células con expresión estable de *DEFA1/3* o del control GFP, respectivamente (Schwarz-Cruz et al., 2020).

6.8. ENSAYOS DE MIGRACION CELULAR

Para evaluar los efectos de *DEFA1/3* y de las partículas derivadas de plaquetas sobre la capacidad migratoria de células de cáncer de páncreas, se utilizaron las líneas celulares AsPC-1 y BxPC-3. Se sembraron 4×10^5 células en placas **Ibidi**® de 35 mm que contenían el sistema Culture-Insert 2 Well (Cat. No. 80206; Ibidi GmbH, Gräfelfing, Alemania), permitiendo la formación de monocapas confluentes en 24 horas. Cada pozo del inserto recibió 70 µL de suspensión celular, incubándose a 37 °C y 5% de CO₂ en atmósfera humidificada. Para garantizar que el cierre de la herida reflejara migración y no proliferación celular, el medio se suplementó con 5 µM de citosina β-D-arabinofuranósido (Ara-C; Sigma-Aldrich, Cat. No. C1768) como inhibidor de la síntesis de ADN. Después del periodo inicial de adhesión (24 h), el inserto se retiró cuidadosamente con pinzas estériles para crear un espacio libre definido (herida). Las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones experimentales:

- DEFA1/3 recombinante (100 ng/mL; Abcam, Waltham, MA, USA)
- PLP-Ev (control derivado de vector vacío)
- DRPs (plaquetas enriquecidas en defensinas)
- Nt (control sin tratamiento)

Las culturas se mantuvieron por 72 horas bajo condiciones estándar. El cierre de la herida fue monitoreado mediante captura de cinco campos aleatorios por condición utilizando un microscopio invertido de contraste de fases (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) a las 0, 24, 48 y 72 horas.

Las imágenes se analizaron con el software ImageJ versión 1.53t (NIH, Bethesda, MD, USA). El porcentaje de cierre de la herida se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Migration rate} = \left(1 - \frac{\text{wound area at time } t}{\text{initial wound at 0h}}\right) \times 100$$

Cada condición se ensayó por triplicado, y los resultados se presentan como media $\pm$ S.E.M. (error estándar de la media) de al menos tres experimentos independientes.

6.9. CULTIVO DE ESFEROIDES

Las células Capan-2 y BxPC-3 de cáncer pancreático fueron cultivadas mediante la técnica de recubrimiento líquido ("liquid overlay"), descrita por (Espinosa et al., 2012), con ligeras modificaciones. Las placas Petri P60 se recubrieron con una fina capa de agarosa al 1% (p/v) (Sigma-Aldrich, Cat. No. A0169; St. Louis, MO, USA) preparada en PBS estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente para impedir la adhesión celular. Posteriormente, se sembraron 1×10^6 células (previamente cultivadas como monocapa) sobre cada placa recubierta con agarosa, utilizando medio Leibovitz L-15 suplementado con 5% de FBS (Gibco), e incubando a 37 °C en atmósfera humidificada.

Después de 48 horas, los agregados celulares flotantes comenzaron a formar esferoides compactos. Las culturas se mantuvieron durante 7 días, reemplazando el medio cada dos días para mantener el equilibrio nutricional y eliminar restos celulares o esferoides irregulares. Para mejorar la homogeneidad de los esferoides, las placas se colocaron en un incubador con agitación rotatoria (60 rpm) a partir del segundo día, lo que favoreció fuerzas de cizalla uniformes y una morfología más homogénea.

El crecimiento de los esferoides se monitoreó diariamente mediante microscopía invertida (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), y los diámetros se cuantificaron utilizando un micrómetro ocular calibrado (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania) o mediante análisis digital con ImageJ. Se midieron al menos 30 esferoides por condición para determinar el diámetro promedio $\pm$ S.E.M.

6.10. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se evaluó mediante tinción con violeta de cristal (Sigma-Aldrich; Cat. No. C0775), siguiendo el método descrito por Feoktistova et al. (2016) (Feoktistova et al., 2016), con ligeras modificaciones. En resumen, se sembraron 5×10^3 células por pozo en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA), en 200 μ L de medio de cultivo completo, permitiendo su adhesión durante la noche a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. A las 0 y 72 horas, los pozos se lavaron cuidadosamente dos veces con PBS para eliminar desechos y células no adheridas. Las células adheridas se fijaron con metanol al 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se dejaron secar al aire. Posteriormente, las células se tiñeron con una solución de violeta de cristal al 0.05% (p/v) (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos, se lavaron abundantemente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se secaron nuevamente al aire.

Para cuantificar la viabilidad celular, se añadió ácido acético al 33% (v/v) en cada pozo para solubilizar el colorante unido, y la densidad óptica (DO) se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas (Synergy HT; BioTek, Winooski, VT, USA).

La viabilidad relativa (%) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Cell viability} = \frac{OD_{72h}}{OD_{0h}} \times 100$$

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes, y los resultados se expresaron como media $\pm$ S.E.M. (error estándar de la media). Imágenes representativas de los pozos teñidos se capturaron con una cámara digital a 1× de aumento antes de la cuantificación.

6.11. ENSAYO DE CLONOGENICIDAD

Las líneas celulares BxPC-3, AsPC-1 y Capan-2 se sembraron a baja densidad (300–800 células/poro), dependiendo de la línea celular, en placas de 6 pozos, permitiendo su adhesión durante la noche. Posteriormente, las células fueron tratadas bajo las siguientes condiciones experimentales: Nt sin tratamiento, PLP-Ev

o DRPs, y se incubaron durante 10–14 días hasta la formación de colonias visibles (>50 células). En cada pase, los pozos paralelos se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich; Cat. No. 158127) durante 10 minutos y se tiñeron con violeta de cristal al 0.05%, para confirmar la formación de colonias. Para evaluar la clonogenicidad seriada, las colonias se tripsinizaron, se resuspendieron en suspensión unicelular y se sembraron a densidad clonal bajo las mismas condiciones durante dos pasajes adicionales (P2–P3). En el pasaje final, las colonias se fijaron y tiñeron como se describió anteriormente.

El número de colonias se cuantificó utilizando el software ImageJ (NIH, USA) y se expresó como la fracción de supervivencia relativa al control Nt. La persistencia de la capacidad de formación de colonias a lo largo de los pasajes se interpretó como evidencia de potencial de autorrenovación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres ensayos biológicos independientes.

6.12. ANALISIS POR WESTERN BLOT

Los lisados proteicos totales de PTLs, PLPs-Ev y DRPs se obtuvieron utilizando un buffer de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.1% SDS; 0.5% desoxicolato de sodio) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich, Cat. #P8340 y #P0044, St. Louis, MO, USA). Las concentraciones de proteína se determinaron con el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Cat. #23225) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cargaron 20–30 µg de proteína total por muestra, mezcladas con buffer de muestra Laemmli 4× (Bio-Rad, Cat. #1610747) **conteniendo** 5% de β-mercaptoetanol, y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al **12%** y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 µm (Bio-Rad, Cat. #1620112) utilizando el sistema Trans-Blot® Turbo Transfer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con Intercept® TBS Blocking Buffer (LI-COR, Cat. #927-60001) y se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios diluidos en buffer de bloqueo con 0.1% de Tween-20. Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- Anti-DEFA1/3 (anticuerpo monoclonal de ratón, Abcam, Cat. #ab97409; dilución 1:1000)
- Anti-GAPDH (anticuerpo monoclonal de conejo, Cell Signaling Technology, Cat. #5174; dilución 1:5000), utilizado como control de carga.

Después del lavado, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios infrarrojos específicos por especie:

- Cabra anti-ratón IgG (IRDye® 680RD; LI-COR, Cat. #926-68070; 1:10,000)
- Cabra anti-conejo IgG (IRDye® 800CW; LI-COR, Cat. #926-32211; 1:10,000).

Las señales fluorescentes se detectaron mediante un sistema Odyssey® CLx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Las intensidades de las bandas se cuantificaron con el software Image Studio™ Lite versión 5.2 (LI-COR Biosciences), y los niveles de **DEFA1/3** se normalizaron respecto a **GAPDH**. Todos los análisis por Western blot se realizaron en triplicados biológicos para asegurar reproducibilidad.

6.13. MANTENIMIENTO DEL PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*) Y CUMPLIMIENTO ETICO

Los peces cebra adultos *Danio rerio* de la cepa Tab-wik, originalmente proporcionados por el Dr. Ernesto Maldonado (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM) y el Dr. Francisco Carmona (Instituto de Fisiología Celular, UNAM), fueron mantenidos bajo condiciones estándar de acuicultura a 28.5 °C, con pH ajustado entre 7.0 y 7.5, y un ciclo de 14 h de luz / 10 h de oscuridad. Los embriones se mantuvieron en agua de embrión (agua destilada suplementada con 5 g/L de sal Instant Ocean® y 7.5 mg/L de NaHCO₃). Los procedimientos generales de mantenimiento y manipulación de adultos y larvas siguieron los protocolos establecidos en The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish *Danio rerio* (Westerfield, 2000.). Los procedimientos experimentales se realizaron conforme a los estándares internacionales de bienestar animal, incluyendo las guías de la Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de la University of

Oregon, y fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) (número de aprobación 427). Para la eutanasia, los embriones mayores de 4 días post-fertilización (dpf) se sacrificaron mediante inmersión en agua fría (2–4 °C) hasta que cesaron los movimientos operculares, seguida de una exposición adicional de varios minutos al mismo medio frío, conforme a las Guías de la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA) para la eutanasia de animales (2020).

6.14. CUIDADO Y MONITOREO DE LOS ANIMALES

Todos los procedimientos se diseñaron para minimizar el dolor y el estrés. Los embriones fueron anestesiados con 0.04% de triclaína (MS-222; Sigma-Aldrich, Cat. No. E10521) durante las microinyecciones, se manipularon bajo un estereomicroscopio para evitar daño mecánico. Los embriones fueron monitoreados periódicamente durante las 24 h posteriores a la inyección para detectar signos de morfología anormal, hemorragia o muerte. Aquellos que presentaron malformaciones o pérdida de viabilidad fueron excluidos del análisis. No se observaron eventos adversos inesperados. Los criterios humanitarios de finalización se definieron como muerte o malformación severa antes de la captura de imágenes a las 24 h post-inyección. Los embriones sobrevivientes se fotografiaron y posteriormente se mantuvieron bajo condiciones estándar. La eutanasia de larvas mayores de 4 dpf se realizó conforme a las guías AVMA (2020).

6.15. PREPARACION DE EMBRIONES, MICROINYECCION Y ENSAYOS DE MIGRACION IN VIVO

A los 2 dpf, los embriones fueron descorionados manualmente utilizando pinzas Dumont No. 5 y anestesiados en 0.04% de triclaína (MS-222; Sigma-Aldrich, Cat. No. E10521). Los embriones se colocaron sobre placas Petri recubiertas con agarosa al 3% para asegurar estabilidad durante la inyección. Las células BxPC-3 de cáncer pancreático, previamente tratadas con **DRPs**, **PLPs** o **sin tratamiento Nt**, se emplearon para los **xenotrasplantes**. Se inyectaron aproximadamente **300**

células en el saco vitelino de cada embrión, considerando cada pez cebra como una unidad experimental independiente.

En cada experimento independiente, se asignaron **20 embriones por grupo** (DRP, PLP y Nt), con un total aproximado de 60 embriones por réplica y 300 embriones en total. El tamaño de muestra se basó en modelos de xenotrasplante validados previamente en pez cebra Martínez-López et al., 2021 [58,59], los cuales demostraron variabilidad de diseminación tumoral reproducible dentro de este rango, garantizando confiabilidad estadística sin requerir un cálculo formal de poder. Las células se marcaron previamente con CellTracker™ Red CMTPX (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. C34552), se resuspendieron a 1×10^3 células/10 μ L, e ~300 células se inyectaron en el saco vitelino bajo condiciones cegadas, siguiendo los procedimientos de xenotrasplante adaptados de Martínez-López et al. (2021) [58,59]. Se utilizaron capilares de vidrio borosilicato (10 cm de longitud, diámetro externo de 1.0 mm, diámetro interno de 0.58 mm, sin filamento; Sutter Instrument, Novato, CA, USA), los cuales fueron estirados con un puller vertical (Modelo 51210, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) y recortados a 0.8 cm desde el hombro con pinzas Dumont No. 5. Las inyecciones se realizaron mediante un inyector neumático de pico-litros (PLI-100A; Warner Instruments, Holliston, MA, USA). Tras la inyección, los embriones se enjuagaron con agua de embrión y se incubaron a 34 °C en placas Petri con suficiente volumen de agua, manteniendo una densidad ≤ 30 embriones por placa.

Criterios de inclusión:

(i) embriones viables de 2 dpf,

(ii) xenotrasplante exitoso, verificado inmediatamente tras la inyección (T_0) por la presencia de células tumorales fluorescentes en el sitio del saco vitelino. Los embriones se consideraron elegibles para el análisis independientemente de si las células fluorescentes permanecieron confinadas al saco vitelino o ya se habían diseminado a las 24 h post-inyección; la migración se trató como variable de resultado.

Criterios de exclusión (predefinidos): fallas técnicas en la inyección (entrega fuera del sitio objetivo o fuga excesiva en T_0), malformaciones graves, hemorragia o muerte antes de la toma de imágenes a las 24 h. Cada grupo experimental incluyó exactamente 20 embriones ($n = 20$ por grupo y por réplica); el número exacto utilizado se especifica en la leyenda de cada figura correspondiente.

A las 24 h post-inyección, los embriones fueron analizados en condiciones cegadas utilizando un microscopio de epifluorescencia Zeiss equipado con una cámara digital Canon. Las imágenes se procesaron con el software FIJI–ImageJ, cuantificando el número de células fluorescentes detectadas en el tronco posterior y la cola (más allá del saco vitelino) [58].

6.16. ALEATORIZACION Y CONTROL DE FACTORES DE CONFUSION

La aleatorización se realizó según la secuencia temporal de tratamiento durante el proceso de inyección. Los embriones, obtenidos de diferentes desoves, se seleccionaron sin distinción y se inyectaron alternando los grupos (DRP, PLP y Nt) para evitar sesgos dependientes del tiempo o del operador. Cada jornada experimental incluyó los tres grupos para minimizar efectos de lote. Todos los embriones se mantuvieron bajo condiciones idénticas (temperatura, densidad ≤ 30 embriones/placa y ciclo de 14 h luz / 10 h oscuridad). Las posiciones de las placas dentro del incubador se rotaron diariamente para evitar sesgos de localización. La evaluación de resultados se realizó a las 24 h post-inyección bajo condiciones cegadas. El operador conocía la asignación de tratamiento durante la inyección, pero la evaluación de resultados se efectuó con archivos de imagen codificados para reducir el sesgo del observador. La **variable primaria** fue el número de células BxPC-3 fluorescentes que migraron más allá del saco vitelino a las 24 h post-inyección, cuantificado con FIJI–ImageJ, como medida directa del efecto pro-tumorigénico de los DRPs in vivo.

Las variables secundarias incluyeron:

- el área fluorescente total correspondiente a las células diseminadas, y

- el porcentaje de embriones con xenotrasplantes exitosos.

Estas variables se seleccionaron con base en estudios previos de xenotrasplante en pez cebra que evaluaron dinámicas de diseminación e invasión tumoral (Martinez-Lopez et al., 2021). El tamaño de muestra (n = 20 embriones por grupo y por réplica) se estableció considerando esta variable primaria.

6.17. ANALISIS TRANSCRIPTOMICO Y SUPERVIVENCIA

Los datos de expresión de RNA-seq y las anotaciones clínicas asociadas para PDAC se obtuvieron del repositorio **TCGA-PAAD** a través del Genomic Data Commons (GDC) Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>, consultado el 1 de marzo de 2025). Los conteos crudos fueron normalizados a CPM (counts per million) y transformados a escala $\log_2$ utilizando el flujo de trabajo limma/voom implementado en R (v4.3.0). Para los análisis de supervivencia, los pacientes fueron estratificados en cuartiles con base en la expresión de *DEFA1/3*, y la supervivencia global (OS) se comparó mediante curvas de Kaplan–Meier, generadas con los paquetes survival (v3.7-0) y survminer (v0.4.9) en R. Con el fin de evaluar posibles interacciones con los niveles circulantes de plaquetas, los pacientes se subdividieron en cuatro categorías (alto/bajo *DEFA1/3* × alto/bajo conteo plaquetario), utilizando los valores medianos de ambas variables. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de log-rank. Todos los análisis se realizaron en R, utilizando datos públicos de TCGA, de acuerdo con las guías internacionales de reproducibilidad computacional.

6.18. ANALISIS DE ENRIQUECIMIENTO GENICO

Para explorar las asociaciones funcionales de la expresión génica, se realizó un análisis de enriquecimiento génico por muestra individual (ssGSEA) por sus siglas en ingles utilizando el paquete Gene Set Variation Analysis (GSVA) de R (v3.21). Se emplearon conjuntos génicos curados relacionados con activación plaquetaria, infiltración de neutrófilos y EMT como rutas de referencia (Li et al., 2022). Las asociaciones entre la expresión de *DEFA1/3* y las puntuaciones de enriquecimiento ssGSEA a través de las muestras se evaluaron mediante correlación por rangos de

Spearman. La fuerza de correlación se cuantificó mediante el coeficiente rho, y los valores de p se calcularon para determinar su significancia.

Las gráficas de dispersión con líneas de regresión lineal se generaron utilizando el paquete ggplot2 (v3.5.1), mostrando los valores de rho y p en cada panel (Hanzelmann et al., 2013). Todos los análisis se llevaron a cabo en R (v4.3.0) utilizando los datos públicos de TCGA-PAAD.

6.19. ANALISIS DE CORRELACION CON GENES ASOCIADOS A AGRESIVIDAD TUMORAL

Para explorar los programas moleculares relacionados con la agresividad del PDAC, se seleccionó un panel de genes previamente reportados como marcadores de subtipos tumorales y progresión: *SPARC*, *GATA6*, *KDM6A* y *EGR1* [63]. Las puntuaciones transcriptómicas para los programas de invasión (MMPs), motilidad (integrinas) y EMT-like se calcularon empleando conjuntos génicos curados de hallmark y GO, disponibles en la Molecular Signatures Database (MSigDB v7.5) por sus siglas en inglés. Las asociaciones entre la expresión génica y las puntuaciones de programa se evaluaron mediante correlación por rangos de Spearman, y los resultados se visualizaron como gráficas de regresión con intervalos de confianza al 95%, generadas en R (v4.3.0).

6.20. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se expresan como media $\pm$ S.E.M. (error estándar de la media), obtenidos de un mínimo de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Tukey para evaluar diferencias pareadas. El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0.01$. Todos los análisis estadísticos y las representaciones gráficas se efectuaron utilizando el software GraphPad Prism versión 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

7. RESULTADOS

7.1. ALTERACIONES TRANSCRIPTOMICAS EN PLAQUETAS DERIVADAS DE PACIENTES CON PDAC

Con el propósito de explorar las modificaciones moleculares presentes en las plaquetas circulantes de pacientes con cáncer de páncreas, se realizó un análisis del conjunto de datos de secuenciación de RNA-seq reportado por *Best et al.* En dicho estudio, se caracterizó el transcriptoma plaquetario de pacientes con diversos tipos de cáncer y de donadores sanos, el cual fue utilizado para entrenar un algoritmo de aprendizaje automático destinado a la detección tumoral. En el presente trabajo, en lugar de centrarse en la predicción, se seleccionó un subconjunto de ese conjunto de datos con el fin de investigar los cambios transcripcionales específicos asociados al PDAC.

El análisis incluyó plaquetas aisladas de **35 pacientes con PDAC** y **55 donadores sanos**. Los conteos crudos de RNA-seq se procesaron utilizando el marco analítico **CAGE (Correlative Analyses of Gene Set Enrichment)**. Los datos fueron normalizados a **conteos por millón (CPM)** y transformados mediante **voom**, lo que permitió un análisis de expresión diferencial con estabilización de varianza.

Este enfoque reveló una **distribución distintiva de genes diferencialmente expresados** entre las plaquetas derivadas de PDAC y las de individuos sanos (Figura 1a), evidenciando un proceso de reprogramación transcripcional en las plaquetas circulantes de pacientes con cáncer. El mapa de calor mostró un grupo de genes significativamente sobreexpresados en las plaquetas derivadas de PDAC, delineando una **firma transcripcional específica de cáncer**.

Para contextualizar estos hallazgos, los genes diferencialmente expresados se compararon con un panel curado de **biomarcadores de cáncer** previamente establecidos, identificándose una coincidencia significativa de 94 genes (18.8%). Entre ellos, destacaron varios miembros de la **familia de las defensinas**, incluyendo *DEFA8P* (Fold change = 16.87), *DEFA4* (Fold change = 11.37) y *DEFA1B* (Fold change = 10.14), los cuales mostraron una sobreexpresión

consistente (Figura 1b). Las defensinas son reconocidas moléculas efectoras de la inmunidad innata y de la defensa epitelial, por lo que estos resultados sugieren un posible papel inmunomodulador de las defensinas plaquetarias en el microambiente tumoral.

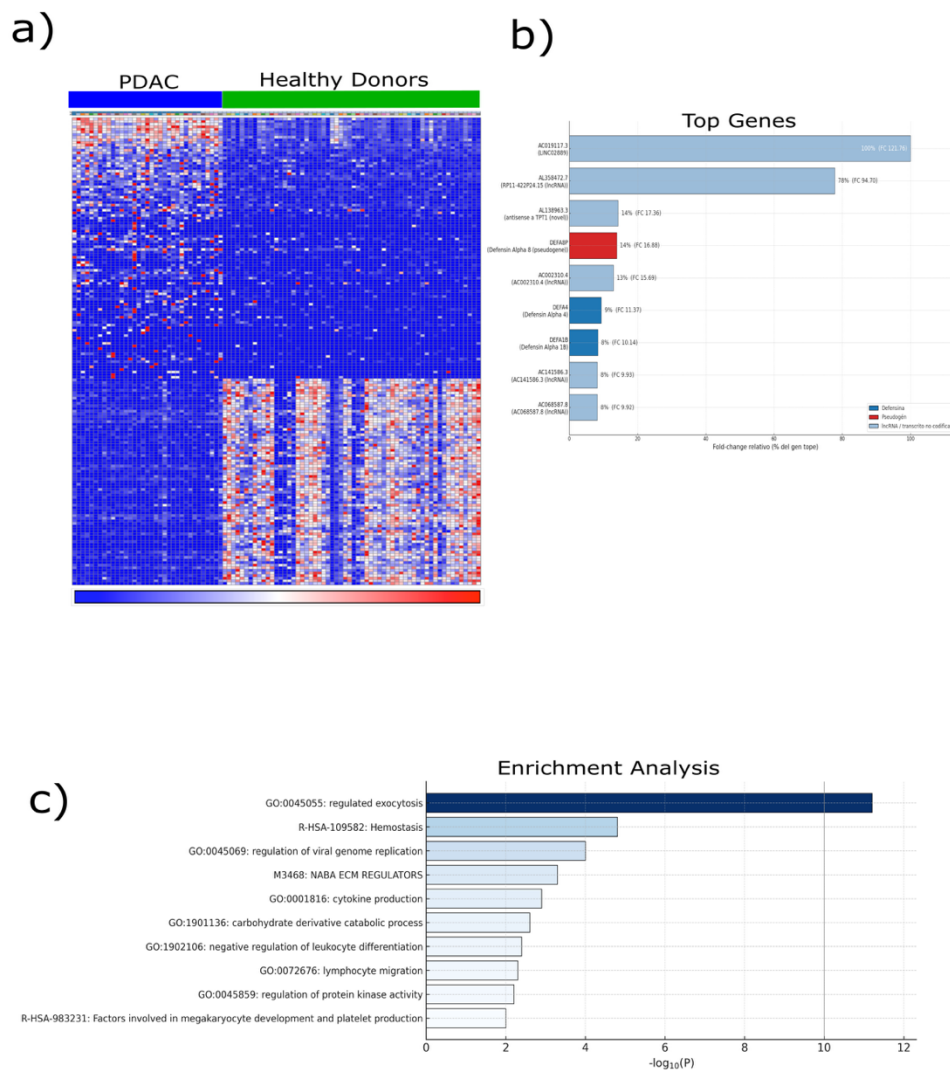


FIGURA 1. CARACTERIZACION BIOINFORMATICA DE LAS ALTERACIONES TRANSCRIPTOMICAS EN CÁNCER DE PANCREAS

Los datos transcriptómicos se obtuvieron del conjunto GSE68086, que comprende perfiles de RNA-seq de plaquetas derivadas de pacientes con PDAC (n = 35) y de donadores sanos (n = 55). **(a)** Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de los genes diferencialmente expresados ($|\log_2FC| \geq 1$, p ajustado < 0.05, corrección de Benjamini–Hochberg) mediante el paquete **limma** (v4.3) de R, evidenciando una clara segregación entre los transcriptomas plaquetarios de pacientes con PDAC y los controles. La escala de color del mapa de calor representa los niveles de expresión génica normalizados, donde el color rojo indica sobreexpresión y el azul represión relativa al promedio de expresión de cada gen. **(b)** Se muestran los diez genes más sobreexpresados en plaquetas de PDAC, destacando miembros de la familia de las defensinas (**DEFA4, DEFA1B y DEFA8P**) por su fuerte incremento y su papel establecido en la defensa inmune y el mantenimiento de la integridad epitelial. **(c)** El análisis de enriquecimiento de conjuntos génicos (**GSEA**) se realizó con los paquetes **ClusterProfiler** (v4.10.1) y **fgsea** (v1.28.0) de R, utilizando la colección *Hallmark* del MSigDB. El puntaje de enriquecimiento normalizado (**NES**) refleja la magnitud y dirección del sobre-representamiento de cada conjunto génico. Los valores nominales de *p* y *q* (FDR) se derivaron de 10 000 permutaciones basadas en fenotipo. En conjunto, los análisis indican que el transcriptoma plaquetario de pacientes con PDAC presenta una **reprogramación inmune y secretora**, apoyando el concepto de plaquetas “educadas” por el tumor como moduladores activos de la progresión del cáncer. Los datos se presentan como media $\pm$ S.D., y la significancia estadística se definió como *p* ajustado < 0.05. **Abreviaturas:** PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*; GSEA, *Gene Set Enrichment Analysis*; NES, *normalized enrichment score*; RNA-seq, secuenciación de ARN; DEFA, defensina alfa.

El análisis de enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO) proporcionó una visión funcional complementaria. Las rutas más significativamente enriquecidas incluyeron exocitosis regulada (GO:0045055), procesos relacionados con homeostasis celular, producción de citocinas, migración de linfocitos y regulación negativa de la diferenciación de leucocitos. En conjunto, estos hallazgos resaltan alteraciones amplias en las funciones inmunes y secretoras de las plaquetas derivadas de PDAC. Además, se observó enriquecimiento en rutas asociadas con el desarrollo de megacariocitos y la producción plaquetaria, lo que sugiere un vínculo potencial entre la progresión tumoral y la modulación hematopoyética (Figura 1c).

En su conjunto, estos resultados aportan una primera evidencia de que las **defensinas plaquetarias**, particularmente los miembros de la familia *DEFA*, podrían constituir componentes activos de la comunicación plaqueta-tumor en PDAC, fundamento sobre el cual se desarrollaron los experimentos funcionales subsecuentes.

7.2. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO LENTIVIRAL PLVX-DEFA1/3 Y GENERACION DE LA LINEA CELULAR MEG-01 CON SOBREENPRESIÓN DE DEFA1/3

Con el fin de comprobar experimentalmente la relevancia funcional de los hallazgos transcriptómicos observados, particularmente la sobreexpresión de genes de la familia *DEFA* en plaquetas derivadas de pacientes con PDAC, se planteó evaluar si estas moléculas pueden modular la biología tumoral en un contexto experimental controlado. Dado que las defensinas *DEFA1* y *DEFA3* mostraron los niveles más altos de sobreexpresión y desempeñan funciones inmunomoduladoras en distintos entornos inflamatorios, se decidió **generar un modelo celular que reprodujera su incremento en plaquetas**. Para ello, se diseñó una estrategia de **sobreexpresión estable de *DEFA1/3* en la línea celular de megacariocitos MEG-01**, con el objetivo de producir DRPs y así explorar su impacto directo sobre la proliferación, migración y agresividad de células de adenocarcinoma ductal de páncreas.

Dado que los genes *DEFA1* y *DEFA3* presentan una alta homología (>98% de identidad), y no es posible distinguirlos mediante amplificación convencional, la secuencia insertada se denominó ***DEFA1/3***.

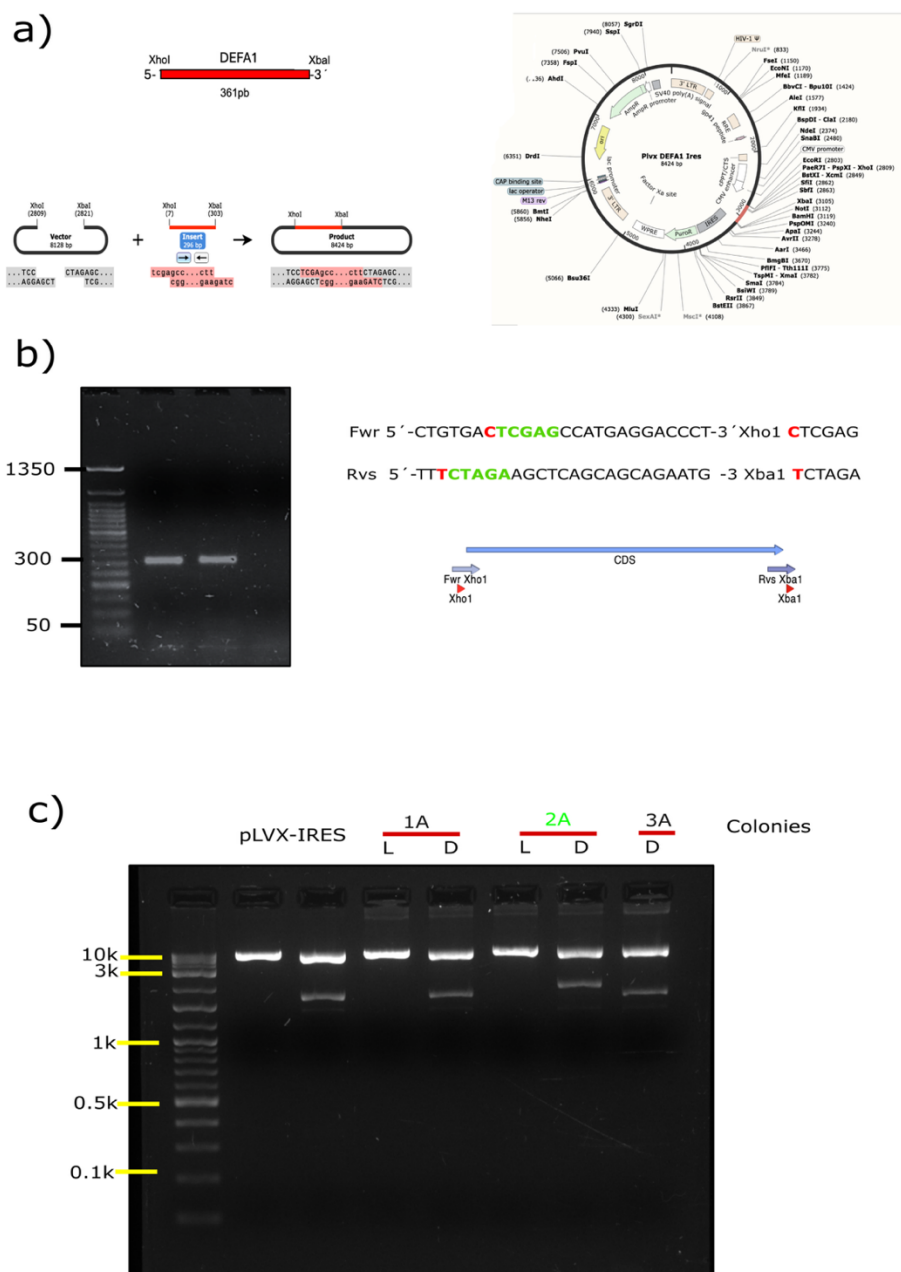


FIGURA 2. CONSTRUCCION Y VALIDACION DEL PLASMIDO PLVX-DEFA1/3 PARA LA SOBREEXPRESIÓN LENTIVIRAL

(a) Esquema de clonación del inserto **DEFA1/3 (361 pb)** en el vector donador **pLVX-IRES-Puro**. El inserto amplificado mediante PCR fue digerido con las enzimas de restricción **XhoI** y **XbaI**, e insertado en el sitio múltiple de clonación (MCS) del vector. A la derecha se muestra el mapa esquemático del plásmido resultante **pLVX-DEFA1/3**, indicando las regiones funcionales utilizadas para la producción de partículas lentivirales. (b) Amplificación del inserto **DEFA1/3** a partir de cDNA obtenido de sangre total, utilizando oligonucleótidos específicos con los sitios de

restricción XhoI y XbaI incorporados en sus extremos. El gel de agarosa al 1% muestra una banda única de aproximadamente **350 pb**, correspondiente al tamaño esperado del producto amplificado. **(c)** Validación del plásmido recombinante mediante digestión enzimática y análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las colonias bacterianas transformadas con el vector recombinante (**pLVX-DEFA1/3**) mostraron un patrón de bandeo con un **incremento en el peso molecular** respecto al vector vacío (**pLVX-IRES**), confirmando la inserción correcta del fragmento amplificado. En conjunto, los resultados confirman la correcta amplificación, inserción y validación del fragmento **DEFA1/3** en el vector lentiviral **pLVX-IRES**, estableciendo la base para la generación de partículas lentivirales y la transducción estable de la línea celular **MEG-01**. **Abreviaturas:** MCS, *multiple cloning site*; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; pb, pares de bases; DEFA, defensina alfa; cDNA, ADN complementario; IRES, *internal ribosome entry site*.

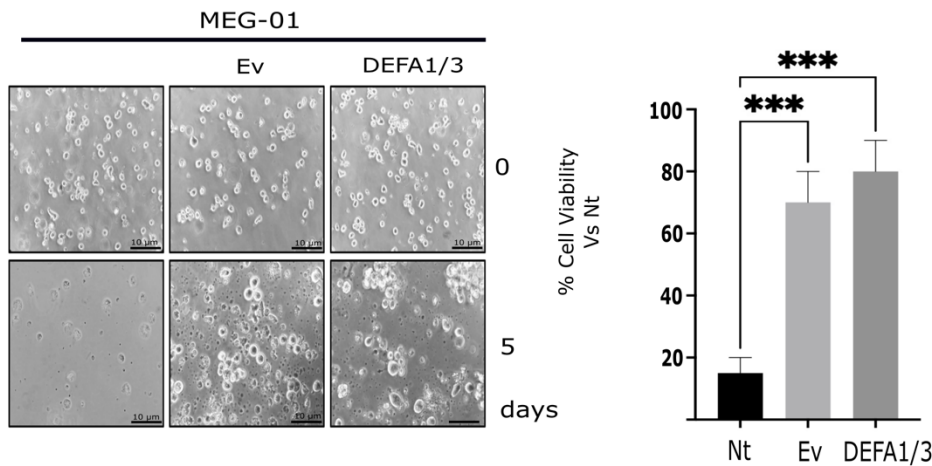
El proceso inició con la **extracción de ARN de sangre de donadores sanos**, seguida de la **síntesis de ADN complementario (cDNA)** mediante retrotranscripción. A partir de este cDNA se amplificó el fragmento correspondiente a *DEFA1/3* (361 pb) utilizando **oligonucleótidos específicos** con sitios de restricción para **XhoI y XbaI**, lo que permitió su posterior digestión y ligación en el vector pLVX-IRES (Figura 1b).

El producto de PCR se purificó y verificó mediante **electroforesis en gel de agarosa**, mostrando una banda específica de ~350 pb (Figura 1b.) Los fragmentos amplificados y el vector fueron digeridos con **XhoI y XbaI** y posteriormente ligados con **T4 DNA ligasa**, generando el constructo recombinante **pLVX-DEFA1/3** (Figura 1a). La **validación de las clonas recombinante** se realizó por digestión diagnóstica de colonias transformadas, observándose un **incremento en el peso molecular** respecto al vector vacío pLVX-IRES, correspondiente al inserto de 361 pb (Figura 1c). Finalmente, se produjeron **partículas lentivirales** mediante **transfección en células HEK293T**, usando un sistema de empaquetamiento de segunda generación. Los sobrenadantes virales fueron filtrados y concentrados para la **transducción estable de la línea MEG-01**, seleccionándose las células positivas con **puromicina**. Esta línea modificada sirvió como base experimental para la generación de DRPs empleadas en los ensayos posteriores.

7.3. ESTANDARIZACION DEL SISTEMA DE INFECCION LENTIVIRAL Y VALIDACION FUNCIONAL DE LA LINEA MEG-01 CON SOBREEXPRESION DE *DEFA1/3*

Para establecer un sistema de transducción eficiente y reproducible, se optimizó previamente el proceso de infección lentiviral. Como control positivo se utilizó el vector **pJLM1-GFP**, que codifica la proteína reportera fluorescente **GFP**, lo que permitió cuantificar visualmente la eficiencia de infección (Figura 3b). las partículas lentivirales se generaron mediante co-transfección de células HEK293T utilizando

a)



b)

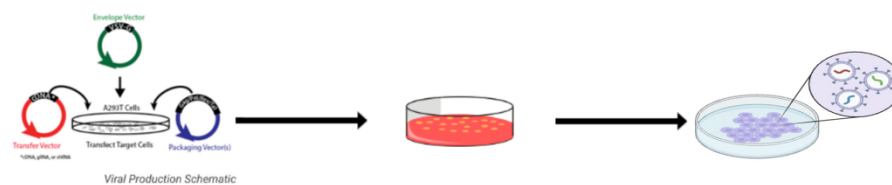
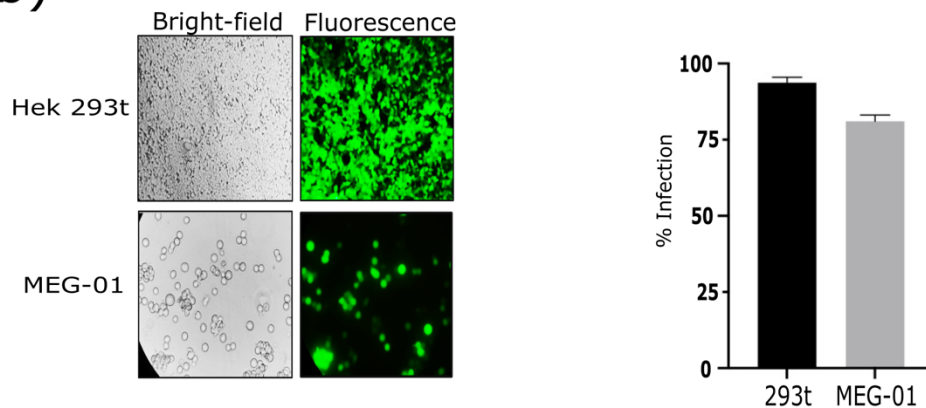


FIGURA 3. ESTANDARIZACION DEL SISTEMA DE INFECCION LENTIVIRAL Y GENERACION DE LA LINEA MEG-01 CON SOBREEXPRESION DE DEFA1/3

(a) Evaluación de la viabilidad celular en la línea **MEG-01** tras la infección con partículas lentivirales portadoras del vector vacío (**Ev**) o del vector de sobreexpresión **pLVX-DEFA1/3**. Las imágenes muestran la morfología celular a 0 y 5 días post-infección, evidenciando una mayor densidad y viabilidad en las células transducidas en comparación con las no tratadas (**Nt**). La gráfica de barras cuantifica el porcentaje de viabilidad relativa, mostrando incrementos significativos en los grupos Ev y DEFA1/3 respecto al control *** $p < 0.001$. (b) Eficiencia de infección determinada mediante el vector reportero **pJLM1-GFP** en células **HEK-293T** y **MEG-01**. A las 72 horas post-infección, se observó una alta expresión de GFP bajo microscopía de fluorescencia, con tasas de infección superiores al **80%** en HEK-293T y alrededor del **75%** en MEG-01, valores considerados óptimos para las siguientes transducciones. El esquema inferior ilustra el proceso de producción de partículas lentivirales mediante co-transfección de los plásmidos **pLVX-DEFA1/3**, **psPAX2** (empaquetamiento) y **pCMV-VSV-G** (envoltura). En conjunto, estos resultados confirman la **eficiencia del sistema lentiviral** y la **generación estable de la línea MEG-01 con sobreexpresión de DEFA1/3**, utilizada posteriormente para la diferenciación de megacariocitos y la producción de DRPs. **Abreviaturas:** Nt, no tratado; Ev, vector vacío; GFP, *green fluorescent protein*; MOI, multiplicidad de infección; PBS, *phosphate-buffered saline*; DEFA, defensina alfa; DRPs, *defensin-rich platelets*

el vector pJLM1-GFP (vector de transferencia de segunda generación que codifica la proteína reportera GFP bajo el promotor CMV) y los plásmidos auxiliares de empaquetamiento psPAX2 y pCMV-VSV-G.

El plásmido psPAX2 (Addgene #12260) contiene los genes gag, pol, rev y tat, necesarios para la replicación y ensamblaje de las partículas virales, mientras que pCMV-VSV-G (Addgene #8454) codifica la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que confiere tropismo amplio y estabilidad a las partículas lentivirales.

La co-transfección se realizó en proporción molar 4:3:1 (vector de transferencia: psPAX2 : pCMV-VSV-G) utilizando lipofectamina 3000. A las 48 h post-transfección, se observó una alta expresión de GFP en las células HEK293T, confirmando la correcta producción de partículas lentivirales funcionales. Los sobrenadantes virales se recolectaron, filtraron (0.45 μ m) y emplearon para la infección de células MEG-

01, las cuales mostraron fluorescencia verde visible y una tasa de infección cercana al 75 %, comparable con la observada en HEK293T (~80 %). (Figura 3b).

Posteriormente, este procedimiento fue adaptado para la generación de partículas basadas en el vector pLVX-IRES-Puro, un plásmido de tercera generación que incorpora un cassette bicistrónico IRES-PuroR, permitiendo la selección estable mediante puromicina tras la integración genómica del constructo. Tras la optimización, se procedió a la **infección de MEG-01 con el vector pLVX-DEFA1/3**. Aunque este constructo no contiene marcador fluorescente, su **cassette de resistencia a puromicina** permitió seleccionar las células transducidas. Durante el tratamiento de selección, las **células no infectadas** murieron completamente, mientras que las **células transducidas con pLVX-DEFA1/3 o con el vector vacío pLVX-Ev** sobrevivieron, confirmando la integración funcional del vector (Figura 3a).

Las células infectadas mostraron una **mayor densidad y viabilidad** en comparación con las no tratadas, y los análisis de viabilidad celular confirmaron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos infectados y el control. Estos resultados validaron la eficiencia del sistema de transducción y la **generación exitosa de la línea MEG-01 estable con sobreexpresión de DEFA1/3**, utilizada para la obtención de DRPs.

7.4. ESTANDARIZACION DE LA PRODUCCION DE PLPS *IN VITRO*

Con la línea MEG-01 establecida, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de diferenciación de megacariocitos para la liberación de PLPs, con el objetivo de generar una fuente abundante, funcional y libre de contaminantes celulares. Para promover la maduración de los megacariocitos y la liberación de PLPs, se evaluaron dos estrategias de diferenciación: el tratamiento con VPA y la estimulación con TPO, con el fin de comparar su eficacia y estabilidad morfológica.

Diferenciación con VPA

Las células MEG-01 se incubaron con concentraciones crecientes de VPA (0.5–4 mM) durante 72 horas. Se observó un incremento progresivo en la liberación de

PLPs conforme aumentaba la concentración, alcanzando su punto máximo a 2 mM (Figura 4a-b). Sin embargo, a esta concentración se detectaron signos evidentes de estrés celular y alteración morfológica en megacariocitos, por lo que dicha dosis no se consideró óptima para los procedimientos posteriores. Las PLPs generadas bajo estas condiciones presentaron morfología circular, anucleada y citoplasma homogéneo, características confirmadas mediante tinción de Giemsa (Figura 4c-d).

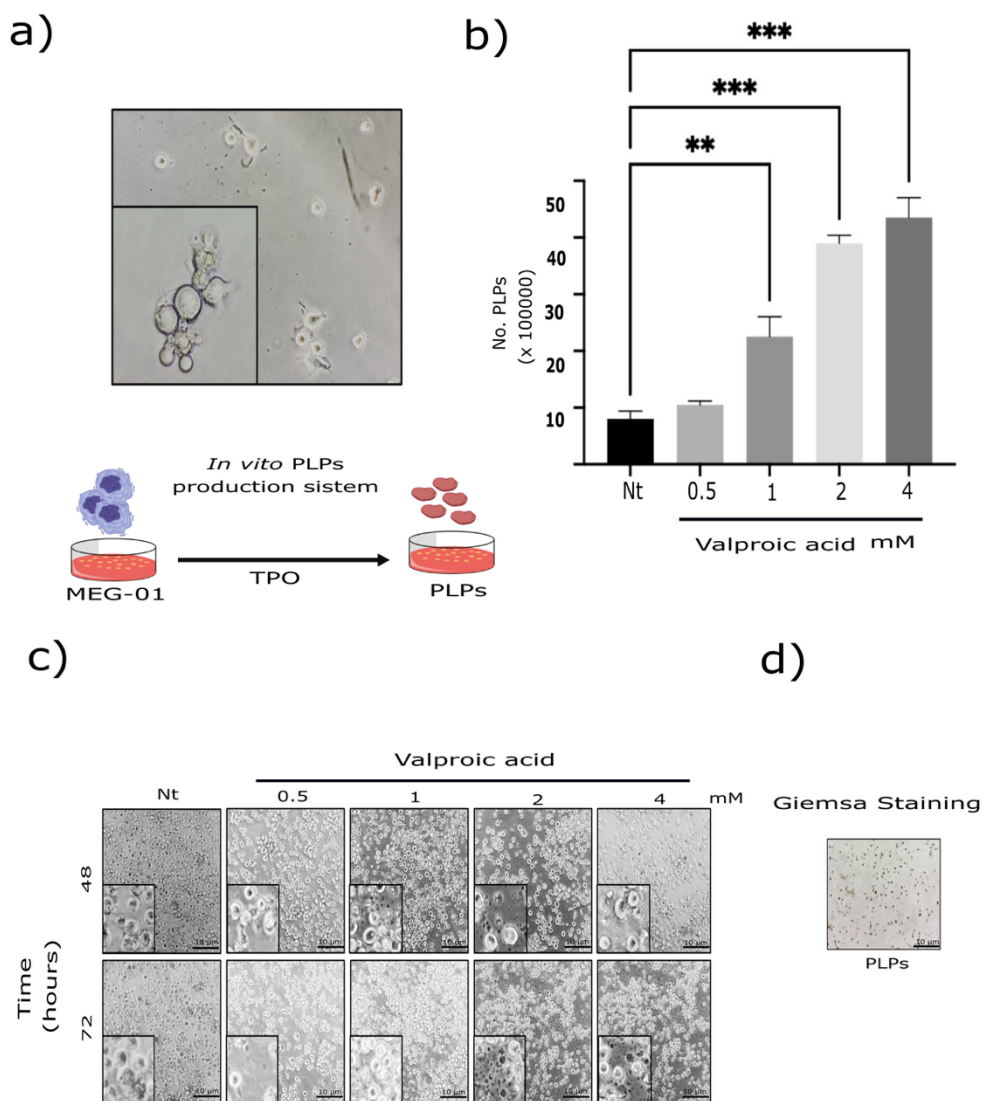


FIGURA 4. OPTIMIZACION DE LA GENERACION DE PLPS A PARTIR DE CELULAS MEG-01 MEDIANTE DIFERENCIACION CON VPA

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la producción de PLPs, las células **MEG-01** fueron estimuladas con concentraciones crecientes de **VPA; 0.5–4 mM** durante 72 horas. **(a)** Representación esquemática del flujo experimental empleado para la inducción de PLPs mediada por VPA. **(b)** Cuantificación del número de PLPs generadas bajo diferentes concentraciones de VPA, mostrando que la exposición a **2 mM** durante 72 horas produjo la mayor liberación de partículas. **(c)** Evaluación morfológica de la formación de PLPs mediante microscopía de campo claro, donde se observa un incremento notable en la liberación de partículas con el aumento de la concentración de VPA. **(d)** Confirmación morfológica mediante tinción de Giemsa, mostrando la presencia de partículas pequeñas, anucleadas y con citoplasma homogéneo, características típicas de plaquetas. Los datos cuantitativos se expresan como **media $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.)**, obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se efectuó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Tukey. Nivel de significancia: $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ en comparación con concentraciones menores de VPA. **Abreviaturas:** PLP, *platelet-like particle*; VPA, ácido valproico; MEG-01, línea celular de megacariocitos humana; S.E.M., error estándar de la media.

Diferenciación con TPO

Dada la función fisiológica de la TPO como principal regulador de la megacariopoyesis, se evaluó su capacidad inductora en concentraciones de 25, 50, 100 y 200 ng/mL durante 24, 48 y 72 horas (Figura 5c). Los resultados mostraron que los megacariocitos comenzaron a liberar plaquetas a las 48 horas, con una producción más abundante y consistente a las 72 horas. El recuento plaquetario evidenció un incremento dosis-dependiente significativo, particularmente en las condiciones de 100–200 ng/mL (Figura 5b). Para mantener una producción sostenida, la TPO se adicionó tres veces por semana, logrando un rendimiento estable y reproducible de plaquetas funcionales. Las tinciones de Giemsa corroboraron la identidad plaquetaria, mostrando estructuras circulares, anucleadas

y con citoplasma denso (Figura 5).

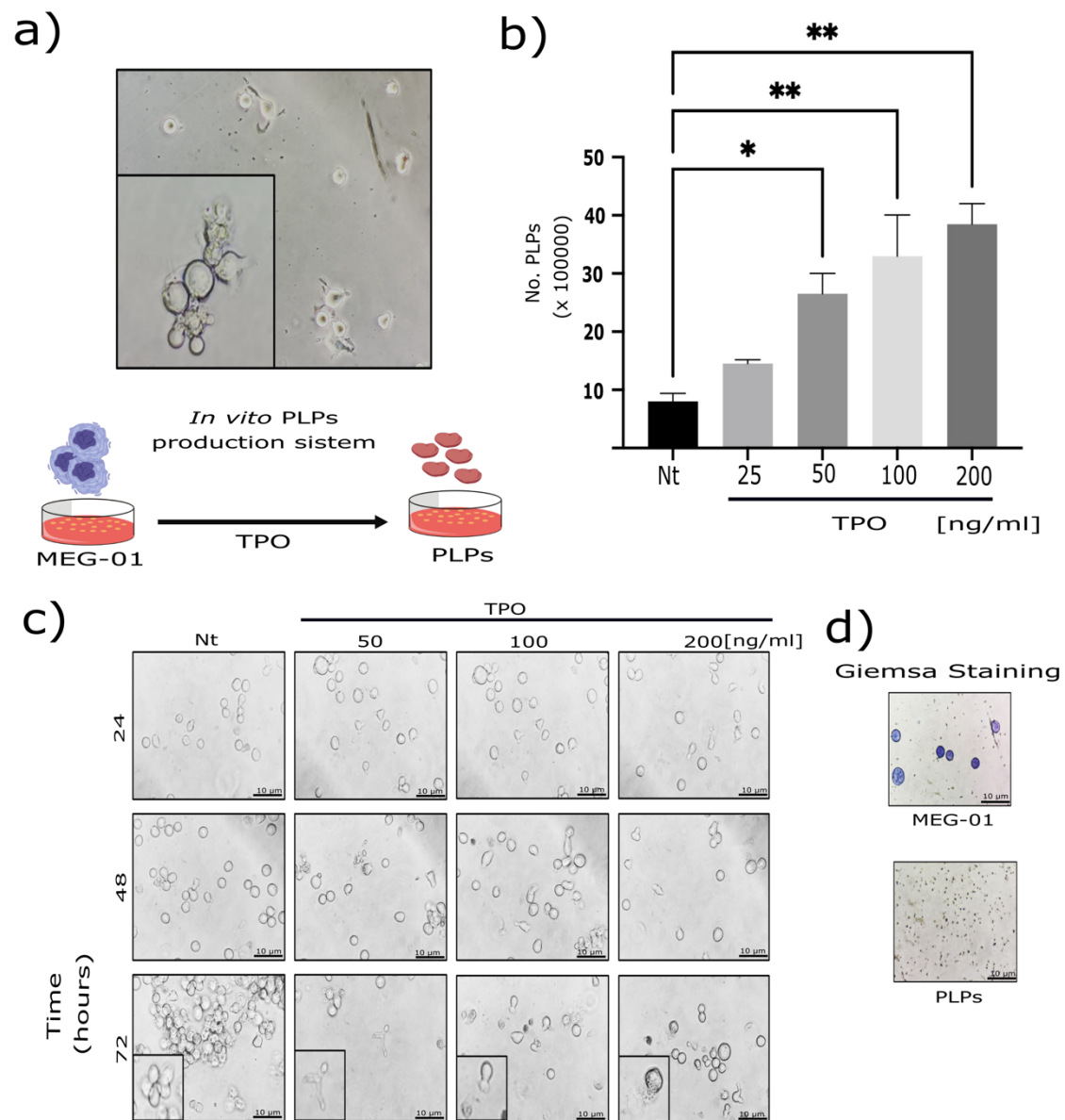


FIGURA 5. OPTIMIZACION DE LA GENERACION DE PLPS A PARTIR DE CELULAS MEG-01 MEDIANTE INDUCCIÓN CON TPO

Con el fin de establecer las condiciones óptimas para la diferenciación de megacariocitos y la producción de PLPs, las células **MEG-01** fueron estimuladas con concentraciones crecientes de **TPO; 25–200 ng/mL** durante 72 horas. **(a)** Representación esquemática del flujo experimental utilizado para la generación de PLPs inducidas por TPO. **(b)** Cuantificación del número de PLPs producidas bajo distintas concentraciones de TPO, mostrando que el tratamiento con **200 ng/mL** durante 72 horas generó el mayor número de partículas. **(c)** Evaluación morfológica de la liberación de PLPs mediante microscopía de campo claro, donde se observa un incremento progresivo en la producción plaquetaria dependiente de la dosis de TPO. **(d)** Confirmación morfológica mediante **tinción de Giemsa**, que evidencia la presencia de partículas pequeñas, anucleadas y con citoplasma denso, características típicas de plaquetas funcionales.

Los datos cuantitativos se expresan como **media $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.)**, obtenidos a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante **ANOVA de una vía** seguido de la prueba **post-hoc de Tukey**. Nivel de significancia: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ en comparación con concentraciones menores de TPO. **Abreviaturas:** PLP, *platelet-like particle*; TPO, trombopoyetina; MEG-01, línea celular de megacariocitos humana; S.E.M., error estándar de la media.

Aislamiento y purificación de plaquetas

Con el objetivo de garantizar que las muestras utilizadas correspondieran exclusivamente a plaquetas y estuvieran libres de megacariocitos residuales, se establecieron y validaron protocolos diferenciados de aislamiento y purificación

tanto a partir de sangre periférica como del sistema in vitro basado en la línea MEG-01 (Figura 6a). Aislamiento de plaquetas a partir de sangre periférica

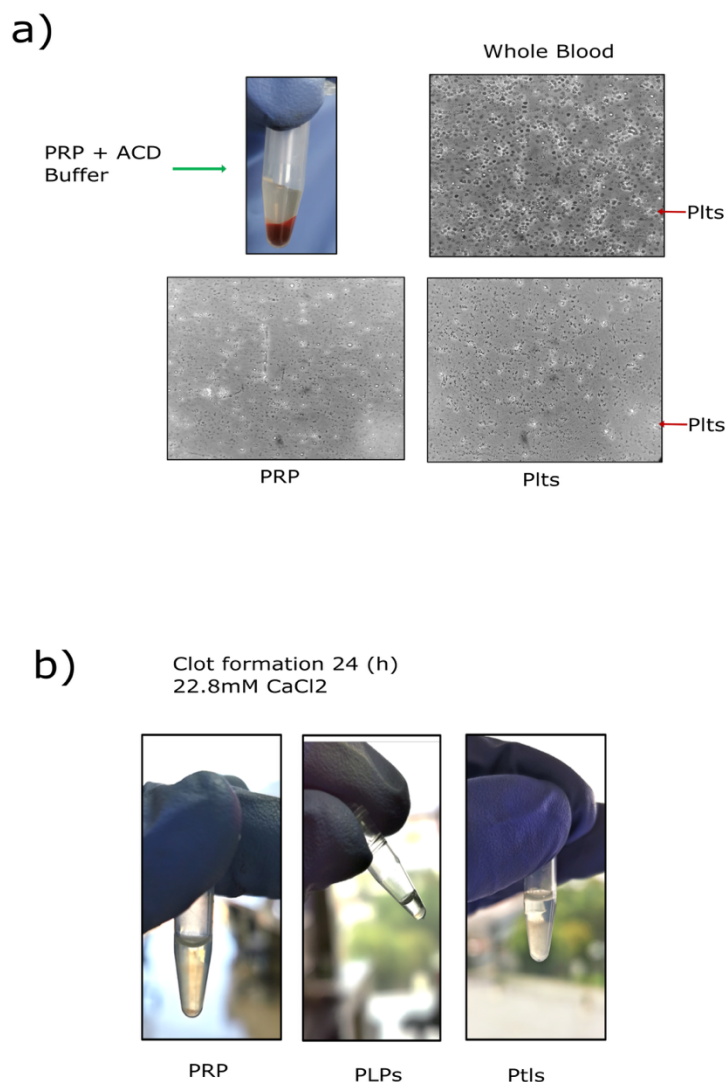


FIGURA 6. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y VALIDACION FUNCIONAL DE PLAQUETAS DERIVADAS DE SANGRE PERIFERICA Y DEL SISTEMA IN VITRO

(a) Esquema representativo del proceso de obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) y Plts purificadas. Las muestras de sangre total fueron recolectadas en tubos con citrato de sodio y procesadas dentro de las 2 h posteriores a su obtención. El PRP se obtuvo mediante centrifugación a **100× g durante 20 minutos**, seguido de un segundo centrifugado para eliminar eritrocitos residuales. Las plaquetas se aislaron por centrifugación final a **800× g durante 20 minutos** y se resuspendieron en tampón de Tyrode suplementado con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA). Las imágenes de campo claro muestran la morfología típica de las plaquetas tanto en sangre total, PRP como tras la purificación final, evidenciando su distribución homogénea y tamaño reducido (barra de escala = 10 µm). (b) Ensayo funcional de

coagulación. La capacidad procoagulante de las **Plts** purificadas y de las **PLPs** derivadas de MEG-01 se evaluó mediante la formación de coágulos tras 24 horas de incubación con **22.8 mM de CaCl₂**. Se observó la formación visible de agregados en las muestras de PRP y PLPs, confirmando la conservación de su actividad funcional. En conjunto, estos resultados validan la eficiencia del protocolo de aislamiento plaquetario y demuestran que las **PLPs** generadas *in vitro* conservan propiedades funcionales comparables a las plaquetas derivadas de sangre periférica. **Abreviaturas:** PRP, *plasma rico en plaquetas*; Plts, *plaquetas purificadas*; PLPs, *platelet-like particles*; BSA, *bovine serum albumin*; CaCl₂, *cloruro de calcio*; MEG-01, *línea de megacariocitos humana*.

Las plaquetas humanas se obtuvieron de donadores voluntarios de laboratorio bajo condiciones estériles. La sangre total fue colectada en tubos BD Vacutainer® con citrato de sodio (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) para prevenir la coagulación, y las muestras se procesaron dentro de las 2 horas posteriores a la recolección para preservar la integridad plaquetaria. El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo mediante centrifugación de la sangre total a 100 × g durante 20 minutos a temperatura ambiente, sin freno. La capa superior de PRP se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo, y se adicionó ácido acetilsalicílico (200 µM) para inhibir la activación plaquetaria. Posteriormente, el PRP se centrifugó nuevamente a 100 × g por 20 minutos para eliminar eritrocitos residuales. Las plaquetas fueron finalmente pelleteadas a 800 × g durante 20 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet plaquetario en buffer Tyrode (pH 7.4) suplementado con 0.1 % de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich A2153).

La concentración y pureza plaquetaria se determinaron por conteo manual en cámara Neubauer bajo microscopía de luz, y su morfología se confirmó mediante microscopía de contraste de fases. Las plaquetas purificadas se utilizaron inmediatamente después del aislamiento en los ensayos funcionales.

El PRP fue obtenido exclusivamente con fines de investigación *in vitro* y procesado bajo lineamientos de bioseguridad institucional y normas éticas nacionales e internacionales (NOM-012-SSA3-2012; CIOMS 2016), en condiciones de riesgo mínimo y sin recolección de datos personales o clínicos.

Aislamiento de plaquetas derivadas del sistema *in vitro*

Las plaquetas generadas a partir de la línea MEG-01 PLPs se aislaron mediante raspado suave de la placa de cultivo, seguido de una centrifugación a 110 × g

durante 4 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente a $110 \times g$ por 15 minutos para eliminar células residuales. Posteriormente, esta fracción se sometió a una centrifugación final a $1\,600 \times g$ durante 15 minutos, obteniéndose las plaquetas aisladas, que se resuspendieron en medio fresco suplementado para preservar su viabilidad. Este protocolo se adaptó del sistema de purificación de sangre periférica y optimizó los parámetros de centrifugación para el contexto *in vitro* de cultivo celular, asegurando una alta pureza y viabilidad plaquetaria en las PLPs obtenidas.

Evaluación funcional

La funcionalidad de las PLPs se evaluó mediante un ensayo de formación de coágulo inducido por cloruro de calcio (CaCl_2). Este compuesto activa la cascada de coagulación, permitiendo estimar la capacidad de agregación plaquetaria. Las PLPs obtenidas tras la estimulación con TPO mostraron una respuesta funcional positiva, evidenciada por la formación de agregados celulares y estructuras fibrilares, confirmando que las plaquetas generadas *in vitro* conservan una actividad biológica comparable a las plaquetas derivadas de sangre periférica (figura 6b).

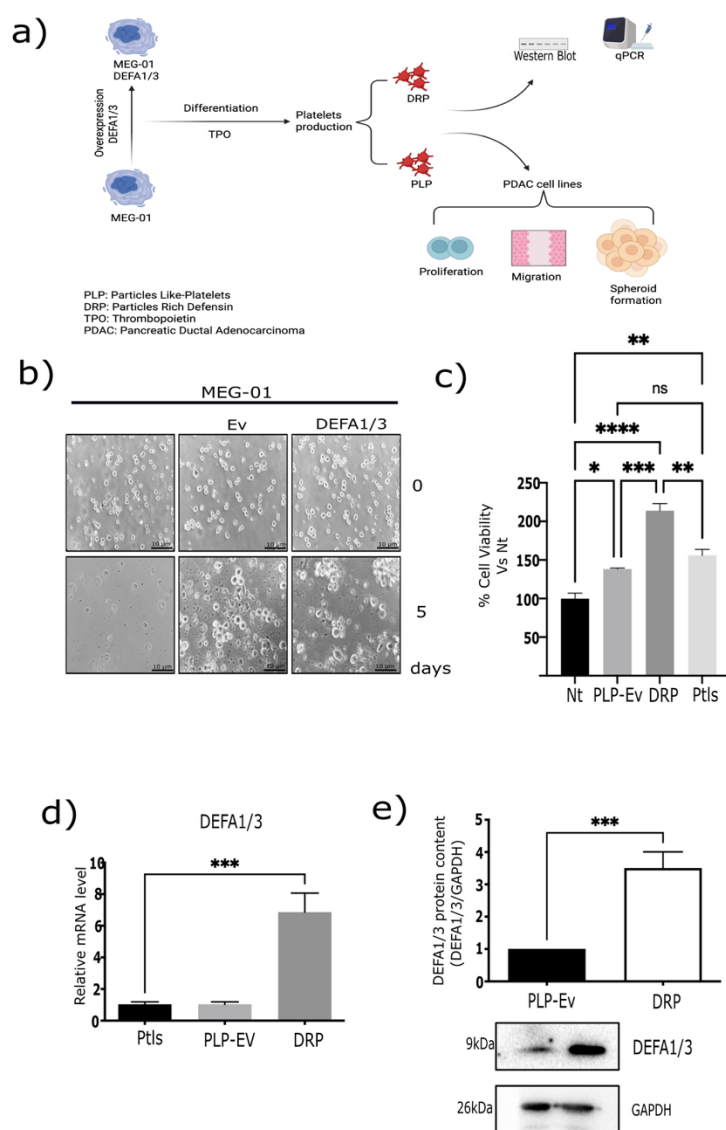
En conjunto, estos resultados establecieron un protocolo eficiente, reproducible y funcional para la producción y purificación de plaquetas derivadas de MEG-01, constituyendo la base experimental para la generación de DRPs utilizadas en los experimentos posteriores.

7.5. VALIDACION DEL SISTEMA DE PRODUCCION DE PLPS Y DRPS *IN VITRO*

Con el sistema de producción de plaquetas producidas *in vitro* optimizado, se generó un modelo experimental para evaluar el efecto de las defensinas plaquetarias en la biología del PDAC (Figura 7a). Las **células MEG-01 con sobreexpresión de *DEFA1/3*** fueron diferenciadas hacia PLPs mediante TPO, obteniéndose dos preparaciones experimentales:

- **PLP-Ev (vector vacío), y**
- **DRPs (Defensin-Rich Platelets).**

Las PLPs generadas *in vitro* mostraron una **actividad biológica comparable a plaquetas humanas**. En co-cultivo con células **BxPC-3** de PDAC, incrementaron significativamente la **viabilidad celular** respecto a controles no tratados, este efecto fue aún mayor con las células tratadas con **DRPs**, lo que sugiere que *DEFA1/3* **modula positivamente parámetros celulares como proliferación o evasión de**



la apoptosis (Figura 7c). El análisis por **qPCR** y

FIGURA 7. GENERACION Y VALIDACION DE DRPS Y PLPS DERIVADAS DE CELULAS MEG-01

(a) Esquema general del flujo experimental. Las células MEG-01 fueron transducidas con vectores lentivirales que codifican **DEFA1/3** o con un vector vacío

(Ev) utilizado como control. Posteriormente, las células modificadas fueron diferenciadas para producir **PLPs** y **DRPs**. Estas partículas se emplearon para su caracterización molecular (qPCR, Western Blot) y en ensayos funcionales sobre líneas celulares de PDAC, incluyendo proliferación, migración y formación de esferoides. **(b)** Generación de DRPs mediante sobreexpresión de *DEFA1/3* por transducción lentiviral. Las partículas virales se obtuvieron por cotransfección de células HEK293T con los vectores **pLV-IRES-DEFA1/3** (vector donador), **pLJM1-GFP** (control de transducción), **psPAX2** (plásmido de empaquetamiento) y **pCMV-VSV-G** (proteína de envoltura). Los sobrenadantes virales se recolectaron cada 12 horas durante tres días y se emplearon para la transducción de MEG-01. Las imágenes representativas muestran las partículas semejantes a plaquetas liberadas por las células MEG-01-Ev y MEG-01-DEFA1/3 (barra de escala = 10 μ m). **(c)** Ensayo de viabilidad celular tras siete días de cocultivo de células PDAC con PLPs-Ev, DRPs o PLTs derivadas de sangre periférica, con el objetivo de evaluar su posible citotoxicidad. **(d)** Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de *DEFA1/3* mediante qPCR en las líneas parentales MEG-01, MEG-01-Ev y MEG-01-DEFA1/3. **(e)** Confirmación de la expresión proteica por **Western blot**, con cuantificación densitométrica normalizada frente a **GAPDH**. Cada barra representa la media $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.), obtenida de al menos cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Tukey. Nivel de significancia: $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$, ns = no significativo. Este modelo ofrece una plataforma in vitro controlada para estudiar cómo las moléculas derivadas de plaquetas, como *DEFA1/3*, modulan el comportamiento de las células de cáncer de páncreas, simulando las interacciones funcionales observadas en las plaquetas circulantes de pacientes. **Abreviaturas:** PDAC, *adenocarcinoma ductal de páncreas*; *DEFA1/3*, *defensina alfa 1/3*; DRPs, *defensin-rich platelets*; PLPs, *platelet-like particles*; Ev, vector vacío; PLTs, plaquetas; qPCR, *reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa*; WB, *Western blot*; GAPDH, *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa*; Nt, no tratado; S.E.M., *error estándar de la media*.

Western blot confirmó la **sobreexpresión de *DEFA1/3*** en DRPs en comparación con PLP-Ev y plaquetas sanguíneas (Figuras 7d–e).

Estos resultados validan las observaciones transcriptómicas y confirman la **eficacia del modelo *in vitro* de plaquetas enriquecidas en defensinas**, que sirvió como plataforma funcional para los análisis de migración, proliferación y agresividad tumoral descritos en las secciones siguientes.

7.6. EVALUACION DOSIS-RESPUESTA DE DEFA1/3 RECOMBINANTE EN LINEAS CELULARES DE PDAC

De forma adicional, evaluamos el efecto del tratamiento con la proteína recombinante DEFA1/3 humana sobre líneas celulares de PDAC con el fin de determinar si los efectos son por la presencia de la DEFA1/3 o por las plaquetas o la combinación de ambas —específicamente BxPC-3, AsPC-1 y Capan-2— mediante un diseño de dosis-respuesta. Se trataron las líneas con concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400 ng/mL de DEFA1/3. A partir de 50 ng/mL se observó ya un ligero incremento en la viabilidad celular, mientras que el efecto más consistente se registró a 100 ng/mL; a concentraciones más altas (200-400 ng/mL) el aumento se mantuvo, pero decidimos emplear sistemáticamente 100 ng/mL como concentración estándar, dado que este valor es inferior al rango reportado para condiciones fisiológicas de defensinas y permite evaluar un efecto modulador más sutil. Los resultados mostraron que las líneas AsPC-1 y BxPC-3 respondieron de manera más eficaz al estímulo, mientras que la línea Capan-2 presentó una menos respuesta en comparación con las otras líneas celulares (Figura 8a-c).

Para visualizar de manera integral los datos, se generó un mapa de calor (heatmap) con los valores de viabilidad normalizados frente al control no tratado (Nt) en función de las concentraciones empleadas y de las líneas celulares. El heatmap evidenció bloques de colores que correspondían a un aumento progresivo de la viabilidad al incrementarse la dosis de DEFA1/3, con mayor intensidad roja en AsPC-1 y BxPC-3, y tonos más tenues en Capan-2. Esta representación gráfica refuerza la noción de que DEFA1/3 ejerce un efecto dosis-dependiente sobre la supervivencia de

células de PDAC, y que la magnitud de la respuesta varía según la línea celular (Figura 8d).

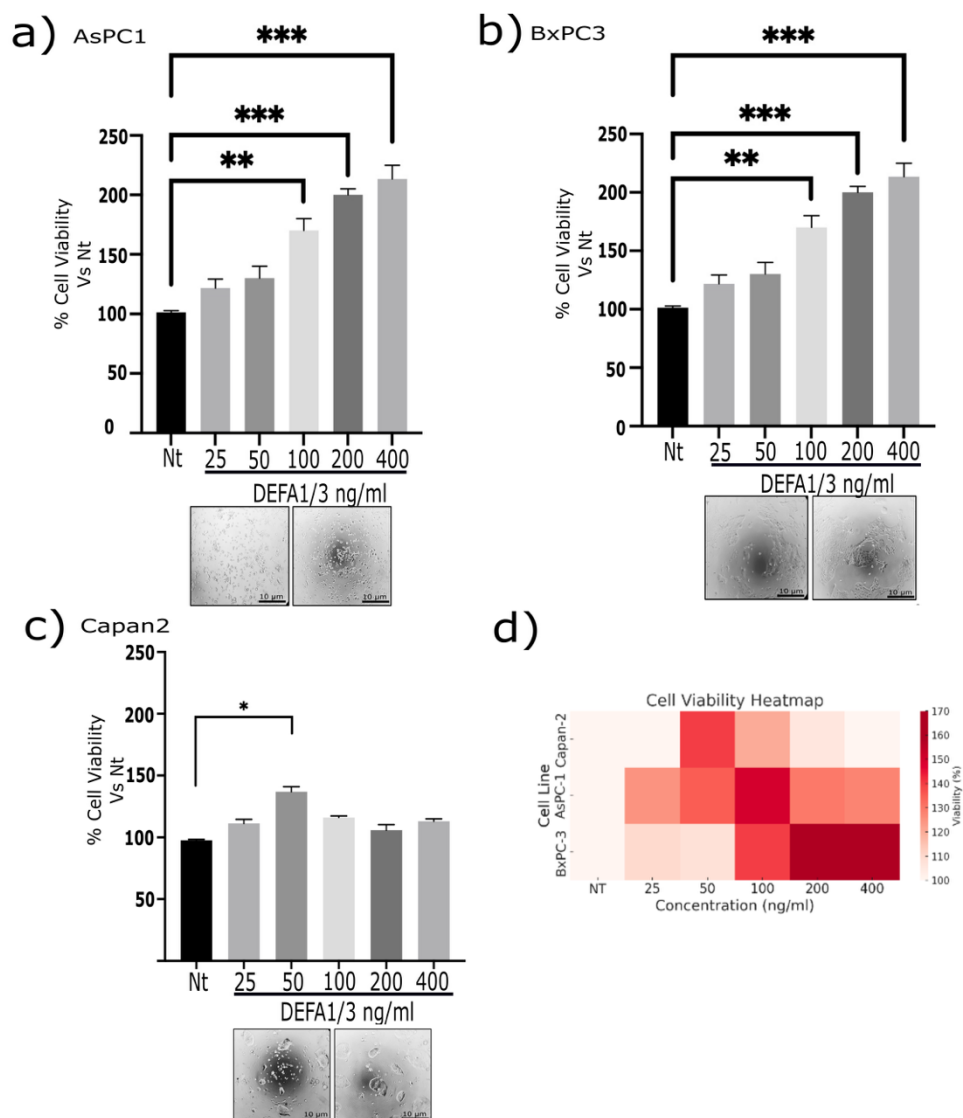


FIGURA 8. EVALUACION DEL EFECTO DE LA DEFA1/3 RECOMBINANTE HUMANA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN LINEAS DE CANCER DE PANCREAS

Con el objetivo de analizar la respuesta de las células tumorales a la exposición directa de **DEFA1/3 recombinante humana**, las líneas celulares **AsPC-1**, **BxPC-3** y **Capan-2** fueron tratadas con concentraciones crecientes de **DEFA1/3 (25–400 ng/mL)** durante 72 horas. **(a–c)** Ensayos de viabilidad celular realizados en cada línea mediante un método colorimétrico basado en la actividad metabólica. En todas

las líneas evaluadas se observó un incremento dosis-dependiente de la viabilidad celular en comparación con el **Nt**. Las imágenes representativas muestran el crecimiento y la morfología de las células bajo las distintas condiciones de tratamiento. (d) Mapa de calor que resume los valores relativos de viabilidad entre concentraciones y líneas celulares, evidenciando un aumento progresivo en la supervivencia celular conforme se incrementan los niveles de DEFA1/3. Los datos se expresan como **media $\pm$ SEM**, obtenidos a partir de al menos tres experimentos biológicos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se efectuó mediante **ANOVA de una vía**, seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Nivel de significancia: $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$ vs. Nt. **Abreviaturas:** DEFA1/3, *defensina alfa 1/3*; Nt, no tratado; SEM, *error estándar de la media*.

7.7. LAS DRPS POTENCIAN LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CELULAS DE CANCER PANCREATICO

Considerando la relación conocida entre la **activación plaquetaria y la diseminación tumoral**, se evaluó si las DRPs influían en el **comportamiento migratorio** de las células de PDAC. Las líneas **BxPC-3** y **AsPC-1** fueron cultivadas en cámaras de inserción Ibidi® para generar heridas estandarizadas (*wound-healing assay*), y posteriormente tratadas con **PLP-Ev** o **DRPs**. Con el fin de **excluir el efecto de la proliferación celular**, todos los ensayos se realizaron en presencia del **inhibidor de síntesis de ADN Ara-C (15 μ M)**.

Las imágenes en contraste de fase obtenidas al inicio (T0) y a las 72 h mostraron una **acelerada migración y cierre de herida** en las culturas tratadas con DRPs, en comparación con los grupos no tratados o tratados con PLP-Ev (Figuras 9a-b).

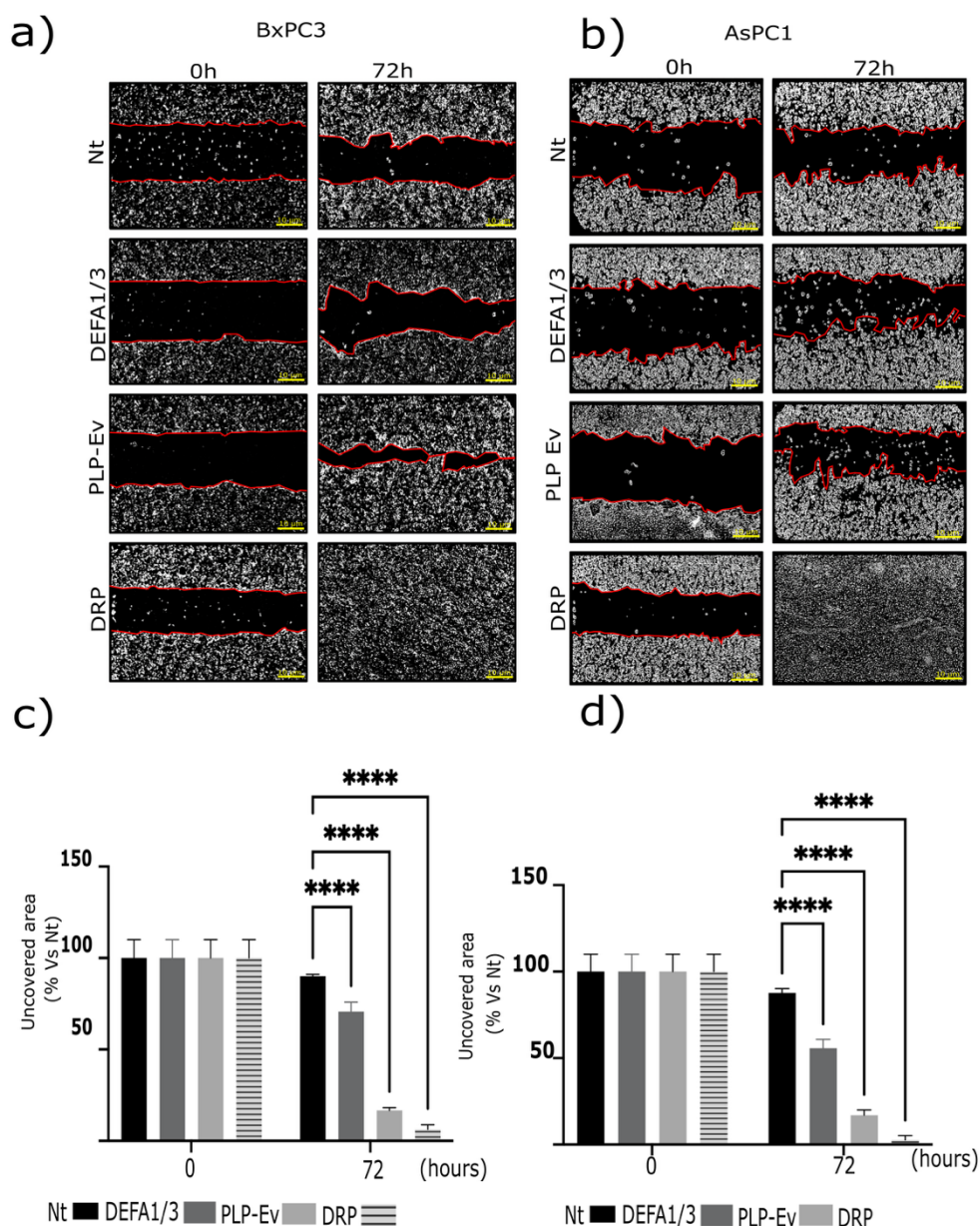


FIGURA 9. LAS DRPS PROMUEVEN LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS LINEAS CELULARES DE CANCER DE PANCREAS

Se evaluaron los efectos de las **DRPs** y de la **DEFA1/3 recombinante humana** sobre la migración celular en las líneas **AsPC-1** y **BxPC-3** mediante un ensayo de **cierre de herida (wound-healing assay)**. Las células se sembraron en cámaras de cultivo **Ibidi® 2-well inserts** y se dejaron

crecer hasta alcanzar confluencia. Posteriormente, se retiraron los insertos para generar un espacio libre definido ("herida"), y el cierre de la herida se monitoreó en el tiempo basal (T0) y tras 72 horas de incubación en medio libre de suero suplementado con 5 μ M de arabinósido de citosina (Ara-C), a fin de inhibir la proliferación celular. **(a, b)** Imágenes representativas de microscopía de campo claro que muestran el cierre de la herida a T0 y 72 h en células **BxPC-3 (a)** y **AsPC-1 (b)** tratadas con los grupos control no tratado (Nt), DEFA1/3 recombinante (100 ng/mL), **PLP-Ev** o **DRPs**. Las líneas rojas indican los bordes de la herida utilizados para delimitar el área no cubierta empleada en la cuantificación. Barra de escala = 10 μ m. **(c, d)** Cuantificación del cierre de la herida expresada como porcentaje del área no cubierta en relación con el grupo Nt en T0 para **BxPC-3 (c)** y **AsPC-1 (d)**. Las barras grises con patrón indican las condiciones tratadas con DRPs en los paneles. El análisis de migración se realizó mediante el software **ImageJ (v1.53t, NIH)**. Los datos se expresan como **media $\pm$ SEM**, obtenidos a partir de al menos tres experimentos biológicos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se efectuó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Tukey, comparando cada tratamiento entre T0 y 72 h. Nivel de significancia: **** $p \leq 0.0001$ vs. Nt. Estos resultados indican que las **DRPs** promueven la motilidad celular tumoral de manera independiente de la proliferación, lo cual representa un rasgo característico de la diseminación tumoral mediada por plaquetas. **Abreviaturas:** DRPs, *defensin-rich platelets*; PLPs, *platelet-like particles*; PLP-Ev, *platelet-like particles derivadas de vector vacío*; DEFA1/3, *defensina alfa 1/3*; Nt, *no tratado*; Ara-C, *arabinósido de citosina β -D*; PDAC, *adenocarcinoma ductal de páncreas*; SEM, *error estándar de la media*.

El análisis cuantitativo del área no cubierta confirmó que el tratamiento con DRPs **incrementó significativamente la capacidad migratoria** de ambas líneas celulares (**AsPC-1** y **BxPC-3**; Figuras 9c y 9d). En particular, las células **BxPC-3** tratadas con DRPs mostraron un **completo cierre de herida en 72 h**, evidenciando el **efecto pro-migratorio marcado** de esta línea celular.

En conjunto, estos resultados demuestran que las **DRPs constituyen un estímulo potente para la migración de células de cáncer pancreático**, independiente de la proliferación celular, y refuerzan la hipótesis de que las **defensinas plaquetarias contribuyen a programas pro-tumorigénicos en el PDAC**.

7.8. LAS DRPS PROMUEVEN LA PROLIFERACION, EL CRECIMIENTO TRIDIMENSIONAL Y LA CAPACIDAD CLONOGENICA DE LAS CELULAS DE CANCER PANCREATICO

Dado que una mayor capacidad migratoria suele estar asociada con un incremento en la proliferación y supervivencia celular, se evaluó si las **DRPs** también promovían

el crecimiento y la expansión a largo plazo de las células de cáncer de páncreas. Estos análisis permitieron comprobar que las DRPs ejercen efectos **claramente pro-tumorigénicos**, los cuales se exploraron mediante ensayos complementarios utilizando la línea celular **BxPC-3**.

En primer lugar, se realizó un **ensayo de proliferación celular** a las 72 horas tras el tratamiento con DRPs o PLPs control. Se observó que las DRPs **incrementaron significativamente la proliferación** en comparación con las condiciones no tratadas y con las tratadas con PLP-Ev (Figura 10a), lo que sugiere que el enriquecimiento en *DEFA1/3* **potencia el soporte proliferativo** proporcionado por las PLPs. Posteriormente, se evaluó la capacidad de crecimiento tridimensional mediante un **ensayo de formación de esferoides**. Las células BxPC-3 fueron cultivadas bajo condiciones no adherentes y tratadas con proteína recombinante DEFA1/3, PLPs, DRPs y control durante 10 días. Desde el día 5, las células tratadas con PLPs ó DRPs presentaron un **aumento notable en el número de esferoides** respecto a las células no tratadas ,o células tratadas solo DEFA1/3, siendo el efecto más pronunciado en el grupo con DRPs, con un incremento aproximado del **50%**

(Figuras 10b-c). Además, los esferoides formados en presencia de DEFA1/3 o DRPs mostraron

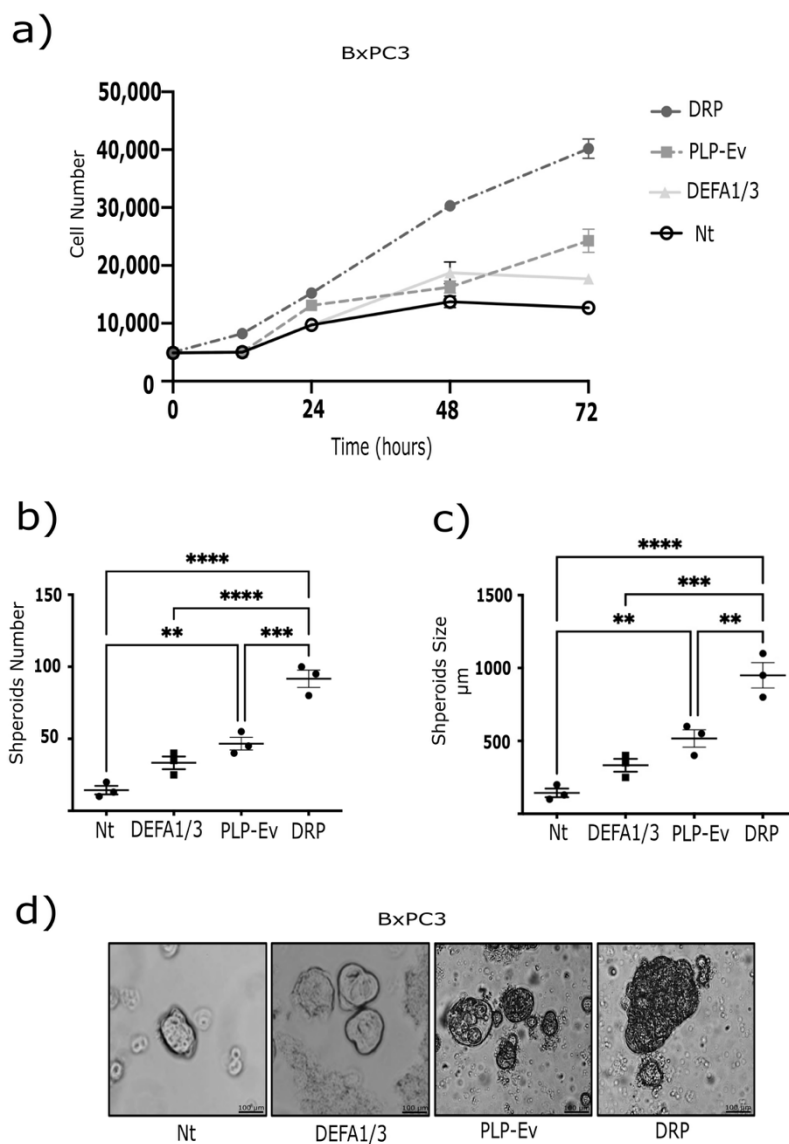


FIGURA 10. LAS DRPS POTENCIAN LA FORMACION DE ESFEROIDES Y LA PROLIFERACION EN CELULAS DE CANCER DE PANCREAS

(a) La proliferación celular de la línea **BxPC-3** se evaluó mediante el ensayo **CCK-8**, mostrando un incremento progresivo en la viabilidad bajo tratamiento con **DRPs**. Cada punto representa la **media ± SEM** de al menos cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante **ANOVA de una vía**, seguida de la **prueba post-hoc de Tukey** ($**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$ vs. Nt). (b) Para el ensayo de formación de esferoides, las células **BxPC-3** cultivadas en monocapa se sembraron en placas

Petri recubiertas con una capa delgada de **agarosa al 2%** y se cultivaron durante una semana. Posteriormente, los esferoides se transfirieron a un **incubador rotatorio a 37 °C** en medio Leibovitz's L-15 sin FBS y se trataron con **DRPs o PLPs-Ev** o DEFA1/3 y Nt **(c)** El número y tamaño de los esferoides se cuantificaron utilizando el software **ImageJ (NIH)**. Cada punto de datos corresponde a un experimento independiente, y los resultados se expresan como mediana $\pm$ SEM, obtenidos a partir de al menos tres experimentos biológicos realizados por triplicado. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA con prueba post-hoc de Tukey ($p \leq 0.01$ vs. Nt). **(d)** Imágenes representativas de campo claro muestran los esferoides formados (barra de escala = 100 μ m). El aumento observado en el tamaño y número de esferoides sugiere que las DRPs favorecen el crecimiento tumoral tridimensional y la supervivencia celular, en concordancia con el papel pro-tumorigénico de los factores derivados de plaquetas en el PDAC. **Abreviaturas:** DRPs, *defensin-rich platelets*; PLPs, *platelet-like particles*; PLPs-Ev, *platelet-like particles derivadas de vector vacío*; PDAC, *adenocarcinoma ductal de páncreas*; Nt, *no tratado*; CCK-8, *Cell Counting Kit-8*; FBS, *fetal bovine serum*; SEM, *error estándar de la media*.

diámetros promedio 30% mayores que los observados en los grupos control (Figura 10d). En conjunto, estos resultados demuestran que las DRPs **favorecen tanto la proliferación como el crecimiento tridimensional sostenido** de las células tumorales, reforzando su papel **pro-tumorigénico**. Evaluación del potencial clonogénico inducido por DRPs

Con el fin de determinar si las DRPs promovían un efecto sostenido sobre la capacidad proliferativa y de autorrenovación de las células de cáncer pancreático, se realizaron ensayos clonogénicos a largo plazo en las líneas celulares BxPC-3, AsPC-1 y Capan-2. En la primera generación de cultivos (P1), el tratamiento con DRPs produjo un incremento notable en el número y densidad de colonias en comparación con los grupos Nt y con las plaquetas derivadas del vector vacío PLP-Ev. Las colonias en los grupos tratados con DRPs mostraron un crecimiento más compacto y homogéneo, con mayor expansión radial y tinción más intensa con cristal violeta, indicativa de mayor viabilidad celular (Figuras 11a–c). El efecto proliferativo fue más evidente en las líneas

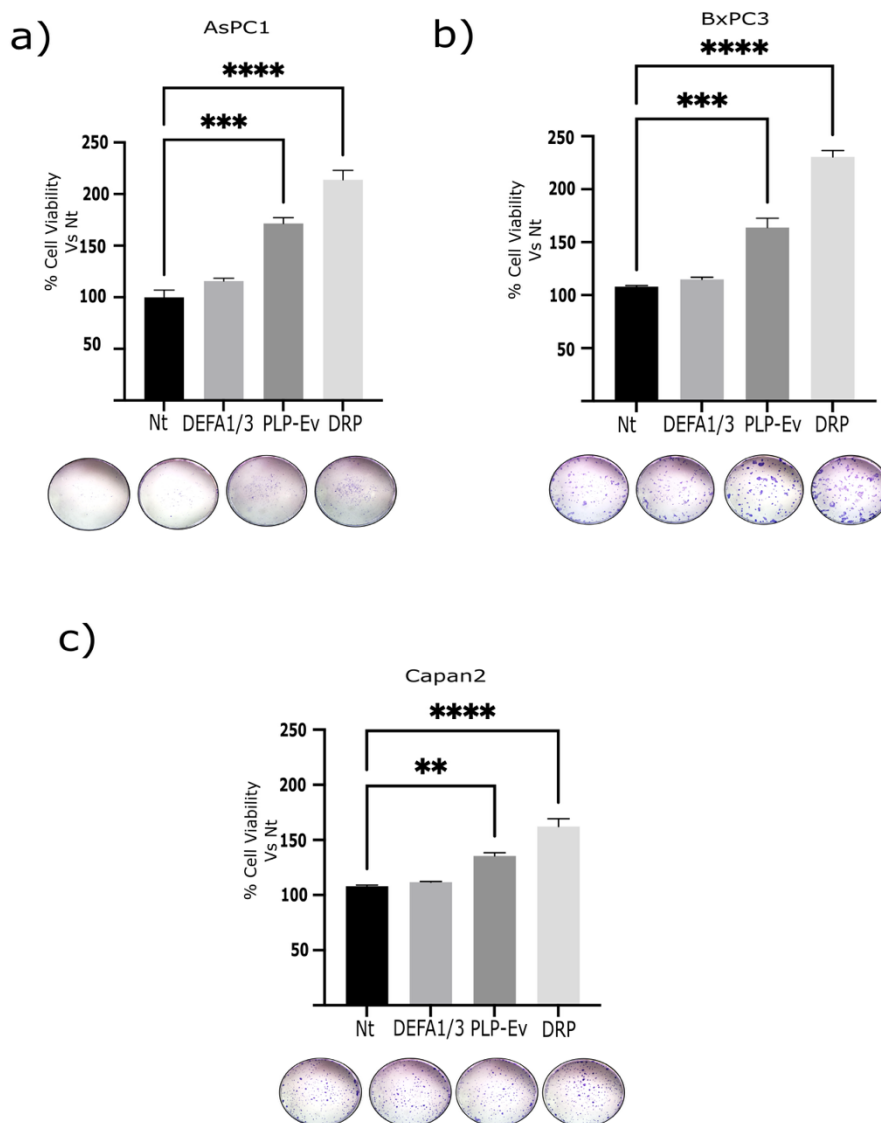


FIGURA 11. LOS ENSAYOS CLONOGENICOS EN SERIE DEMOSTRARON UNA MAYOR CAPACIDAD DE AUTORRENOVACION TRAS EL TRATAMIENTO CON DRPS

Representación esquemática del ensayo clonogénico en serie. Las células de PDAC (BxPC-3, AsPC-1 y Capan-2) se sembraron a baja densidad y se trataron con los grupos **Nt**, **DEFA1/3 recombinante**, **PLP-Ev** o **DRPs**. Las células se dejaron crecer durante 10–14 días hasta la formación de colonias (>50 células), las cuales fueron fijadas y teñidas con cristal violeta al 0.05%, posteriormente tripsinizadas y resembradas a densidad clonal para dos pasajes adicionales (**P2–P3**) con el objetivo de evaluar su capacidad de autorenovación. (**a–c**) Cuantificación del número de colonias a lo largo de los pasajes en serie. Las células tratadas con **DRPs** conservaron una capacidad clonogénica significativamente mayor a través de los pasajes en comparación con los grupos **Nt** y **PLP-Ev**. Las imágenes representativas muestran las colonias teñidas con cristal violeta en el **pasaje 3 (P3)**. Los datos se expresan como **media ± SEM**, obtenidos a partir de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. El análisis estadístico se efectuó mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba post-hoc de Tukey, con niveles de significancia definidos como $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$. Las imágenes representativas de colonias teñidas con cristal violeta fueron capturadas utilizando un microscopio estereoscópico (magnificación no calibrada). La escala no se muestra debido a la variabilidad del zoom óptico. Estos resultados indican que la exposición a DRPs incrementa el potencial clonogénico y de autorrenovación de las células tumorales, sugiriendo que las defensinas derivadas de plaquetas podrían contribuir a la persistencia tumoral y a una mayor capacidad regenerativa en el cáncer de páncreas. **Abreviaturas:** PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*; DRPs, *defensin-rich platelets*; PLPs, *platelet-like particles*; PLP-Ev, *platelet-like particles derivadas de vector vacío*; DEFA1/3, *defensina alfa 1/3*; Nt, *no tratado*; SEM, *error estándar de la media*.

BxPC-3 y AsPC-1, donde las colonias presentaron una morfología densa y bordes definidos, mientras que en Capan-2 se observó una respuesta más moderada, caracterizada por colonias de menor tamaño y densidad celular.

Durante los pases seriados (P2 y P3), las células tratadas con DRPs mantuvieron su capacidad de formar colonias con una eficiencia comparable o incluso superior a la observada en el primer pase, lo que sugiere la preservación de un fenotipo con potencial de autorrenovación. En contraste, las células de los grupos Nt y PLP-Ev mostraron una reducción progresiva en el número y tamaño de las colonias en los pases subsecuentes, evidenciando una pérdida de capacidad proliferativa a largo plazo. El análisis cuantitativo mediante ImageJ confirmó un aumento significativo en la fracción de supervivencia y en el número promedio de colonias por pozo en las

células tratadas con DRPs ($p < 0.01$), particularmente en BxPC-3 y AsPC-1, donde se alcanzaron incrementos de 1.8- y 2.1-veces respecto al control.

Estos resultados demuestran que las DRPs favorecen la expansión clonal y la persistencia proliferativa de las células de PDAC, reforzando la hipótesis de que las defensinas plaquetarias contribuyen a mantener propiedades pro-tumorigénicas y potencial de autorrenovación en el microambiente del adenocarcinoma ductal de páncreas. (Figuras 11a–c). En conjunto, estos hallazgos indican que las DRPs no sólo estimulan la proliferación a corto plazo, sino que también sostienen el crecimiento tridimensional y la capacidad clonogénica en múltiples modelos de PDAC, consolidando su papel como potentes moduladores pro-tumorigénicos.

Para determinar si estos efectos dependían del contacto directo con las partículas plaquetarias o de factores solubles liberados al medio, las células se expusieron a medios condicionados obtenidos de cultivos de PLP-Ev y DRPs. De manera interesante, el medio condicionado de DRPs indujo un aumento moderado pero consistente en la formación de colonias en todas las líneas celulares, aunque en menor grado que el observado con el tratamiento directo con DRPs. Estos resultados sugieren que *DEFA1/3* no sólo se retiene dentro de las estructuras plaquetarias, sino que también se libera al entorno extracelular, contribuyendo así a la actividad pro-tumorigénica observada.

7.9. LAS DRPS POTENCIAN EL CRECIMIENTO Y LA DISEMINACION TUMORAL *IN VIVO*

Para confirmar si los efectos pro-tumorigénicos observados *in vitro* se mantienen en un contexto biológico, se utilizó un modelo de xenoinjerto en pez cebra. Este modelo permitió evaluar el crecimiento y la capacidad invasiva de células humanas de PDAC tratadas con DRPs.

Las células **BxPC-3** pretratadas con PLP-Ev o DRPs fueron inyectadas en el saco vitelino de embriones de pez cebra de 2 días post-fertilización. Tras el periodo de incubación, las células tratadas con PLP-Ev formaron masas tumorales mayores que los controles no tratados y mostraron evidencias de migración más allá del sitio

de inyección. Sin embargo, las células tratadas con DRPs generaron volúmenes tumorales considerablemente mayores y presentaron una migración significativamente aumentada, evidenciada por la diseminación de células fluorescentes hacia regiones distales, incluyendo cabeza y cola (Figura 12a).

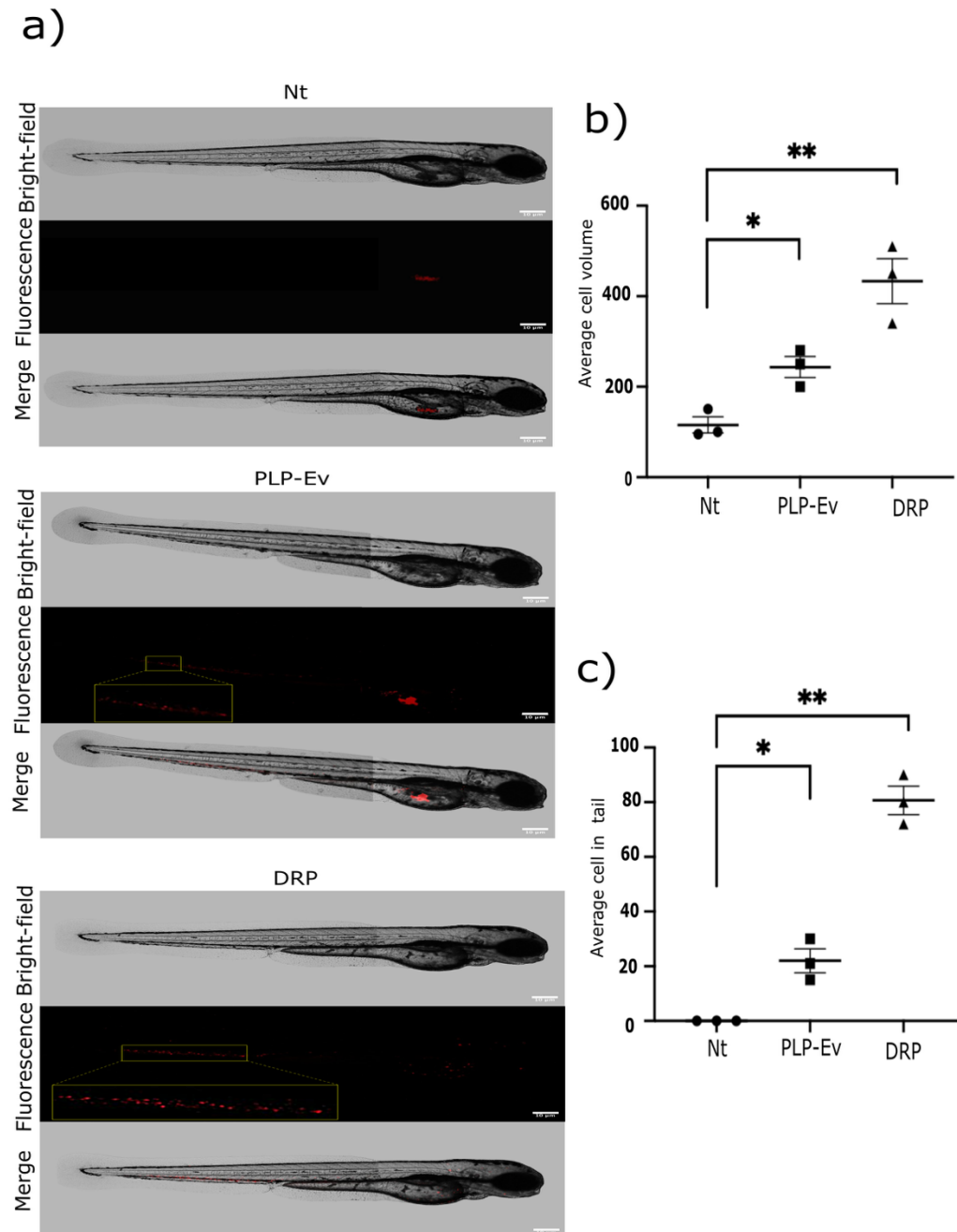


FIGURA 12. LAS DRPS AUMENTAN LA MIGRACION IN VIVO EN UN MODELO DE PEZ CEBRA

Ensayo de migración *in vivo* utilizando embriones de pez cebra como modelo de xenoinjerto con células de cáncer pancreático **BxPC-3**. **(a)** Imágenes representativas de embriones de 2 dpf, a las 24 horas post-inyección (hpi) con aproximadamente 300 células BxPC-3 previamente tratadas con **DRPs** o **PLPs-Ev**. Se muestran vistas en campo claro (superior), epifluorescencia (medio) y combinadas (inferior). La fluorescencia roja indica la localización de las células humanas de cáncer pancreático dentro de los embriones. Barra de escala = 100 μ m. **(b)** Cuantificación del área total fluorescente (como indicador del volumen del esferoide) y **(c)** del número de células diseminadas localizadas fuera del saco vitelino. Los análisis se realizaron utilizando el software FIJI–ImageJ (versión 1.54p, NIH). Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (SD) obtenidos a partir de **tres** experimentos independientes, cada uno con al menos 20 embriones por condición experimental. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Tukey, con niveles de significancia definidos como $*p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$. El modelo de xenoinjerto en pez cebra proporciona un sistema dinámico para visualizar en tiempo real las interacciones tumor–plaqueta *in vivo*. Los resultados confirman que las células tratadas con DRPs presentan una mayor capacidad de invasión y diseminación, lo que respalda el papel pro-migratorio de las plaquetas enriquecidas en defensinas en la progresión tumoral del cáncer de páncreas. **Abreviaturas:** DRPs, *defensin-rich platelets*; PLPs, *platelet-like particles*; PLPs-Ev, *platelet-like particles derivadas de vector vacío*; PDAC, *adenocarcinoma ductal de páncreas*; Nt, *no tratado*; hpi, *horas post-inyección*; SD, *desviación estándar*.

Aunque las imágenes representativas pueden no reflejar completamente la densidad celular dentro del saco vitelino debido a la variabilidad técnica de fluorescencia, el análisis cuantitativo confirmó que los xenoinjertos tratados con DRPs presentaron los mayores volúmenes tumorales y niveles de diseminación (Figuras 12b y 12c). Estos resultados validan los hallazgos *in vitro* y demuestran que las DRPs no sólo promueven el crecimiento del cáncer pancreático, sino que también incrementan su potencial invasivo *in vivo*.

De manera consistente, los experimentos realizados en distintos sistemas experimentales —incluyendo ensayos de proliferación, clonogenicidad, migración, cultivos tridimensionales y modelos de xenoinjerto— mostraron que el tratamiento con DRPs mejora la viabilidad, capacidad migratoria y crecimiento invasivo de las células tumorales de PDAC. Estos efectos fueron más pronunciados que los observados con PLPs control o medios condicionados, destacando la relevancia

funcional del **enriquecimiento en DEFA1/3** dentro de las partículas plaquetarias. En conjunto, estos hallazgos identifican a las DRPs como moduladores claves de la progresión del cáncer pancreático, proporcionando un marco funcional sólido para su estudio molecular y clínico, y demostrando que las plaquetas enriquecidas en DEFA1/3 potencian la agresividad tumoral del PDAC a diferentes escalas biológicas.

7.10. LAS DRPS INDUCEN REPROGRAMACION TRANSCRIPCIONAL EN CELULAS DE PDAC

Una vez que se determinó que las plaquetas enriquecidas en *DEFA1/3* promueven el crecimiento y la diseminación tumoral *in vivo*, evaluamos si estos efectos se reflejan a nivel molecular y se correlacionan con datos transcriptómicos derivados de pacientes. Para vincular de manera mecánica las observaciones experimentales con la evidencia clínica, se realizó un análisis combinado *in vitro* e *in silico*, integrando los resultados experimentales con datos del consorcio TCGA-PDAC (Figuras 13a–d).

El análisis por qPCR reveló que las células BxPC-3 tratadas con DRPs presentaron una sobreexpresión significativa de *SPARC*, *KDM6A* y *GATA6* en comparación con el grupo no tratado ($p < 0.001$), mientras que *EGR1* no mostró cambios relevantes. Estos hallazgos sugieren que las DRPs activan selectivamente programas transcripcionales asociados con la migración en el PDAC.

Para determinar la relevancia clínica de estos resultados, se analizó la supervivencia global (OS) en la cohorte TCGA-PDAC, estratificando a los pacientes según niveles altos o bajos de expresión de *DEFA1/3* y conteo plaquetario. Los pacientes con baja expresión de *DEFA1/3* y alta cantidad de plaquetas presentaron los mejores desenlaces, mientras que aquellos con alta

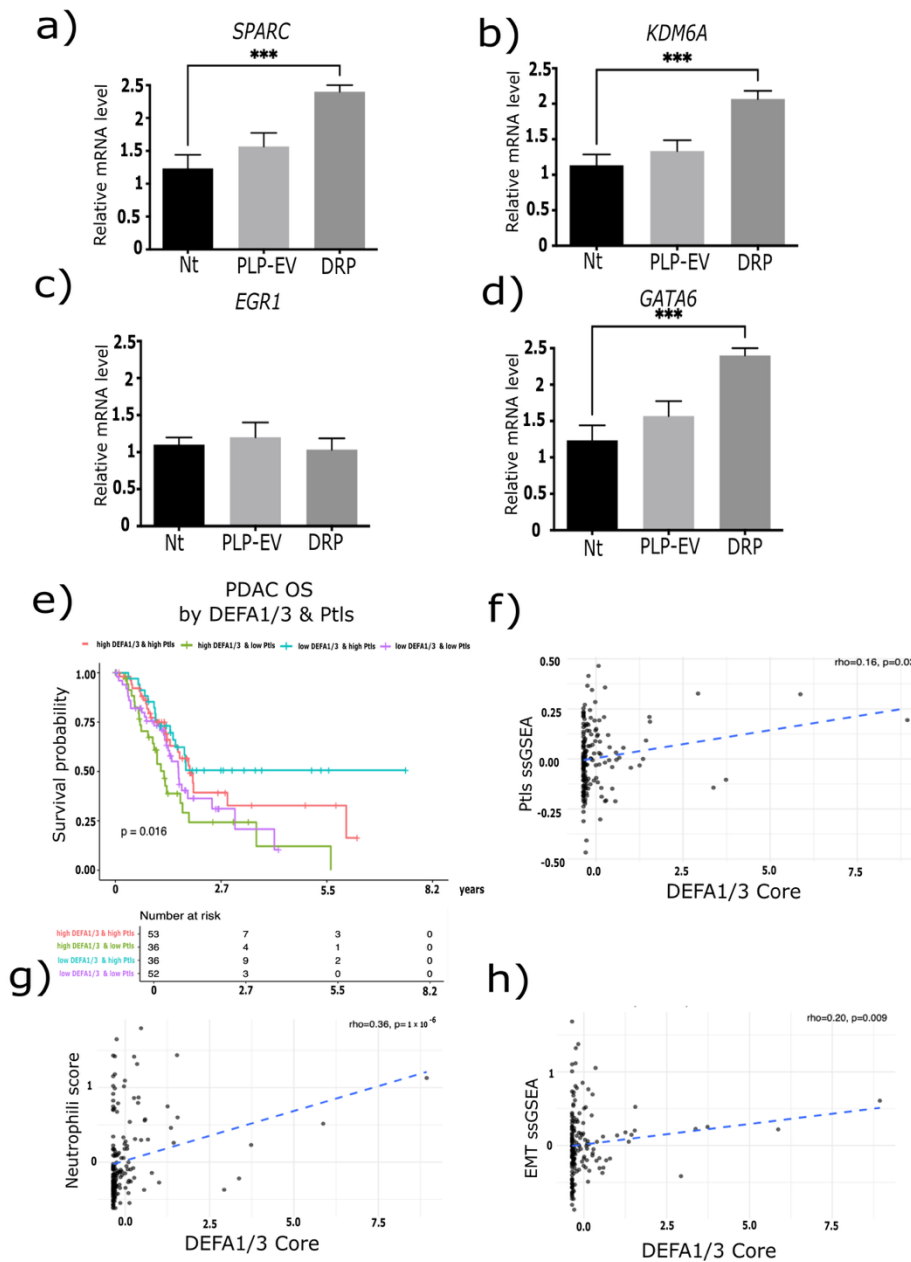


FIGURA 13. LAS DRPS MODULAN LA EXPRESION GENICA EN CELULAS DE CANCER DE PANCREAS

Las células de adenocarcinoma ductal de páncreas BxPC-3 fueron tratadas con **DRPs** o con **PLPs-Ev**, y se cuantificaron los niveles de expresión de **ARNm** de los genes **(a) SPARC**, **(b) KDM6A**, **(c) EGR1** y **(d) GATA6** mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como expresión relativa de ARNm normalizada con GAPDH, expresados como media $\pm$ SEM a partir de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. El análisis estadístico se efectuó mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba post-hoc de Tukey, con niveles de significancia definidos como $***p \leq 0.001$. **(e)** Análisis de supervivencia tipo Kaplan–Meier para la supervivencia global (OS) de pacientes con **PDAC** de la cohorte TCGA-PAAD ($n = 177$), estratificados según alta/baja expresión de DEFA1/3 y recuento plaquetario alto/bajo. Los pacientes con **baja expresión de DEFA1/3** y niveles elevados de plaquetas presentaron los desenlaces más favorables, mientras que aquellos con alta expresión de DEFA1/3 y bajo número de plaquetas mostraron la peor supervivencia (prueba log-rank, $p = 0.016$). **(f–h)** La expresión de **DEFA1/3** mostró correlaciones positivas con **(f) rutas** relacionadas con plaquetas ($\rho = 0.16$, $p = 0.03$), **(g) infiltración de neutrófilos** ($\rho = 0.36$, $p = 1 \times 10^{-6}$), y **(h) activación de la EMT** ($\rho = 0.20$, $p = 0.009$). La línea discontinua azul representa el ajuste de regresión lineal entre la expresión de **DEFA1/3** y cada firma transcripcional evaluada mediante **ssGSEA** (*single-sample Gene Set Enrichment Analysis*). En conjunto, estos análisis moleculares y clínicos revelan que la expresión de **DEFA1/3** se asocia con rutas de activación plaquetaria, infiltración inmune y programas de EMT, integrando el papel de las defensinas derivadas de plaquetas en los procesos transcripcionales que impulsan la agresividad tumoral en el PDAC. **Abreviaturas:** DRPs, *defensin-rich platelets*; PLPs, *platelet-like particles*; PLPs-Ev, *platelet-like particles derivadas de vector vacío*; PDAC, *adenocarcinoma ductal de páncreas*; DEFA1/3, *defensina alfa 1/3*; OS, *overall survival*; TCGA, *The Cancer Genome Atlas*; ssGSEA, *single-sample Gene Set Enrichment Analysis*; EMT, *epithelial–mesenchymal transition*; Nt, *no tratado*; SEM, *error estándar de la media*.

DEFA1/3 y bajo número plaquetario mostraron la peor supervivencia (*log-rank* $p = 0.016$) (Figura 13e).

Adicionalmente, el análisis por **ssGSEA** evidenció correlaciones positivas entre la expresión de **DEFA1/3** y firmas transcriptómicas de plaquetas ($\rho = 0.16$, $p = 0.03$), infiltración de neutrófilos ($\rho = 0.36$, $p = 1 \times 10^{-6}$) y activación de EMT ($\rho = 0.20$, $p = 0.009$) (Figuras 13f–h). Estas asociaciones establecen un vínculo mecánico entre la expresión de **DEFA1/3**, la modulación inmune y la plasticidad tumoral aumentada. En conjunto, estos resultados demuestran que las DRPs inducen la expresión de genes asociados con fenotipos agresivos de PDAC, y que la expresión

elevada de *DEFA1/3* se asocia con mal pronóstico, infiltración inmune y activación del programa EMT en muestras de pacientes.

7.11. CORRELACION DE *SPARC*, *GATA6* Y *KDM6A* CON PROGRAMAS TRANSCRIPCIONALES AGRESIVOS EN LA COHORTE TCGA-PDAC

Con el objetivo de profundizar en los programas moleculares asociados a los genes regulados por las DRPs, se realizó un análisis de correlación entre la expresión de *SPARC*, *GATA6* y *KDM6A* y distintas firmas transcriptómicas vinculadas con invasión, motilidad y EMT en muestras de la cohorte TCGA-PDAC (Figuras 14)

El puntaje de invasión (basado en la actividad de metaloproteinasas de matriz, MMP) mostró una correlación positiva fuerte con *SPARC* ($\rho = 0.821$, $p = 1.9 \times 10^{-44}$), mientras que las asociaciones con *GATA6* ($\rho = -0.212$, $p = 0.0471$) y *KDM6A* ($\rho = -0.083$, $p = 0.276$) fueron débiles o no significativas (Figura 14a-c)

El puntaje de motilidad–integrinas presentó una correlación negativa significativa con *GATA6* ($\rho = -0.306$, $p = 2.81 \times 10^{-5}$) y una correlación positiva robusta con *SPARC* ($\rho = 0.565$, $p = 2.46 \times 10^{-16}$), sin asociación relevante con *KDM6A* ($\rho = -0.0847$, $p = 0.262$) (Figuras 13d–f). De manera similar, el puntaje tipo EMT mostró una correlación positiva marcada con *SPARC* ($\rho = 0.803$, $p = 4.76 \times 10^{-85}$) y una correlación negativa significativa con *GATA6* ($\rho = -0.336$, $p = 4.86 \times 10^{-6}$), mientras que la expresión de *KDM6A* no presentó correlación con las firmas de EMT ($\rho = 0.0042$, $p = 0.956$) (Figuras 13g–i).

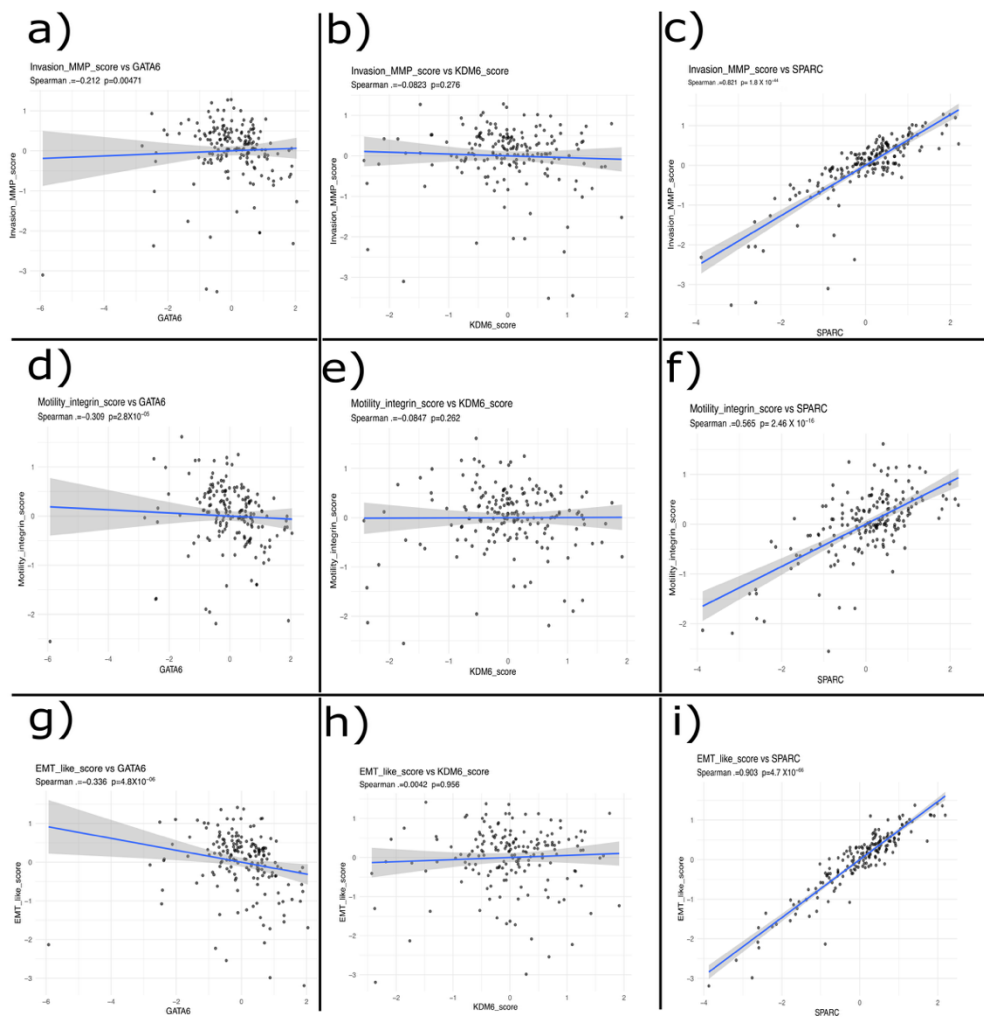


FIGURA 14. CORRELACION DE LOS PROGRAMAS TRANSCRIPCIONALES ASOCIADOS A INVASION, MOTILIDAD Y EMT CON LA EXPRESION DE GATA6, KDM6A Y SPARC EN LA COHORTE TCGA-PAAD

Análisis de correlación de Spearman entre las firmas transcripcionales derivadas de ssGSEA y la expresión de los genes *GATA6*, *KDM6A* y *SPARC* en muestras de PDAC de la cohorte TCGA-PAAD. **(a–c)** Correlaciones entre el puntaje de invasión_MMP y la expresión de *GATA6* ($\rho = -0.212$, $p = 0.0471$), *KDM6A* ($\rho = -0.083$, $p = 0.276$) y *SPARC* ($\rho = 0.821$, $p = 1.9 \times 10^{-44}$). **(d–f)** Correlaciones entre el puntaje de **motilidad_integrina** y la expresión de *GATA6* ($\rho = -0.306$, $p = 2.81 \times 10^{-5}$), *KDM6A* ($\rho = -0.0847$, $p = 0.262$) y *SPARC* ($\rho = 0.565$, $p = 2.46 \times 10^{-16}$). **(g–i)** Correlaciones entre el puntaje tipo **EMT_like** y la expresión de *GATA6* ($\rho =$

-0.336 , $p = 4.86 \times 10^{-6}$), *KDM6A* ($\rho = 0.0042$, $p = 0.956$) y *SPARC* ($\rho = 0.803$, $p = 4.76 \times 10^{-85}$).

En conjunto, los resultados muestran que *SPARC* presenta correlaciones positivas fuertes con los programas de invasión, motilidad y EMT, mientras que *GATA6* exhibe una correlación negativa con las firmas de motilidad y EMT, en concordancia con su función reportada en subtipos menos agresivos de PDAC.

Abreviaturas: EMT, *epithelial–mesenchymal transition*; ssGSEA, *single-sample Gene Set Enrichment Analysis*; TCGA-PAAD, *The Cancer Genome Atlas–Pancreatic Adenocarcinoma*; PDAC, *adenocarcinoma ductal de páncreas*.

En conjunto, estos análisis revelaron que la expresión de *SPARC* se asocia fuertemente con programas transcripcionales invasivos, migratorios y tipo EMT, en concordancia con su función conocida como mediador de la progresión tumoral. Por el contrario, *GATA6* mostró una relación inversa con la motilidad y la activación de EMT, consistente con su rol reportado en subtipos menos agresivos de PDAC.

8. DISCUSION

Las defensinas constituyen una familia diversa de péptidos catiónicos con propiedades antimicrobianas, cuyas funciones trascienden la defensa del huésped e incluyen roles complejos en la biología del cáncer (Lai & Gallo, 2009). En distintos contextos, estas moléculas pueden ejercer efectos pro o antitumorigénicos dependiendo del microambiente y del tipo celular implicado (Bonamy et al., 2018; Li et al., 2024). Aunque las β -defensinas han sido ampliamente estudiadas, el papel de las α -defensinas, particularmente en el PDAC, ha permanecido poco explorado (Bonamy et al., 2018; Li et al., 2024; Ling et al., 2017).

En este trabajo se identificaron la *DEFA1/3* como modulador activo de la agresividad tumoral en PDAC. Se propone que estos péptidos catiónicos, liberados a través de los gránulos plaquetarios, son capaces de reconfigurar el panorama transcripcional de las células tumorales y promover fenotipos malignos, estableciendo así un vínculo mecanístico entre la biología plaquetaria y la progresión tumoral (Fu et al., 2023; K et al., 2024; Xu & Lu, 2020).

El análisis de los datos transcriptómicos de plaquetas de pacientes con PDAC reportados por (Best et al., 2015) reveló una sobreexpresión significativa de

defensinas, junto con la activación de rutas de exocitosis regulada. Para validar funcionalmente estas observaciones, se generó un modelo *in vitro* mediante la diferenciación de células MEG-01, obteniendo DRPs. La exposición de células de PDAC a las DRPs incrementó de manera notable la proliferación, clonogenicidad, migración y crecimiento tridimensional en esferoides, en comparación con las partículas control PLPs-Ev.

Una etapa crítica del modelo fue la optimización del proceso de diferenciación de megacariocitos y liberación de PLPs. Se evaluaron dos estrategias para la diferenciación de este tipo celular con base en literatura previa: VPA y TPO, con el objetivo de determinar las condiciones que produjeran una mayor cantidad de partículas funcionales y morfológicamente estables (Persson et al., 2021; Schweinfurth et al., 2010).

El tratamiento con VPA (0.5–4 mM) mostró una liberación dosis-dependiente de PLPs, con máxima producción a 2 mM, aunque a esta concentración se observaron signos de estrés celular y alteraciones morfológicas en los megacariocitos. Por otro lado, la estimulación con TPO (25–200 ng/mL) promovió una diferenciación fisiológica y sostenida, alcanzando la máxima liberación de PLPs a las 72 h con dosis de 100–200 ng/mL. Estas condiciones resultaron óptimas para mantener la viabilidad celular y la continuidad del proceso de liberación plaquetaria.

La funcionalidad de las PLPs obtenidas bajo inducción con TPO fue confirmada mediante un ensayo de coagulación con CaCl_2 , el cual evidenció la formación de agregados y estructuras fibrilares comparables a las plaquetas derivadas de sangre periférica (Toyoda et al., 2018). Además, la microscopía de campo claro y las tinciones de Giemsa confirmaron la morfología circular y anucleada de las partículas, validando su naturaleza plaquetaria (Budi et al., 2022). En conjunto, estos resultados permitieron establecer un protocolo reproducible, eficiente y libre de contaminación de megacariocitos, que proporcionó una fuente homogénea de PLPs y DRPs para los experimentos funcionales posteriores.

De manera importante, los ensayos de migración realizados bajo condiciones de bloqueo de la replicación de ADN confirmaron que el cierre de la herida no se debía a expansión proliferativa, sino a una mayor capacidad migratoria, lo que sustenta un efecto específico sobre la motilidad celular. Estos resultados son congruentes con la literatura previa que demuestra que las plaquetas facilitan la migración e invasión tumoral mediante la secreción de TGF- β , la inducción de EMT y la adhesión mediada por P-selectina (Antunes-Ferreira et al., 2023; Najafi et al., 2024). Estudios complementarios han mostrado que Panx1 plaquetario promueve la invasión del PDAC, y que la liberación de ATP y ADP facilita la migración transendotelial y la diseminación metastásica (Ge et al., 2021; Karp et al., 2024; Kumar et al., 2024). Nuestros datos amplían este paradigma al implicar a las defensinas derivadas de plaquetas como nuevos efectores del diálogo plaqueta-tumor.

La validación *in vivo* mediante el modelo de xenoinjerto en pez cebra reforzó estos hallazgos, demostrando que el tratamiento con DRPs incrementa la carga tumoral y la diseminación celular, extendiendo el efecto pro-tumorigénico de las defensinas plaquetarias a un microambiente biológicamente más complejo (Chen et al., 2022; Zhong et al., 2025). Este modelo resulta especialmente útil para la visualización en tiempo real de interacciones tumor-plaqueta-microambiente, tales como la invasión, remodelación vascular y evasión inmune (Martinez-Lopez & Lopez-Gil, 2025; Wang et al., 2022). De manera congruente, se ha descrito que la depleción plaquetaria en modelos murinos reduce significativamente la carga metastásica, evidenciando el papel causal de las plaquetas en la diseminación tumoral (Haemmerle et al., 2017; Yu et al., 2014; Zhou et al., 2023). En conjunto, nuestros resultados sustentan que las DRPs actúan no sólo como biomarcadores pasivos, sino como facilitadores activos de la progresión tumoral en PDAC.

A nivel molecular, la exposición a DRPs indujo la sobreexpresión de *SPARC*, *KDM6A* y *GATA6* en las células de PDAC, mientras que *EGR1* permaneció sin cambios. El análisis de la cohorte TCGA-PAAD confirmó la relevancia clínica de

estos hallazgos: una alta expresión de DEFA1/3, combinada con niveles elevados de plaquetas, se asoció con menor supervivencia global y con la activación de firmas transcriptómicas relacionadas con plaquetas, infiltración de neutrófilos y EMT. Aunque estas asociaciones son inherentemente correlativas, su consistencia con los datos funcionales obtenidos refuerza la hipótesis de que las defensas plaquetarias contribuyen activamente a la progresión del PDAC.

La comparación con otros tipos de cáncer subraya la especificidad del patrón observado en PDAC. En hepatocarcinoma y cáncer de mama, *SPARC* se ha vinculado con el remodelado estromal y un pronóstico desfavorable, aunque su papel en la desmoplasia es particularmente dominante en el páncreas (Collisson et al., 2019; Ge et al., 2021; Kumar et al., 2024; Munasinghe et al., 2020). *KDM6A*, con frecuencia mutado en cáncer de vejiga y pulmón, se ha asociado con fenotipos basales agresivos y plasticidad celular en PDAC (Chang et al., 2021; Qiu et al., 2023). Por su parte, *GATA6* participa en la regulación de la diferenciación y define subtipos moleculares con implicaciones pronósticas importantes (Matsumoto et al., 2024; Sivapalan et al., 2022). En contraste, *EGR1*, reconocido como oncogén en cáncer de próstata y pulmón (Ferraro et al., 2005; Virolle et al., 2003), no presentó cambios en este modelo, lo que sugiere una cierta especificidad de programa transcripcional en PDAC inducido por defensas plaquetarias .

Desde el punto de vista metodológico, este estudio presenta varias fortalezas. La integración de un análisis bioinformático exhaustivo, una plataforma renovable derivada de MEG-01 para la generación de DRPs, y la realización de ensayos funcionales complementarios en sistemas 2D, 3D e in vivo, proporcionaron un marco robusto y reproducible. La concordancia entre los resultados transcriptómicos, funcionales y clínicos otorga consistencia interna y relevancia traslacional a las conclusiones.

Sin embargo, también existen limitaciones inherentes al alcance experimental. La confirmación definitiva del papel de DEFA1/3 requeriría el uso de plaquetas

derivadas de pacientes y modelos genéticos en organismos inmunocompetentes, así como la validación de los efectos mediante estrategias de neutralización. Adicionalmente, el modelo de pez cebra, aunque ideal para visualizar la diseminación tumoral en tiempo real, no reproduce completamente la complejidad del sistema inmune humano ni la arquitectura estromal del PDAC. Pese a ello, la coherencia observada entre los experimentos *in vitro* e *in vivo* refuerza la interpretación de que las Defensin-Rich Platelets actúan como moduladores activos del fenotipo pro-tumorigénico.

En conjunto, estos hallazgos posicionan a DEFA1/3 derivadas de plaquetas como componentes funcionales del eje plaqueta-tumor, vinculando el contenido granular plaquetario con la plasticidad epitelial, la infiltración inmune y el remodelado estromal. Este trabajo amplía la comprensión del papel de las plaquetas en la progresión del cáncer de páncreas y ofrece nuevas perspectivas para explorar mecanismos terapéuticos y biomarcadores derivados de su actividad pro-tumoral. Al integrar evidencia correlativa y funcional, este estudio consolida a las defensinas plaquetarias como mediadores y potenciales dianas traslacionales en la progresión del PDAC.

9. CONCLUSIONES

Este estudio aporta evidencia sólida de que las α -defensinas, en particular *DEFA1/3*, desempeñan un papel previamente subestimado en la progresión del PDAC. Aunque la mayor parte de las investigaciones previas se han centrado en las β -defensinas, nuestros resultados destacan la relevancia de las α -defensinas como biomarcadores y moduladores funcionales de la agresividad tumoral.

Mediante el desarrollo de un modelo *in vitro* renovable y estandarizado de producción plaquetaria, demostramos que las defensinas derivadas de plaquetas incrementan de manera significativa la viabilidad, migración, clonogenicidad y crecimiento tridimensional de las células tumorales, reproduciendo fielmente el efecto pro-tumoral observado en plaquetas circulantes.

Los ensayos in vivo en pez cebra confirmaron que las plaquetas enriquecidas en DEFA1/3 favorecen el crecimiento y la diseminación tumoral en un microambiente biológico complejo. A nivel molecular, las DRPs indujeron de forma selectiva la expresión de genes asociados con agresividad tumoral (*SPARC*, *KDM6A*, *GATA6*), vinculados con la EMT y un pronóstico desfavorable.

El análisis de datos clínicos de la cohorte TCGA-PAAD respaldó estos hallazgos, evidenciando que una alta expresión de *DEFA1/3* se asocia con menor supervivencia, infiltración inmune y activación de vías relacionadas con plaquetas y EMT. En conjunto, estos resultados posicionan a las α -defensinas derivadas de plaquetas como efectores claves del eje plaqueta–tumor, con potencial valor como biomarcadores mecanísticos y posibles dianas terapéuticas en el cáncer de páncreas.

10. ANEXO



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Defensin-Rich Platelets Drive Pro-Tumorigenic Programs in Pancreatic Adenocarcinoma

Jonathan Gonzalez-Ruiz ^{1,2}, Miryam Sarmiento-Casas ², Ivan Bahena-Ocampo ¹, Magali Espinosa ², Gisela Ceballos-Cancino ², Karla Vazquez-Santillan ², Vilma Maldonado ³ and Jorge Melendez-Zajgla ^{2,*}

¹ Department of Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City 09310, Mexico; jonalezruiz@gmail.com (J.G.-R.); ivan.bahena@gmail.com (I.B.-O.)

² Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City 14610, Mexico; miryam.mood@gmail.com (M.S.-C.); mespinosa@inmegen.gob.mx (M.E.); gceballos@inmegen.gob.mx (G.C.-C.); kivazquez@inmegen.gob.mx (K.V.-S.)

³ Laboratorio de Epigenética, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City 14610, Mexico; vmaldonado@inmegen.gob.mx

* Correspondence: jmelendez@inmegen.gob.mx; Tel.: +52-5553-501-920; Fax: +52-5553-501-938

Abstract

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive and lethal malignancies, driven by late diagnosis, limited therapeutic options, and high metastatic potential. Beyond their canonical roles in hemostasis, platelets have emerged as active modulators of tumor progression and promising noninvasive biomarkers. Among platelet-associated molecules, α -defensins, particularly Defensin Alpha 1/3 (*DEFA1/3*), have been implicated in inflammation and immunity; however, their contribution to PDAC pathogenesis remains unclear. We combined bioinformatic analysis of platelet transcriptomes with functional and in vivo zebrafish xenograft validation to investigate the impact of *DEFA1/3* on PDAC aggressiveness. *DEFA1/3* was significantly upregulated in PDAC-derived platelets. Defensin-enriched platelet-like particles (defensin-rich platelets, DRPs) and recombinant *DEFA1/3* enhanced pancreatic cancer cell proliferation, migration, and three-dimensional growth in vitro and promoted tumor dissemination in zebrafish xenografts. Transcriptomic profiling revealed the upregulation of *SPARC*, *KDM6A*, and *GATA6*, whereas clinical data from The Cancer Genome Atlas (TCGA)-PDAC linked high *DEFA1/3* expression to poor survival, increased immune infiltration, and activation of epithelial–mesenchymal transition (EMT). Platelet-derived *DEFA1/3* acts as a functional modulator of PDAC progression, linking platelet granule content to tumor aggressiveness and highlighting a potential biomarker and therapeutic target within the platelet–tumor axis.

Keywords: pancreatic cancer; pancreatic cancer; platelets; alpha-defensins; *DEFA1/3*; tumor progression; particles like-platelets; zebrafish xenograft; transcriptomics



Academic Editor: Christos Mikropoulos

Received: 13 October 2025

Revised: 5 November 2025

Accepted: 6 November 2025

Published: 10 November 2025

Citation: Gonzalez-Ruiz, J.; Sarmiento-Casas, M.; Bahena-Ocampo, I.; Espinosa, M.; Ceballos-Cancino, G.; Vazquez-Santillan, K.; Maldonado, V.; Melendez-Zajgla, J. Defensin-Rich Platelets Drive Pro-Tumorigenic Programs in Pancreatic Adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 10898. <https://doi.org/10.3390/ijms262210898>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive malignancies worldwide [1,2]. In 2022, it accounted for an estimated 510,922 new cases and 467,409 deaths, ranking as the sixth leading cause of cancer-related mortality worldwide [3]. Despite advances in surgery and systemic therapies, the overall five-year survival rate remains close to 10%, reflecting only modest improvement compared to the past decade [4]. Projections indicate that the global incidence will continue to rise, with nearly a 95% increase in new cases by 2050, potentially reaching close to 1 million diagnoses annually [5].

Late diagnosis, intrinsic resistance to chemotherapy, and a highly metastatic phenotype contribute to the poor prognosis of this disease [6].

Beyond tumor-intrinsic drivers, there is increasing evidence highlighting the contribution of systemic factors, such as platelets, to cancer progression [7]. Platelets (PLTs) are small anucleate fragments derived from megakaryocytes (Mks) that play canonical roles in hemostasis and thrombosis [8]. However, in cancer, they acquire additional functions; elevated platelet counts are common in patients with PDAC and are associated with poor prognosis, reduced treatment efficacy, and enhanced metastatic potential [9,10]. The concept of tumor-educated platelets (TEPs) has emerged to describe platelets whose RNA and protein cargo are altered by tumor-derived signals. TEPs not only reflect the systemic influence of the tumor but also actively participate in shaping the tumor microenvironment through secreted mediators and intercellular communication [11,12]. For instance, platelet-derived *ITGA2B* RNA has been identified as a robust biomarker for cancer detection, whereas platelet-secreted Transforming growth factor-beta (TGF- β) acts as a potent inducer of epithelial–mesenchymal transition (EMT), thereby directly promoting tumor progression [12,13].

Defensins are cationic antimicrobial peptides that are part of the innate immune defense [14]. Defensins are classified into three major subfamilies: α , β , and θ . Among them, α -defensins, also known as human neutrophil peptides (HNPs), have been implicated in diverse functions beyond antimicrobial activity, including inflammation and cancer [15]. While β -defensins have been extensively studied and θ -defensins are restricted to certain primates, platelet α -defensins remain comparatively understudied. This limited attention stems from both the technical challenges in their detection and their complex dual role: they can exert antimicrobial and immunomodulatory functions that may either suppress or enhance tumor progression, depending on the biological context [16,17]. In contrast to well-characterized platelet factors such as TGF- β , Platelet factor 4 (PF4), and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), the biological role of α -defensins in platelets remains largely unexplored. Importantly, platelets and mks have been shown to express Defensin Alpha 1/3 (*DEFA1/3*) transcripts and proteins, which localize to α -granules and are released upon activation [18], suggesting a previously underappreciated immunomodulatory role of platelet-derived α -defensins in the tumor milieu. Thus, it is conceivable that TEPs may carry defensins as part of their altered cargo, potentially contributing to tumor–platelet crosstalk and metastatic conditioning.

Notably, Best et al. demonstrated that the RNA profiles of TEPs can accurately discriminate cancer patients from healthy individuals, including those with pancreatic cancer [19]. However, whether platelet-derived defensins, particularly *DEFA1/3*, contribute to PDAC progression has not been addressed. To explore this question in a physiologically relevant context, we employed zebrafish (*Danio rerio*) xenografts, a well-established model that enables real-time visualization of human cancer cell migration and reproduces conserved platelet–tumor interactions observed in humans. This study aimed to determine whether platelet-derived *DEFA1/3* contributes to the aggressiveness of PDAC. Specifically, we hypothesized that platelets enriched in *DEFA1/3* promote pro-tumorigenic and pro-migratory programs in PDAC cells. To test this hypothesis, we combined platelet transcriptomic re-analysis, in vitro functional assays, and in vivo zebrafish xenografts. Despite increasing evidence linking platelet-derived factors to tumor progression, the role of platelet defensins in pancreatic cancer biology remains largely unexplored. Here, we report that defensin-rich platelets (DRPs) promote proliferation, migration, and spheroid growth of pancreatic cancer cells, upregulate key aggressiveness-related genes, and are associated with adverse clinical outcomes, supporting the concept that platelet-derived *DEFA1/3* represents a functional

driver for PDAC progression and a candidate for translational exploration as a biomarker or therapeutic target.

2. Results

2.1. Transcriptomic Alterations in PDAC-Derived Platelets

For this study, we re-analyzed the platelet RNA-sequencing dataset originally reported by Best et al., in which circulating platelets were profiled from patients with cancer and healthy donors and subsequently used to train a machine learning algorithm for cancer detection. Rather than focusing on prediction, we curated a subset of this dataset to investigate transcriptional alterations in PDAC. Our analysis included platelets isolated from patients with PDAC ($n = 35$) and healthy controls ($n = 55$). Raw RNA-seq counts from platelet samples were retrieved and processed using the Correlative Analyses of Gene Set Enrichment (CAGE) framework. Counts were normalized to counts per million (CPM) and transformed using voom, enabling variance-stabilized differential expression analysis. This approach revealed a distinct distribution of differentially expressed genes between PDAC-derived platelets and those from healthy donors (Figure 1a), indicating the transcriptional reprogramming of circulating platelets. The heatmap revealed a distinct cluster of genes significantly upregulated in PDAC-derived platelets compared to those from healthy donors, revealing a cancer-specific transcriptional signature. To contextualize these findings, differentially expressed genes were compared with a curated panel of established cancer biomarkers, which revealed a significant overlap of 94 genes (18.8%). Among these, several members of the defensin family, including *DEFA8P* (fold change = 16.87), *DEFA4* (fold change = 11.37), and *DEFA1B* (fold change = 10.14), were consistently overexpressed (Figure 1b). Defensins are well-known mediators of innate immunity and epithelial defense, suggesting a potential role for these molecules in platelet-associated immune modulation within the tumor microenvironment. Gene Ontology (GO) enrichment analysis further highlighted the biological context of these transcriptional changes. The most significantly enriched pathway was regulated exocytosis (GO:0045055), followed by processes related to cellular homeostasis, cytokine production, lymphocyte migration, and negative regulation of leukocyte differentiation. These results underscore the broad alterations in the immune and secretory functions of PDAC-derived platelets. Notably, enrichment was also observed in megakaryocyte development and platelet production pathways, indicating a potential link between tumor progression and hematopoietic modulation (Figure 1c). Together, these findings provide an initial indication that platelet defensins, particularly *DEFA* family members, represent active components of platelet–tumor communication in PDAC, forming the basis for our subsequent functional validation.

2.2. Generation of an In Vitro Model of DRPs

Building on these transcriptomic findings, we sought to determine whether platelet defensins exert functional effects on PDAC biology using a controlled in vitro model. To validate the transcriptomic findings and establish an experimental platform for functional studies, we generated an in vitro model of platelet production (Figure 2a). MEG-01 megakaryoblastic cells were differentiated into Platelet-Like Particles (PLPs) following recombinant human thrombopoietin (TPO; Abcam, Cambridge, UK) stimulation, thereby providing a renewable source of platelet surrogates (Supplementary Figure S1). To specifically assess the role of *DEFA1/3* in platelet biology, MEG-01 cells were genetically modified via lentiviral transduction to stably overexpress *DEFA1/3* (Figure 2b). These cells were subsequently differentiated, yielding two distinct preparations: control Platelet-Like Particles Empty vector (PLP-Ev) and DRPs.

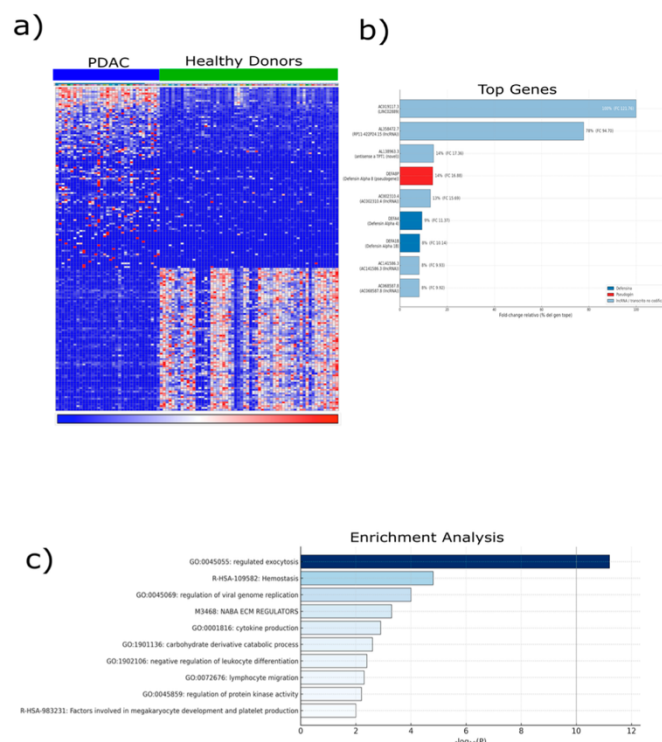


Figure 1. Bioinformatic characterization of transcriptomic alterations in pancreatic cancer. Transcriptomic data were obtained from the GSE68086 dataset, which comprised RNA-seq profiles of platelets from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) ($n = 35$) and healthy controls ($n = 55$). (a) Unsupervised hierarchical clustering of differentially expressed genes ($|\log_2FC| \geq 1$, adjusted $p < 0.05$, Benjamini–Hochberg correction) was performed using the limma R package (v4.3), revealing clear segregation between the PDAC and control platelet transcriptomes. The heatmap color scale represents normalized gene expression levels, where red indicates upregulation and blue indicates downregulation relative to the mean expression across samples. (b) Top ten overexpressed genes in PDAC platelets are shown, highlighting defensin family members (DEFA4, DEFA1B, and DEFA8P) for their strong upregulation and established roles in immune defense and epithelial barrier integrity. (c) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed using the ClusterProfiler (v4.10.1) and fgsea (v1.28.0) R packages with the MSigDB hallmark collection. The normalized enrichment score (NES) reflects the magnitude and direction of gene set over-representation. Nominal p -values and FDR q -values were derived from 10,000 phenotype-based permutations. Collectively, these analyses indicate that the platelet transcriptomes of patients with PDAC exhibit immune and secretory reprogramming, supporting the concept of tumor-educated platelets as active modulators of cancer progression. Data are presented as mean expression $\pm$ S.D., and statistical significance was defined as adjusted $p < 0.05$. Abbreviations: PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; GSEA, Gene Set Enrichment Analysis; NES, normalized enrichment score; RNA-seq, RNA sequencing; DEFA, defensin alpha.

Functional assays demonstrated that PLPs generated in vitro retained biological activity comparable to that of peripheral blood-derived platelets. When co-cultured with BxPC-3 pancreatic cancer cells, PLPs significantly increased cell viability relative to non-treated controls, mirroring the effect observed with donor-derived platelets (Figure 2c). Notably, DRPs had an even greater effect on tumor cell viability, suggesting that *DEFA1/3* enrichment enhances the pro-tumorigenic potential of platelet-derived particles.

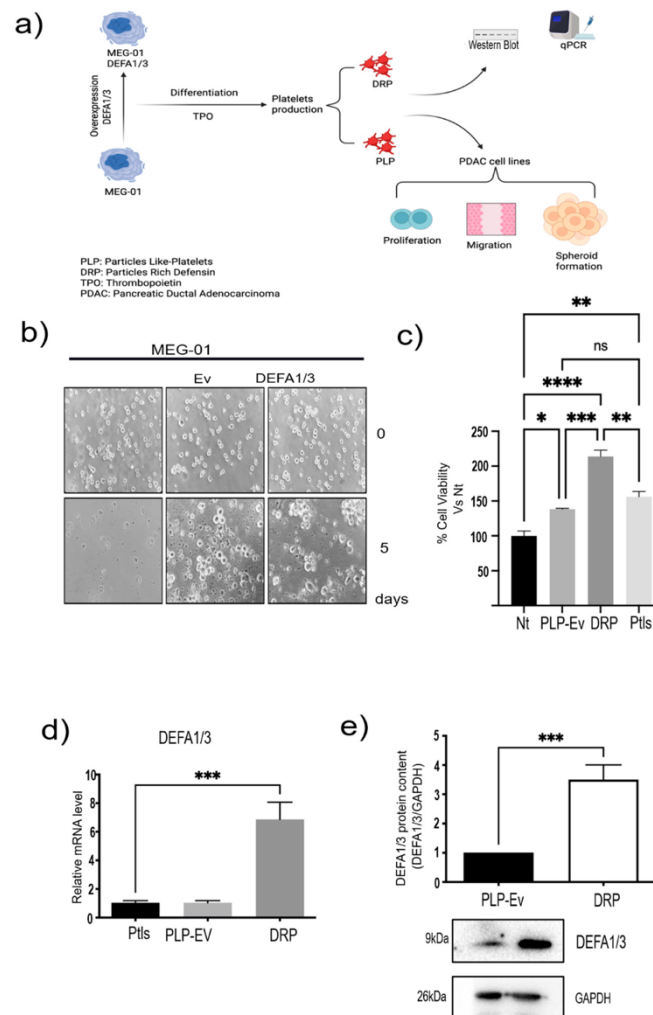


Figure 2. Generation and validation of DRPs and PLPs from MEG-01 cells. **(a)** Schematic overview of the experimental workflow. MEG-01 cells were transduced with lentiviral vectors encoding DEFA1/3 or an empty vector (EV) control and subsequently differentiated to produce platelet-like particles (PLPs) and defensin-rich platelets (DRPs). These particles were used for molecular characterization (qPCR, Western Blot) and functional assays in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell lines, including proliferation, migration, and spheroid formation. **(b)** To generate DRPs, MEG-01 cells were genetically modified to overexpress DEFA1/3 by lentiviral transduction. Viral particles were produced by co-transfecting 293T cells with pLV-IRES-DEFA1/3 (donor vector), pLJM1-GFP (transduction control), psPAX2 (packaging plasmid), and pCMV-VSV-G (envelope protein). Viral supernatants were collected every 12 h for three days and used to transduce MEG-01 cells. Representative micrographs show platelet-like particles released by MEG-01-EV and MEG-01-DEFA1/3 cells (scale bar = 10 μm). **(c)** Cell viability assays were performed after 7 days of co-culture of PDAC cells with PLPs-Ev, DRPs, or peripheral blood-derived platelets (PLTs) to evaluate potential cytotoxicity. **(d)** Relative DEFA1/3 mRNA levels were quantified using qPCR in parental MEG-01, MEG-01-EV, and MEG-01-DEFA1/3 cells. **(e)** Protein expression was confirmed by Western blotting, and densitometric quantification was normalized to GAPDH. Each bar represents the mean ± standard error of the mean (S.E.M.) from at least four independent experiments, each performed in triplicate. Statistical

significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, with significance thresholds defined as * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ and ns = not significant. This model provides a controlled in vitro platform to study how platelet-derived molecules, such as DEFA1/3, influence pancreatic cancer cell behavior, mimicking the functional interactions observed in circulating platelets in patients. Abbreviations: PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; DEFA1/3, Defensin Alpha 1/3; DRPs, defensin-rich platelets; PLPs, platelet-like particles; EV, empty vector; PLTs, platelets; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; WB, Western blotting; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Nt, non-treated control; S.E.M., standard error of the mean.

Molecular validation confirmed that the DRPs contained significantly elevated levels of DEFA1/3. Quantitative PCR (qPCR) analysis revealed robust increases in DEFA1/3 mRNA compared to PLP-Ev and peripheral blood platelets, while Western blot analysis of in vitro-differentiated PLPs and DRPs corroborated these findings at the protein level, confirming higher DEFA1/3 content in DRPs (Figure 2d,e). Collectively, these results establish a reliable in vitro model of platelet production. As an initial validation, we tested the direct effect of recombinant human DEFA1/3 on the viability of several pancreatic cancer cell lines. Increasing concentrations of DEFA1/3 protein resulted in a dose-dependent increase in cell viability in BxPC-3, AsPC-1, and Capan-2 cells, with significant effects observed at concentrations ≥ 100 ng/mL (Supplementary Figure S2). These results support the hypothesis that DEFA1/3 enhances tumor cell growth and provide a rationale for subsequent experiments using DRPs. These results validated the transcriptomic observations and established a mechanistic framework to test whether DRPs modulate cancer cell migration and aggressiveness.

2.3. DRPs Enhance the Migratory Capacity of Pancreatic Cancer Cells

Given the established link between platelet activation and tumor dissemination, we assessed whether DRPs influence the migratory behavior of PDAC cells. Next, we investigated the impact of DRPs on the migratory capacity of pancreatic cancer cells. BxPC-3 and AsPC-1 cells were cultured in Ibidi® chamber inserts to generate standardized wounds and were subsequently treated with control PLP-Ev or DRPs. To exclude the contribution of cell proliferation, all assays were performed in the presence of the Deoxyribonucleic Acid (DNA) synthesis inhibitor Ara C (15 μ M). Representative phase-contrast images captured at baseline (T0) and after 72 h revealed accelerated wound closure in DRP-treated cultures compared to in the non-treated and PLP-Ev groups (Figure 3a,b). Quantification of the uncovered wound area confirmed that DRP treatment significantly enhanced the migratory capacity of both AsPC-1 and BxPC-3 cells (Figure 3c,d). Notably, BxPC-3 cells treated with DRPs exhibited near-complete wound closure within 72 h, underscoring the potent pro-migratory effect of the DRPs particles. Collectively, these findings indicate that DRPs provide a strong stimulus for pancreatic cancer cell migration, independent of cell proliferation.

2.4. DRPs Promote Proliferation, 3d Spheroid Growth, and Clonogenic Potential in Pancreatic Cancer Cells

As enhanced migration is often accompanied by increased proliferative and survival capacity, we investigated whether DRPs also promote PDAC cell growth and long-term expansion. These findings strongly support the notion that DRPs exert pro-tumorigenic effects. To further investigate this hypothesis, we performed complementary assays using BxPC-3 pancreatic cancer cells. First, a cell proliferation assay was conducted 72 h after treatment with DRPs or control PLPs. DRPs significantly increased cell proliferation compared to non-treated and PLP-Ev conditions (Figure 4a), indicating that DEFA1/3 enrichment enhances the proliferative support provided by platelet-like particles.

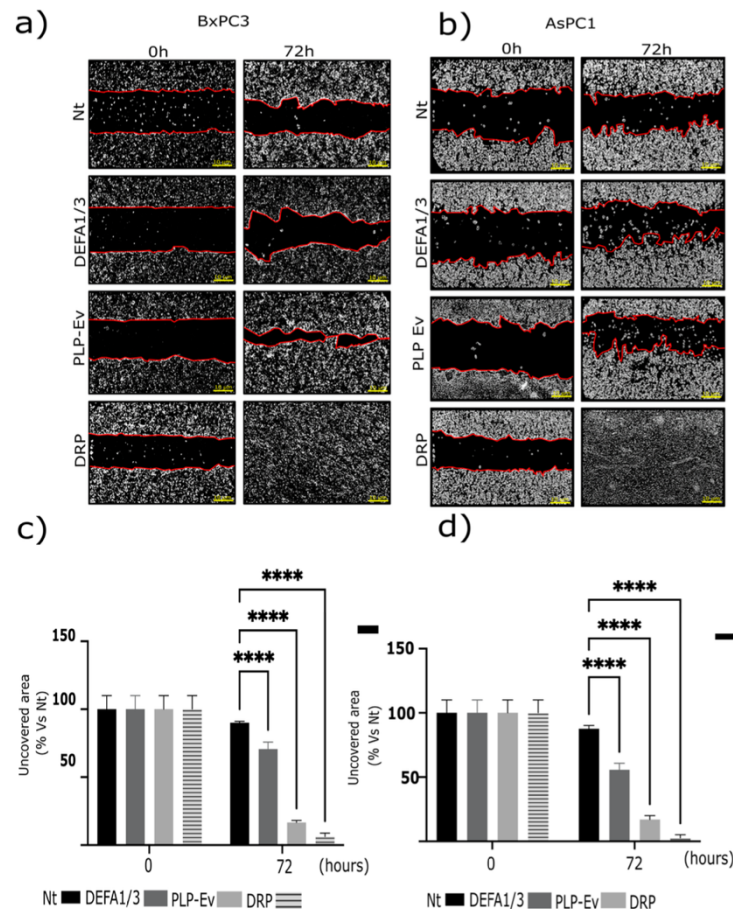


Figure 3. DRP promotes the migratory capacity of pancreatic cancer cell lines. The effects of defensin-rich platelets (DRPs) and recombinant human DEFA1/3 on cell migration were evaluated in AsPC-1 and BxPC-3 pancreatic cancer cells using a wound-healing assay. Cells were seeded in Ibidi® culture-insert 2-well chambers and grown until they reached confluence. The inserts were then removed to create a defined cell-free gap (“wound”), and wound closure was monitored at baseline (T_0) and after 72 h of incubation in a serum-free medium supplemented with 5 μ M cytosine arabinoside (Ara-C) to inhibit proliferation. **(a,b)** Representative phase-contrast images showing wound closure at T_0 and 72 h for BxPC-3 **(a)** and AsPC-1 **(b)** cells treated with non-treated control (Nt), recombinant DEFA1/3 (100 ng/mL), PLP-Ev, or DRPs. Red lines indicate the wound edges used to delineate the uncovered area for quantification. Scale bar = 10 μ m. **(c,d)** Quantification of wound closure, expressed as the percentage of uncovered wound area relative to Nt at T_0 for BxPC-3 **(c)** and AsPC-1 **(d)** cells. Patterned gray bars represent DRP-treated conditions in panel **(c,d)**. Migration was quantified using the ImageJ software version 1.53t (NIH). Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent biological replicates, each performed in triplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey’s post hoc test, comparing each treatment between T_0 and 72 h. Significance levels: **** $p \leq 0.0001$ vs. Nt. These findings indicate that defensin-enriched platelet-like particles promote cancer cell motility independently of cell proliferation, which is a hallmark of platelet-mediated tumor dissemination. Abbreviations: DRPs, defensin-rich platelets; PLPs, platelet-like particles; PLP-EV, empty vector-derived PLPs; DEFA1/3, Defensin Alpha 1/3; Nt, non-treated control; Ara-C, cytosine β -D-arabinofuranoside; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; S.E.M., standard error of the mean.

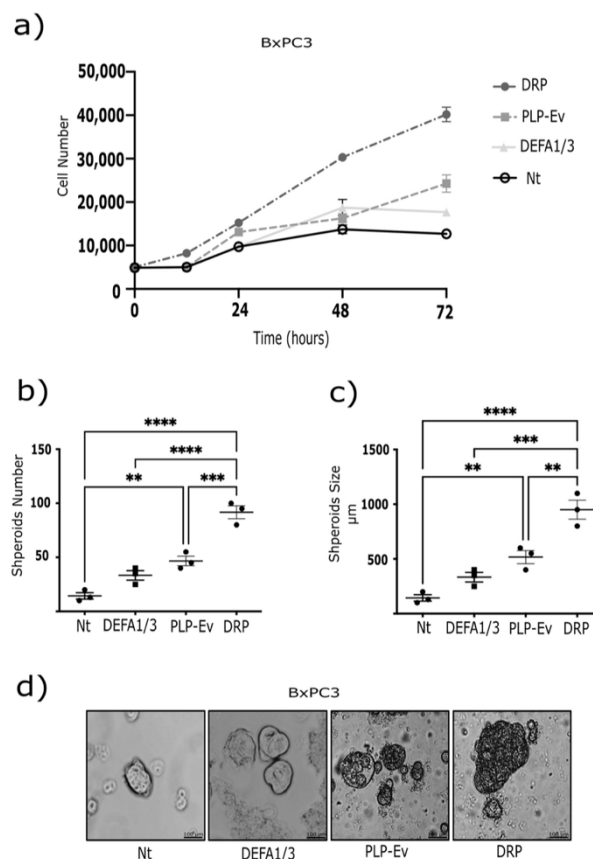


Figure 4. DRP enhances spheroid formation and proliferation of pancreatic cancer cells. (a) BxPC-3 cell proliferation was evaluated using the CCK-8 assay. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of at least four independent experiments performed in triplicates. Statistical differences were assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$ vs. Nt). (b) BxPC-3 cells grown as monolayers were seeded in Petri dishes coated with a thin layer of 2% agarose and cultured for one week. Spheroids were then transferred to a rotary incubator at 37 °C in Leibovitz's L-15 medium without fetal bovine serum (FBS) and treated with DRPs or PLPs-Ev. (c) The spheroid number and size were quantified using ImageJ. Each data point represents an independent experiment; data are expressed as median $\pm$ S.E.M. from at least three independent experiments conducted in triplicate. $p \leq 0.01$ vs. Nt, by ANOVA with Tukey's post hoc test. (d) Representative phase-contrast micrographs of spheroids (scale bar = 100 μ m). The observed increase in spheroid size and number suggests that DRPs reinforce three-dimensional tumor growth and survival, consistent with the pro-tumorigenic role of platelet-derived factors in PDAC. Abbreviations: DRPs, defensin-rich platelets; PLPs, platelet-like particles; PLPs-EV, empty vector-derived PLPs; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; Nt, non-treated control; CCK-8, Cell Counting Kit-8; FBS, fetal bovine serum; S.E.M., standard error of the mean.

Next, we evaluated the three-dimensional growth capacity using a spheroid formation assay. BxPC-3 cells were cultured under non-adherent conditions and treated with recombinant DEFA1/3 protein, DRPs, or control agents for 10 days. By day 5, both DEFA1/3- and DRP-treated cultures exhibited a marked increase in spheroid number compared to untreated cells, with DRPs showing the strongest effect (~50% increase) (Figure 4b,c). In addition, spheroids formed under either DEFA1/3 or DRP treatment displayed a significant

increase in size, with mean diameters approximately 30% larger than those observed in the control groups (Figure 4d). Together, these results demonstrate that DRPs promote both proliferation and sustained three-dimensional tumor growth, further underscoring their pro-tumorigenic potential. To further evaluate the long-term proliferative potential conferred by DRPs, clonogenic assays were performed in BxPC-3, AsPC-1, and Capan-2 cells using crystal violet staining. DRP treatment significantly increased the number and density of colonies in all three cell lines, although the effect was less pronounced in Capan-2 cells (Figure 5a–c). Altogether, these results demonstrate that DRPs not only enhance short-term proliferation but also sustain three-dimensional growth and clonogenic capacity across multiple PDAC cell lines, reinforcing their role as potent pro-tumorigenic modulators of PDAC cells.

To assess whether these effects were mediated by direct interactions with platelet-like particles or soluble factors released into the culture medium, cells were exposed to conditioned media obtained from PLP-Ev and DRP cultures. Interestingly, the DRP-conditioned medium induced a moderate but consistent increase in colony formation across all three cell lines, albeit to a lesser extent than that observed with direct DRP treatment. These findings suggest that *DEFA1/3* is not only retained within platelet-like structures but also released into the extracellular environment, where it contributes to the pro-tumorigenic activity of DRPs.

2.5. DRPs Enhance Tumor Growth and Dissemination In Vivo

To verify whether the pro-tumorigenic effects of DRPs observed in vitro translate to a living system, we extended our analysis using a zebrafish xenograft model of human cancer. To extend these in vitro findings to an in vivo context, we employed a zebrafish xenograft model. BxPC-3 pancreatic cancer cells pretreated with PLP-Ev or DRPs were injected into the yolk sac of zebrafish embryos at 2 days post-fertilization. Following incubation, control PLP-Ev-treated cells formed larger tumor masses than the untreated controls and exhibited evidence of migration beyond the injection site. Notably, DRP-treated cells generated larger tumor volumes and displayed significantly enhanced migratory behavior, as evidenced by the dissemination of fluorescent cells to distal regions, including the head and tail (Figure 6a). Although representative images may not fully capture the extent of cellular density within the yolk sac owing to technical variability in fluorescence acquisition, quantitative analysis confirmed that the DRP-treated xenografts exhibited the greatest tumor volumes and dissemination levels.

Consistently, quantification of tumor burden and migratory spread confirmed that DRP treatment significantly increased both tumor volume and the number of disseminated cells relative to the controls (Figure 6b,c). These results validate the in vitro data and demonstrate that DRPs not only promote pancreatic cancer cell growth but also enhance their invasive potential in vivo. Collectively, these functional studies consistently demonstrate that DRPs confer a strong pro-tumorigenic advantage to pancreatic cancer cells. Across multiple experimental platforms, including proliferation and clonogenicity assays, wound healing migration assays, three-dimensional spheroid cultures, and zebrafish xenografts, DRP treatment consistently enhanced tumor cell viability, migratory capacity, and invasive growth. Importantly, these effects were more pronounced than those observed with control PLPs or platelet-conditioned medium, indicating the effect of *DEFA1/3* enrichment on platelet-derived particles.

Collectively, these findings highlight DRPs as potent modulators of pancreatic cancer progression and provide a robust functional framework for subsequent molecular and clinical analyses of DRPs. These in vivo data support our mechanistic findings, demonstrating that *DEFA1/3*-enriched platelets potentiate PDAC aggressiveness across biological scales.

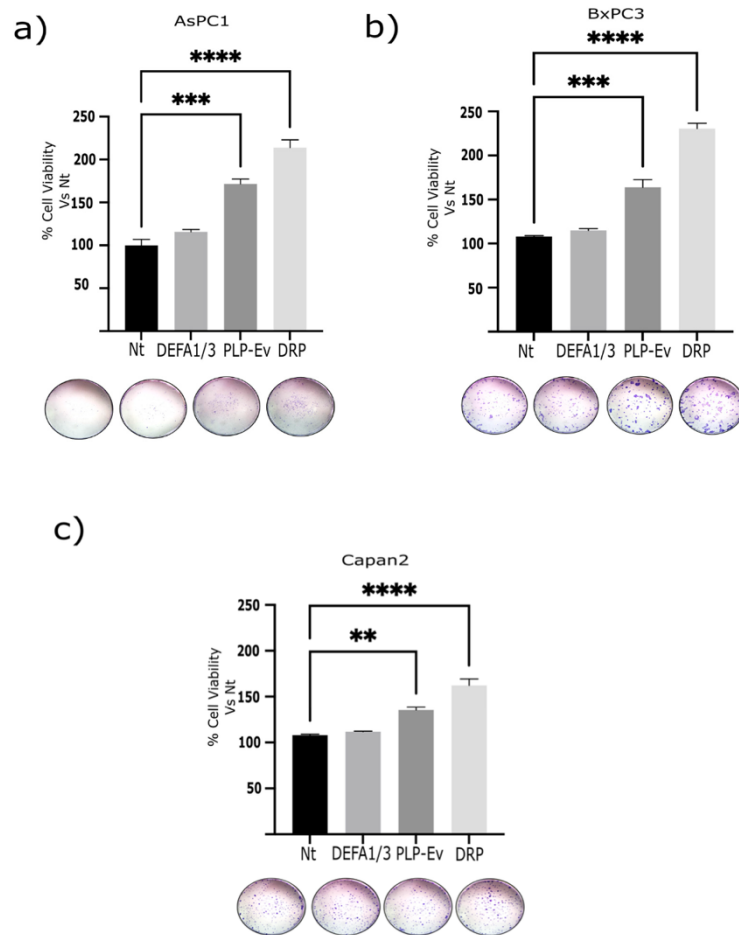


Figure 5. Serial clonogenicity assays demonstrated enhanced self-renewal capacity upon DRP treatment. Schematic representation of the serial clonogenic assay. PDAC cells (BxPC-3, AsPC-1, and Capan-2) were seeded at low density, treated with Nt, DEFA1/3, PLP-Ev, or DRPs, and allowed to form colonies for 10–14 days. Colonies (>50 cells) were fixed, stained with 0.05% crystal violet, trypsinized, and re-plated at clonal density for two additional passages (P2–P3) to evaluate self-renewal capacity. Colonies were then trypsinized, re-plated at clonal density, and cultured for an additional 10–14 days post seeding. (a–c) Quantification of colony numbers across serial passages. DRP-treated cells retained significantly higher clonogenic capacity across passages compared to the Nt and PLP-Ev groups. Representative crystal violet–stained images of colonies at passage 3. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. from three independent experiments, each performed in triplicate. Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA followed by Tukey’s post hoc test, with significance thresholds defined as $** p \leq 0.01$, $*** p \leq 0.001$, and $**** p \leq 0.0001$. Representative images of crystal violet–stained colonies are shown for passage 3. Representative images captured using a stereomicroscope (non-calibrated magnification). Scale is not shown due to variability in optical zoom. The enhanced clonogenic potential following DRP exposure suggests that platelet-derived defensins may contribute to tumor cell persistence and regenerative capacity. Abbreviations: PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; DRPs, defensin-rich platelets; PLPs, platelet-like particles; PLPs-EV, empty vector–derived PLPs; DEFA1/3, Defensin Alpha 1/3; Nt, non-treated control; S.E.M., standard error of the mean.

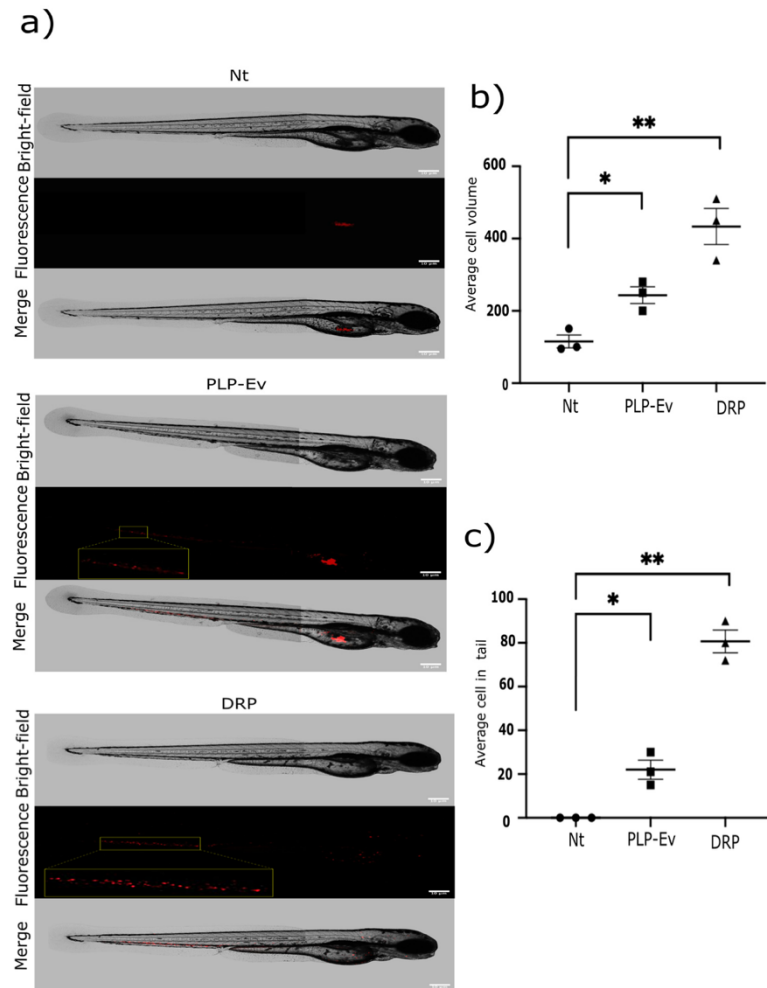


Figure 6. DRP enhances in vivo migration in a zebrafish model. In vivo migration assay of BxPC-3 cells in zebrafish embryos. An in vivo migration assay of BxPC-3 pancreatic cancer cells was conducted using zebrafish embryos as a xenograft model. (a) Representative images of 2-day-old embryos at 24 h post-injection (hpi) with ~300 BxPC-3 cells previously treated with DRPs or PLP-Ev. Images are shown in bright-field (top), epifluorescence (middle), and merged (bottom) views. Red fluorescence indicates the location of human pancreatic cancer cells within the embryos. Scale bar = 100 μm . (b) Quantification of the total fluorescent area (spheroid volume) and (c) the number of disseminated fluorescent cells located outside the yolk sac were measured using FIJI-ImageJ software version 1.54p. Data are presented as the mean $\pm$ SD from three independent experiments, each including at least 20 embryos per condition. Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, with significance thresholds defined as * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. Zebrafish xenografts provide a dynamic model for visualizing tumor-platelet interactions in vivo, and the results confirmed that DRP-treated cells displayed increased invasiveness and dissemination potential. Abbreviations: DRPs, defensin-rich platelets; PLPs, platelet-like particles; PLPs-EV, empty vector-derived PLPs; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; Nt, non-treated control; hpi, hours post-injection; S.D., standard deviation.

2.6. DRPs Induce Transcriptional Reprogramming in PDAC Cells

Having established that *DEFA1/3*-enriched platelets promote PDAC growth and dissemination in vivo, we next examined whether these effects were mirrored at the molecular level and reflected in patient-derived transcriptomic data from the TCGA database. To mechanistically link our experimental observations with clinical and transcriptomic evidence, we performed an integrated in vitro and in silico analysis of the data. (Figure 7a–d) qPCR analysis showed that DRP-treated BxPC-3 cells exhibited a significant upregulation of *SPARC*, *KDM6A*, and *GATA6* compared to the Nt group ($p < 0.001$), while no significant changes were observed in *EGR1* expression. These results suggest that DRPs selectively activate transcriptional programs associated with the migratory and invasive potential of PDAC.

To assess the clinical relevance of these observations, we analyzed OS in the TCGA-PDAC cohort stratified by high/low *DEFA1/3* expression and platelet counts. Patients with low *DEFA1/3* and high platelet levels exhibited the most favorable outcomes, whereas those with high *DEFA1/3* and low platelet levels exhibited the poorest survival (log-rank $p = 0.016$) (Figure 7e). ssGSEA analysis further demonstrated that *DEFA1/3* expression positively correlated with platelet signatures ($\rho = 0.16$, $p = 0.03$), neutrophil infiltration ($\rho = 0.36$, $p = 1 \times 10^{-6}$), and EMT activation ($\rho = 0.20$, $p = 0.009$) (Figure 7f–h). These associations provide a mechanistic link between *DEFA1/3* expression, immune modulation, and enhanced tumorigenic plasticity.

Collectively, these findings demonstrate that DRPs induce the expression of genes linked to aggressive PDAC phenotypes and that DRPs expression is associated with poor prognosis, immune cell infiltration, and EMT activation in patient datasets.

2.7. Correlation of *SPARC*, *GATA6*, and *KDM6A* with Aggressive Transcriptional Programs in TCGA-PDAC

To further explore the molecular programs associated with DRP-regulated genes, we analyzed the correlations between *SPARC*, *GATA6*, and *KDM6A* expression and transcriptional signatures related to invasion, motility, and EMT in TCGA-PDAC samples. (Supplementary Figure S3a–c) Invasion-related MMP score showed a strong positive correlation with *SPARC* ($\rho = 0.821$, $p = 1.9 \times 10^{-44}$), whereas only weak or non-significant associations were observed with *GATA6* ($\rho = -0.212$, $p = 0.0471$) and *KDM6A* ($\rho = -0.083$, $p = 0.276$) (Supplementary Figure S3d–f). Motility-integrin score was significantly negatively correlated with *GATA6* ($\rho = -0.306$, $p = 2.81 \times 10^{-5}$) and strongly positively correlated with *SPARC* ($\rho = 0.565$, $p = 2.46 \times 10^{-16}$), while no significant correlation was found for *KDM6A* ($\rho = -0.0847$, $p = 0.262$). (Supplementary Figure S3g–i) EMT-like score also showed a robust positive correlation with *SPARC* ($\rho = 0.803$, $p = 4.76 \times 10^{-85}$) and a significant negative correlation with *GATA6* ($\rho = -0.336$, $p = 4.86 \times 10^{-6}$), whereas *KDM6A* expression did not correlate with EMT signatures ($\rho = 0.0042$, $p = 0.956$).

Overall, these analyses revealed that *SPARC* expression was strongly associated with invasive, motile, and EMT-like transcriptional programs, consistent with its role as a mediator of tumor progression, whereas *GATA6* showed an inverse relationship with motility and EMT, in line with its reported function in less aggressive PDAC subtypes. Together with our functional results, these correlations suggest that DRPs rewire transcriptional programs associated with invasion and plasticity, supporting the central hypothesis that platelet-derived *DEFA1/3* promotes pro-tumorigenic reprogramming in PDAC.

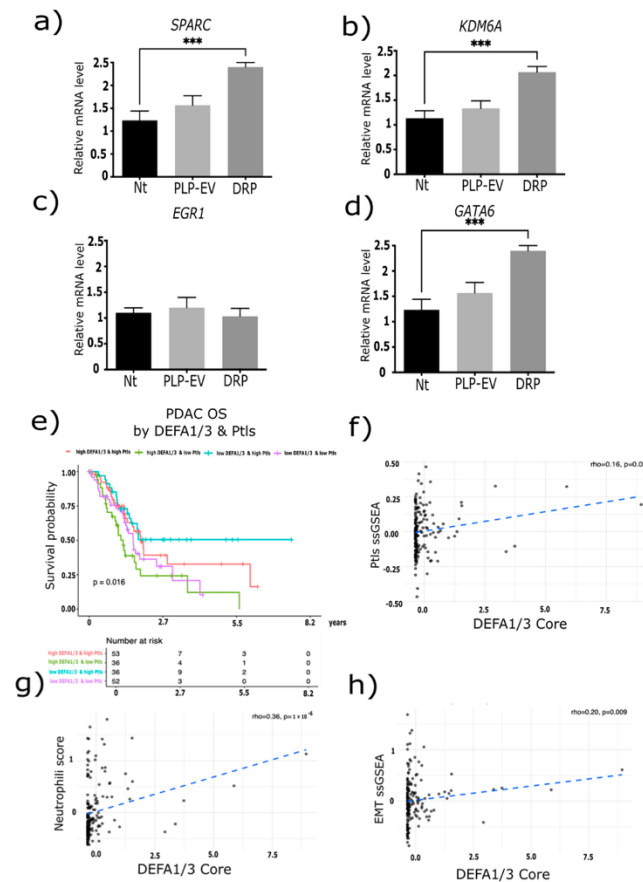


Figure 7. DRP modulates the gene expression in pancreatic cancer cells. BxPC-3 pancreatic cancer cells were treated with defensin-rich platelets (DRPs) or control platelet-like particles (PLPs-EV), and the mRNA expression levels of (a) *SPARC*, (b) *KDM6A*, (c) *EGR1*, and (d) *GATA6* were quantified using RT-qPCR. Data are presented as relative mRNA expression normalized to GAPDH, expressed as the mean $\pm$ S.E.M. from three independent experiments, each performed in triplicate. Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, with significance thresholds defined as *** $p \leq 0.001$. (e) Kaplan–Meier survival analysis of overall survival (OS) in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) from the TCGA-PAAD cohort ($n = 177$), stratified by high/low *DEFA1/3* expression and high/low platelet counts. Patients with low *DEFA1/3* and high platelet levels showed the most favorable outcomes, whereas those with high *DEFA1/3* and low platelet levels had the poorest OS (log-rank test, $p = 0.016$). (f–h) the *DEFA1/3* expression showed positive correlations with (f) platelet-related pathways ($\rho = 0.16$, $p = 0.03$), (g) neutrophil infiltration ($\rho = 0.36$, $p = 1 \times 10^{-6}$), (h) and epithelial–mesenchymal transition (EMT) activation ($\rho = 0.20$, $p = 0.009$). The blue dashed line represents the linear regression fit between *DEFA1/3* expression and each indicated pathway signature. Together, these molecular and clinical analyses revealed that *DEFA1/3* expression is associated with pathways linked to platelet activation, immune cell infiltration, and EMT, integrating platelet-derived defensins into the transcriptional programs driving PDAC aggressiveness. Abbreviations: DRPs, defensin-rich platelets; PLPs, platelet-like particles; PLPs-EV, empty vector-derived PLPs; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; *DEFA1/3*, Defensin Alpha 1/3; OS, overall survival; TCGA, The Cancer Genome Atlas; ssGSEA, single-sample Gene Set Enrichment Analysis; EMT, epithelial–mesenchymal transition; Nt, non-treated control; S.E.M., standard error of the mean.

3. Discussion

Defensins are a diverse family of cationic antimicrobial peptides whose functions extend beyond host defense into cancer biology, where they display context-dependent pro- or antitumorigenic effects [20]. Although β -defensins have been studied more extensively, the roles of α -defensins, particularly in PDAC, remain comparatively underexplored [21–23]. In this study, we identified platelet-derived α -defensins (DEFA1/3) as active modulators of PDAC aggressiveness. We propose that these cationic peptides, delivered via platelet granules, reshape the transcriptional landscape of cancer cells to promote malignant phenotypes, thereby providing a mechanistic link between platelet biology and tumor progression [14,15,24]. Although our analyses revealed strong associations between platelet-derived defensins and PDAC aggressiveness, these correlations alone do not establish causality. Therefore, we combined bioinformatic inference with functional experiments to directly assess the biological impact of these mutations.

Re-analysis of platelet RNA-seq data from PDAC patients by Best et al. [19] revealed defensins among the most upregulated transcripts, alongside the enrichment of regulated exocytosis pathways. To functionally validate these observations, we generated DEFA1/3-rich platelet-like particles using MEG-01 cells. Exposure to DRPs increased proliferation, clonogenicity, migration, and three-dimensional spheroid growth in multiple PDAC cell lines. Importantly, migration assays performed under DNA replication blockade confirmed that wound closure reflected enhanced motility rather than proliferative expansion of cells. These results align with established literature demonstrating that platelets facilitate tumor cell migration and invasion through mechanisms such as TGF- β secretion, induction of EMT, and P-selectin-mediated adhesion [1,19,25]. Additional studies have shown that platelet Panx1 drives PDAC cell invasion and that the release of nucleotides adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP) facilitates transendothelial migration and metastatic spread [26–28]. Our data extend these paradigms by implicating platelet-derived defensins as potent effectors of platelet–tumor cross-talk.

In vivo validation using zebrafish xenografts further demonstrated that DRP treatment increased tumor burden and dissemination, confirming that the pro-tumorigenic activity of platelet-derived defensins extends into a complex microenvironment [29,30]. Zebrafish models are particularly suited for real-time visualization of tumor–platelet–microenvironment interactions, such as invasion, vascular remodeling, and immune escape [29,31,32]. Consistent with prior reports, platelet depletion in murine models reduces the metastatic burden [33–35], highlighting the causal role of platelets in dissemination. Together, these results support the view that DEFA1/3-rich platelets act not only as passive biomarkers but also as active facilitators of PDAC progression.

At the molecular level, DRP exposure selectively upregulated *SPARC*, *KDM6A*, and *GATA6* transcripts in PDAC cells, whereas *EGR1* levels remained unchanged. Analysis of TCGA-PDAC confirmed clinical relevance, showing that high DEFA1/3 expression combined with elevated platelet counts correlated with poorer overall survival and was associated with platelet signatures, neutrophil infiltration, and EMT activation. These transcriptomic and survival associations are inherently correlative; however, their consistency with our mechanistic data reinforces the notion that platelet-derived defensins contribute to PDAC progression. Comparisons with other cancers underscore the specificity of these findings to PDAC. *SPARC* has been linked to stromal remodeling and poor prognosis in hepatocellular carcinoma and breast cancer, but its role in desmoplasia is particularly pronounced in PDAC [26,36–38]. *KDM6A*, frequently mutated in bladder and lung cancers [39,40], has been associated with lineage flexibility and aggressive basal-like phenotypes in PDAC [41,42]. *GATA6*, known to regulate differentiation in gastric and colorectal cancers, plays a defining role in PDAC subtype stratification with major prognostic

implications [43,44]. In contrast, *EGR1*, an oncogenic driver in prostate and lung cancers, did not change [45,46] in our system, indicating a more PDAC-specific transcriptional program activated by platelet-derived defensins.

Strengths and Limitations

This study has several strengths: (i) a rigorous bioinformatic re-analysis that anchors the work in publicly available evidence; (ii) a renewable MEG-01-derived platelet platform that yields standardized DRPs and enables reproducibility; (iii) orthogonal functional assays spanning 2D and 3D systems; (iv) in vivo validation to confirm biological relevance; and (v) correlative analyses across patient datasets that connect the mechanism to the clinical context. This multi-layered, cross-validated design substantially enhanced the robustness, internal consistency, and translational relevance of our conclusions.

The limitations are modest and primarily relate to scope: confirmation with patient-derived platelets would further cement physiological relevance; direct causality for *DEFA1/3* is best addressed with genetic or neutralization strategies in immunocompetent mammalian models; and bulk RNA-seq can be influenced by stromal content and systemic inflammation. Although the zebrafish xenograft model is advantageous for real-time visualization of tumor cell dissemination and drug-free microenvironmental interactions, it does not fully recapitulate the complexity of the human immune system or the stromal context of pancreatic tumors. Moreover, quantification of fluorescent cell migration, although standardized and performed under blinded conditions, remains semi-quantitative and restricted to short-term observations (24 h post-injection). Finally, the relatively small number of biological replicates inherent to in vivo zebrafish assays may introduce experimental variability. Despite these constraints, the concordance between our in vitro and in vivo findings strengthens the interpretation that Defensin-Rich Platelets actively promote pro-tumorigenic phenotypes in PDAC. These points outline clear next steps and do not detract from the core findings of this study.

Taken together, our data position platelet-derived *DEFA1/3* as active contributors to the malignant PDAC phenotype. By linking platelet granule cargo with epithelial plasticity, immune infiltration, and stromal remodeling, we provide evidence that tumor-educated platelets function as mediators, not mere bystanders, of tumor progression, broadening the current understanding of the platelet–tumor axis and highlighting actionable avenues for mechanistic and translational follow-up. By integrating correlative and functional evidence, our study delineates the role of platelet defensins as both biomarkers and active modulators of tumor behavior.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture

The human 293T, AsPC-1, BxPC-3, Capan-2, and MEG-01 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). All cell lines were authenticated by the ATCC. Cells were cultured according to the ATCC recommendations. 293T cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; ATCC 30-2002) supplemented with 10% (*v/v*) FBS (Gibco, Cat. No. 16000044; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% penicillin–streptomycin (10,000 U/mL; Cat. No. 15140122. Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). AsPC-1, BxPC-3, and MEG-01 cells were cultured in RPMI-1640 medium (ATCC 30-2001) containing 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin. Capan-2 cells were cultured in McCoy's 5A medium (ATCC 30-2007) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ and passaged every 2–3 days to maintain exponential growth. For all experiments, cells were used between passages 5

and 20 to ensure consistency. Before treatment, cells were plated in T-75 flasks (Corning, Corning, NY, USA) or 6-well plates (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and allowed to adhere overnight. The following day, the culture medium was replaced with a serum-free medium for 12 h to synchronize growth and minimize serum-derived variability. For defensin stimulation assays, cells were treated with recombinant human Defensin Alpha 1/3 (DEFA1/3; Abcam, Cambridge, UK, Cat. #ab97409) at a final concentration of 100 ng/mL for 72 h. Control (non-treated; Nt) cultures received the vehicle alone under identical conditions. All treatments were performed in biological triplicates, and each experiment was independently repeated at least three times to ensure reproducibility. All cell lines were mycoplasma-free.

4.2. Sample Classification

To classify the platelet transcriptomic profiles of patients and controls, we implemented a Support Vector Machine (SVM) algorithm using the *e1071* R package (v1.7-13) within R version 4.3.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Normalized RNA-seq expression matrices were imported into R, and low-abundance genes (CPM < 1 in >80% of samples) were filtered out to reduce noise. The remaining transcripts were log₂-transformed and scaled to zero mean and unit variance before model training. In the classification procedure, the SVM algorithm projected each sample into a high-dimensional feature space, where each axis represented a transcript. The position of a given sample along each axis corresponds to the normalized expression value of that gene. A One-Versus-One (OVO) strategy was applied to handle multiclass classification. In this approach, a separate binary SVM model is trained for each pair of classes, and the final class assignment for a given sample is determined by majority voting across all pairwise classifiers. The kernel function used was the radial basis function (RBF), which efficiently captures the nonlinear relationships between gene expression profiles. The cost (C) and gamma (γ) parameters were optimized using a 10-fold cross-validation within a grid search framework (*tune.svm* function). To evaluate the model performance, we used accuracy, F1-score, and area under the ROC curve (AUC), which were computed using the *caret* (v6.0-94) and *pROC* (v1.18.5) R packages. The misclassification error was assessed using confusion matrices generated from the withheld test samples (20% of the dataset, randomly selected). All analyses were conducted using reproducible R scripts, and the random seed was fixed at *set.seed* (1234) to ensure consistent classification results.

4.3. Differentiation of Mks (MEG-01) Cells into Platelet-like Particles

To obtain PLPs, MEG-01 megakaryoblast cells were differentiated *in vitro* following an optimized protocol adapted from Risitano et al., 2012 [47] with minor modifications. Briefly, MEG-01 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/mL in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Recombinant human thrombopoietin (TPO) (PeproTech No. 300-18; Rocky Hill, NJ, USA) was added to the cultures at a final concentration of 100 ng/mL, and the cells were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. The differentiation process spanned 7 days, during which fresh TPO (100 ng/mL) was added every third day to sustain the megaryocytic maturation and proplatelet formation. Cell morphology was monitored daily using phase-contrast microscopy to confirm the appearance of cytoplasmic extensions and platelet-like protrusions. Following the differentiation period, the PLPs were purified using a stepwise centrifugation protocol. The cultures were centrifuged at $100 \times g$ for 5 min to remove intact cells. The supernatant was carefully transferred and centrifuged again at $150 \times g$ for 15 min to eliminate larger debris and fragments. Finally, PLPs were pelleted by centrifugation of the resulting supernatant at $750 \times g$ for 15 min [18]. The resulting pellet was resuspended

in serum-free RPMI and quantified for protein concentration (Bradford assay) and particle counting using a Neubauer chamber under light microscopy. PLP morphology and purity were further verified by Giemsa staining prior to downstream assays.

4.4. Isolation of PTLs from Healthy Donor Samples

PLTs were isolated from voluntary laboratory donors under sterile conditions. Whole blood was collected into BD Vacutainer® sodium citrate tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) to prevent coagulation, and samples were processed within 2 h of collection to ensure platelet integrity. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifuging whole blood at $100\times g$ for 20 min at room temperature (RT) without a break. The upper PRP layer was carefully transferred to a new tube, and acetylsalicylic acid was added to a final concentration of 200 μM to inhibit the platelet activation. The PRP was centrifuged again at $100\times g$ for 20 min to eliminate residual red blood cells. Subsequently, the platelets were pelleted by centrifugation at $800\times g$ for 20 min at RT, and the supernatant was discarded. The resulting platelet pellet was gently resuspended in Tyrode's buffer (pH 7.4) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich; Cat. No. A2153). Platelet concentration and purity were assessed by manual counting using a Neubauer hemocytometer under light microscopy, and morphology was verified by phase-contrast imaging [48]. Purified PLTs were used immediately after isolation for all functional assays. PRP samples were obtained from voluntary laboratory donors who provided peripheral blood exclusively for in vitro research. No personal or clinical data were collected, and all samples were anonymized before processing. The use of human blood-derived material was conducted in accordance with institutional biosafety and ethical guidelines, under minimal-risk classification, and did not require formal informed consent according to national and international regulations (NOM-012-SSA3-2012 [49]; CIOMS, 2016 [50]).

4.5. Generation of DEFA1/3-Rich Platelet-Derived Particles

To generate DRPs, the megakaryoblastic cell line MEG-01 was genetically engineered using lentiviral transduction to overexpress *DEFA1/3*. Lentiviral particles were produced by co-transfecting 293T cells with Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11668019; Waltham, MA, USA) with the following plasmids: pLV-IRES-*DEFA1/3* (donor vector containing the *DEFA1/3* coding sequence inserted into the pLV-IRES backbone), pLJM1-GFP (transduction efficiency control), psPAX2 (Addgene, plasmid #12260; Watertown, MA, USA) (packaging plasmid), and pCMV-VSV-G (Addgene, plasmid #8454; Watertown, MA, USA) (envelope plasmid). Transfected cells were maintained in DMEM with 10% FBS for 48 h, and viral supernatants were collected every 12 h for 3 d, filtered through a 0.45 μm PES filter, and stored at 4 °C until use. MEG-01 cells were seeded at 2×10^5 cells/mL and transduced with the viral supernatants at a multiplicity of infection (MOI) of 100, in the presence of 8 $\mu\text{g/mL}$ polybrene to enhance infection efficiency. After 48 h, the medium was replaced, and the cells were cultured for an additional 72 h before puromycin (1 $\mu\text{g/mL}$) was applied for selection [51]. Stable populations were obtained after three rounds of selection, yielding approximately 80% transduction efficiency as verified by GFP fluorescence. Following selection, MEG-01-*DEFA1/3* and MEG-01-EV (empty vector control) cells were stimulated with recombinant TPO (200 ng/mL) for 72 h to induce the formation of PLPs. The released particles were collected by differential centrifugation, as described in Section 4.3, and designated as DRPs (*DEFA1/3*-rich platelets) and control platelets (PLPs-EV). Overexpression of *DEFA1/3* in MEG-01-*DEFA1/3* cells and DRPs was confirmed by qPCR and Western blot analysis prior to downstream functional assays.

4.6. Genomic Studies

Total RNA was extracted, and RT-PCR analysis was performed as previously described by Bandala et al. (2001) [52], with minor modifications to ensure reproducibility. Briefly, total RNA was extracted from AsPC-1, BxPC-3, MEG-01, PLPs-Ev, and DRPs cells using TRIzol™ reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA. No. 15596026, USA) according to the manufacturer instructions. RNA concentration and purity were determined using a NanoDrop™2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) spectrophotometer by measuring the A260/A280 ratio, and integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis. For reverse transcription, 1 µg of total RNA was retrotranscribed in a 20 µL final reaction volume using ThermoScript™ Reverse Transcriptase (Invitrogen) with random hexamer primers and reaction buffer supplied by the manufacturer (Invitrogen). Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifications were performed using AmpliTaq Gold™ DNA polymerase (Applied Biosystems) in a 25 µL reaction volume containing 2.5 µL of 10× PCR buffer, 0.5 µL of dNTP mix (10 mM each), 1 µL of forward and reverse primers (10 µM each), and 1 µL of complementary DNA (cDNA) template. Thermal cycling was performed in a Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min. Final extension: 72 °C for 5 min. PCR products were electrophoresed on 1–2% agarose gels stained with SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, No. S33102) and visualized under UV light. Bands corresponding to the expected amplicon sizes were excised and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) for Sanger sequencing. Amplification efficiency and linearity were verified by plotting standard curves derived from serial dilutions of cDNA, confirming that the reactions proceeded within the logarithmic phase. The list of primers is provided in Supplementary Table S1.

4.7. Transfection

For lentiviral particle production, 293T cells were co-transfected with the following plasmids: donor vector pLV-IRES-DEFA1/3, control vector pLJM1-GFP, packaging plasmid psPAX2, and envelope plasmid pCMV-VSV-G, following the manufacturer's instructions for Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA). Before transfection, plasmid DNA was purified using an endotoxin-free Maxiprep kit (Qiagen, Cat. No. 12362, Germany) to ensure optimal transfection efficiency and to prevent cytotoxicity. For each 10 cm plate, 12 µg of total DNA (ratio 4:3:2:1 for pLV-IRES-DEFA1/3: psPAX2: pCMV-VSV-G: pLJM1-GFP) was mixed with Lipofectamine reagent in Opti-MEM™ medium and incubated for 20 min at room temperature before being added to the cells. After an 8 h co-transfection period, the transfection medium was replaced with complete DMEM supplemented with 10% FBS, and the cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂. Viral supernatants were collected at 48 and 72 h post-transfection, clarified by centrifugation at 500× *g* for 10 min, and filtered through a 0.45 µm PES filter to remove cellular debris. The viral suspension was then concentrated by ultracentrifugation at 25,000× *g* for 2 h at 4 °C using a SW32 Ti rotor (Beckman Coulter). The resulting viral pellet was resuspended in 1 mL of sterile Phosphate-Buffered Saline (PBS) containing 1% BSA and stored at −80 °C in single-use aliquots to avoid repeated freeze-thaw cycles. Viral titers were determined by transducing 293T cells with serial dilutions of the viral stock and quantifying GFP-positive cells after 72 h using fluorescence microscopy, as described by Schwarz-Cruz et al., 2020 [53]. To determine the optimal transduction conditions, AsPC-1 cells were initially seeded to reach 80% confluence and infected with Lv-GFP lentiviral particles at different multiplicities of infection (MOI = 10, 20, 50, 100, and 200). After 48 h, GFP expression was evaluated using a Leica fluorescence microscope (Wetzlar, Germany). An MOI of 100 was selected as the optimal value for subsequent

experiments, as it achieved robust transgene expression while minimizing cytotoxicity. Transduction was performed at 37 °C for 24 h, after which the virus-containing medium was replaced with fresh complete RPMI medium supplemented with 10% FBS. The cells were then incubated for an additional 48 h before initiating antibiotic selection. To generate stable cell lines, puromycin (2 µg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the culture medium, which was refreshed every two days. Selection continued until all non-infected control cells were no longer viable (approximately 5–7 days). Surviving clones were expanded and maintained in 1 µg/mL puromycin to ensure stable transgene expression. The resulting cell populations were designated as MEG-01-DEFA1/3 and MEG-01-GFP, corresponding to cells stably expressing the DEFA1/3 transgene or GFP control, respectively [53].

4.8. Cell Migration Assays

To evaluate the effects of DEFA1/3 and platelet-derived particles on the migratory capacity of pancreatic cancer cells, AsPC-1 and BxPC-3 cells were used. A total of 4×10^5 cells were seeded into (Ibidi® 35 mm Culture Dishes containing Culture-Insert 2 Well systems (Cat. No. 80206; Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) and allowed to form confluent monolayers within 24 h. Each insert well received 70 µL of cell suspension and was incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. To ensure that wound closure reflected cell migration rather than proliferation, the medium was supplemented with 5 µM cytosine β-D-arabinofuranoside hydrochloride (Ara-C; Sigma-Aldrich). Cat. No. C1768; St. Louis, MO, USA) as a DNA synthesis inhibitor. After the initial 24 h attachment period, the Culture-Insert 2 Well was gently removed using sterile forceps to create a defined cell-free gap (wound). Cells were then treated under the following experimental conditions: Recombinant DEFA1/3 (100 ng/mL; Abcam plc, Waltham, MA, USA), PLP-Ev, DRPs, and Nt. The cultures were maintained for an additional 72 h under standard conditions. Wound closure was monitored by capturing five random fields per condition using an inverted phase-contrast microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at 0, 24, 48, and 72 h. Images were analyzed using the ImageJ software version 1.53t (NIH, Bethesda, MD, USA). The percentage of wound closure was calculated as follows:

$$\text{Migrationrate} = \left(1 - \frac{\text{woundareaattimet}}{\text{initialwoundat0 h}}\right) \times 100$$

Each condition was tested in triplicate, and the results are presented as mean ± S.E.M from at least three independent experiments.

4.9. Spheroid Culture

Capan-2 and BxPC-3 pancreatic cancer cells were cultured using the liquid overlay technique, as previously described by Espinosa et al. (2012) [54], with minor modifications. Briefly, P60 Petri dishes were coated with a thin layer of 1% agarose (Sigma-Aldrich, Cat. No. A0169; St. Louis, MO, USA) (*w/v*) prepared in sterile PBS to prevent cell adhesion and allowed it to solidify at room temperature. Subsequently, 1×10^6 cells, previously expanded as a monolayer, were seeded onto each agarose-coated plate in Leibovitz L-15 medium supplemented with 5% FBS (Gibco) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere. After 48 h, the floating cell aggregates began to form compact spheroids. Cultures were maintained for 7 days, during which the medium was gently refreshed every two days to preserve the nutrient balance and remove debris or aberrant (irregular) spheroids. To improve spheroid uniformity, the plates were transferred to a rotary shaker incubator (60 rpm) on the second day of culture, which promoted even shear forces and homogeneous spheroid formation. Spheroid growth was monitored daily under an inverted microscope

(Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Germany), and the diameters were quantified using a calibrated eyepiece graticule (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) or ImageJ software for digital images. At least 30 spheroids per condition were measured to determine the mean spheroid diameter $\pm$ S.E.M.

4.10. Viability Assay

Cell viability was evaluated using crystal violet (Sigma-Aldrich; Cat. No. C0775) staining, as previously described by Feoktistova et al. (2016) [55], with minor modifications. Briefly, 5×10^3 cells per well were seeded in 200 μ L of complete culture medium into 96-well flat-bottom plates (Corning, USA) and allowed to adhere overnight at 37 °C in 5% CO₂. At 0 and 72 h, the wells were gently washed twice with PBS to remove debris and non-adherent cells. Attached cells were fixed with 100% methanol for 10 min at room temperature and air-dried. Subsequently, the cells were stained with 0.05% (*w/v*) crystal violet solution (Sigma-Aldrich) for 15 min, followed by thorough washing with distilled water to remove excess dye and air-drying. To quantify cell viability, 33% (*v/v*) acetic acid was added to each well to solubilize the bound dye, and the optical density (OD) was measured at 570 nm using a microplate reader (Synergy HT; BioTek, Winooski, VT, USA). Relative cell viability (%) was calculated as follows:

$$\text{Cell viability} = \frac{OD_{72 \text{ h}}}{OD_{0 \text{ h}}} \times 100$$

All treatments were performed in triplicate wells across three independent experiments, and the results were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Representative images of the stained wells were captured using a digital camera at 1 $\times$ magnification before quantification.

4.11. Clonogenicity Assay

BxPC-3, AsPC-1, and Capan-2 cells were seeded at a low density (300–800 cells/well, depending on the cell line) in 6-well plates and allowed to adhere overnight. The cells were then treated with N), PLP-Ev, or DRPs and incubated for 10–14 days until visible colonies (>50 cells) were formed. At each passage, parallel wells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich; Cat. No. 158127) for 10 min and stained with 0.05% crystal violet to confirm colony formation. For serial clonogenicity assessment, colonies were trypsinized, resuspended as single-cell suspensions, and re-plated at clonal density under identical conditions for two additional passages (P2–P3). At the final passage, the colonies were fixed and stained as described above. Colony numbers were quantified using ImageJ software (NIH, USA) and expressed as the survival fraction relative to the Nt. The persistence of colony-forming ability across passages is interpreted as evidence of self-renewal potential. All experiments were performed in triplicate across three independent assays.

4.12. Western Blot Analysis

Total protein lysates from PTLs, PLPs-Ev, and DRPs cells were extracted using RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.1% SDS; 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich, Cat. #P8340 and #P0044, St. Louis, MO, USA). Protein concentrations were quantified using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. #23225, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Equivalent amounts of total protein (20–30 μ g) were mixed with 4 $\times$ Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Cat. #1610747) containing 5% β -mercaptoethanol and denatured at 95 °C for 5 min. Proteins were resolved by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels and transferred onto 0.2 μ m nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Cat. #1620112) using a Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked for 1 h at

room temperature with Intercept® TBS Blocking Buffer (LI-COR, Cat. #927-60001) and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in blocking buffer containing 0.1% Tween-20. The following primary antibodies were used: Anti-DEFA1/3 antibody (mouse monoclonal, Abcam plc, Waltham, MA, USA, Cat. #ab97409, dilution 1:1000), anti-GAPDH antibody (rabbit monoclonal, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, Cat. #5174, dilution 1:5000) was used as the loading control. After washing, membranes were incubated for 1 h at room temperature with species-specific infrared secondary antibodies: Goat anti-mouse IgG (IRDye® 680RD, LI-COR, Cat. #926-68070, 1:10,000), and goat anti-rabbit IgG (IRDye® 800CW, LI-COR #926-32211, 1:10 000). Fluorescent signals were detected using an Odyssey® CLx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Band intensities were quantified using Image Studio™ Lite, version 5.2 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA), and DEFA1/3 protein content was normalized to GAPDH. All Western blot assays were performed in biological triplicates to ensure reproducibility. Full, uncropped Western blot images are shown in Supplementary Material File S1.

4.13. Zebrafish Husbandry and Ethical Compliance

Adult zebrafish (*Danio rerio*) of the Tab-wik strain, originally provided by Dr. Ernesto Maldonado (Institute of Marine Sciences and Limnology, UNAM) and Dr. Francisco Carmona (Institute of Cellular Physiology, UNAM), were maintained under standard aquaculture conditions at 28.5 °C, with pH adjusted to 7.0–7.5, and a 14 h light/10 h dark cycle. Embryos were kept in embryo water (distilled water supplemented with 5 g/L Instant Ocean® Salt and 7.5 mg/L NaHCO₃).

General husbandry procedures for both adults and larvae followed established protocols detailed in *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* (Westerfield, 2000) [56]. Experimental procedures were conducted according to international animal care standards, including the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) guidelines (University of Oregon), and were approved by the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL; Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENOMICA (INMEGEN); approval no. 427). For euthanasia, embryos older than 4 days post-fertilization (dpf) were sacrificed by immersion in chilled water (2–4 °C) until opercular movements ceased, followed by additional exposure to the same chilled water for several minutes, as recommended by the American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals (2020) [57].

Animal care and monitoring. All procedures were designed to minimize the pain and distress. Embryos were anesthetized with 0.04% tricaine (MS-222; Sigma-Aldrich, Cat. No. E10521) during microinjection and was handled under a stereomicroscope to avoid mechanical stress. Embryos were monitored periodically during the 24 h post-injection period for signs of abnormal morphology, hemorrhage and death. Those presenting malformations or loss of viability were excluded from the analysis. No unexpected adverse events were observed. Humane endpoints were defined as death or severe malformation before imaging at 24 h post-injection, at which point the surviving embryos were imaged and subsequently maintained under standard conditions. Euthanasia was performed on larvae older than 4 dpf according to the AVMA guidelines.

4.14. Embryo Preparation, Microinjection, and Migration Assays

At 2 dpf, the embryos were manually dechorionated using Dumont No. 5 forceps and anesthetized in 0.04% tricaine (MS-222; Sigma-Aldrich, Cat. No. E10521). The embryos were positioned in 3% agarose-coated Petri dishes to ensure stability during injection. BxPC-3 pancreatic cancer cells pretreated with DRPs, PLPs, or left Nt were used for the

xenotransplantation. Approximately 300 cells were injected into the yolk sac of each embryo. Each zebrafish embryo was considered an independent experimental unit. For each independent experiment, 20 embryos were allocated to each group (DRP, PLPs, and Nt), resulting in approximately 60 embryos per replicate and 300 embryos across all experiments. The chosen sample size followed previously validated zebrafish xenograft models (Martínez-López et al., 2021) [58,59] that demonstrated consistent tumor dissemination variability within this range, ensuring reproducibility and statistical reliability without requiring a formal a priori power calculation. Cells were pre-labeled with Cell-Tracker™ Red CMTPX (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. C34552), were resuspended at 1×10^3 cells/10 μ L, and ~300 cells were injected into the yolk sac of each embryo, under blinded conditions, following xenotransplantation procedures adapted from Martínez-López et al. 2021 [58,59]. Borosilicate glass capillaries (10 cm length, 1.0 mm outer diameter (OD), 0.58 mm inner diameter (ID), without filament; Sutter Instrument, Novato, CA, USA) were pulled using a vertical pipette puller (Model 51210, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) and trimmed 0.8 cm from the shoulder using Dumont No. 5 forceps. Injections were performed using a Pneumatic Pico-Liter Injector (PLI-100A; Warner Instruments, Holliston, MA, USA).

Post-injection, the embryos were rinsed with embryo water and incubated at 34 °C in Petri dishes containing sufficient embryo water, with a density of ≤ 30 embryos per dish. The inclusion criteria were defined a priori as (i) viable 2 dpf embryos and (ii) successful xenotransplantation verified immediately after injection (T0) by the presence of fluorescently labeled tumor cells at the yolk sac injection site. Embryos remained eligible for analysis regardless of whether fluorescent cells were confined to the yolk sac or had already disseminated at 24 h post-injection; migration was treated as an outcome. The exclusion criteria (predefined) were technical failure of injection (off-target delivery or widespread leakage at T0), severe malformation or hemorrhage, or death prior to imaging at 24 h. Each experimental group included exactly 20 embryos ($n = 20$ per group, per replicate); the exact n used in each analysis is reported in the corresponding figure legend. At 24 h post-injection, the embryos were examined in a blinded manner using a Zeiss epifluorescence microscope equipped with a Canon digital camera. Images were processed using FIJI–ImageJ software, and the number of fluorescent cells detected in the posterior trunk and tail (beyond the yolk sac) was quantified [58].

Randomization and control of confounders. Randomization was performed according to the treatment sequence (temporal alternation) during the injection process. Embryos from mixed clutches were selected without distinction and injected sequentially in alternating order across the treatment groups (DRP, PLP, and Nt) to avoid time-dependent or operator bias. Each experimental day included all three groups to minimize batch effects. All embryos were maintained under identical conditions (temperature, density ≤ 30 embryos per dish, and 14/10 h light/dark cycle). The plate positions within the incubator were rotated daily to prevent location bias. Outcome assessment was performed 24 h post-injection under blinded conditions. The operator was aware of the treatment allocation during the injection; however, outcome evaluation was performed using coded image files to reduce observer bias.

Outcome measures. The primary outcome measure was the number of fluorescent BxPC-3 cells that migrated beyond the yolk sac 24 h post-injection, quantified using FIJI–ImageJ. This variable directly assessed the pro-tumorigenic effects of DRPs *in vivo*. The secondary outcome measures included the fluorescent area corresponding to disseminated cells and the percentage of embryos showing successful xenografts. These measures were selected based on previous zebrafish xenotransplantation studies that evaluated tumor

dissemination and invasion dynamics (Martínez-López et al., 2021) [32]. The sample size ($n = 20$ embryos per group per replicate) was determined based on this primary outcome.

4.15. Transcriptomic Analyses and Survival Modeling

RNA-seq expression data and associated clinical annotations for PDAC were obtained from TCGA-PAAD via the Genomic Data Commons (GDC) Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/> accessed on 1 March 2025). Raw counts were normalized to CPM and $\log_2$ -transformed using the limma/voom pipeline implemented in R (v4.3.0). For survival analyses, patients were stratified into quartiles based on *DEFA1/3* expression, and OS was compared using Kaplan–Meier curves generated with the survival version 3.7-0 and survminer version 0.4.9 R packages. To evaluate potential interactions with circulating platelet levels, patients were further subdivided into four categories (high/low *DEFA1/3* $\times$ high/low platelets) based on the median values of both variables. Log-rank tests were used to assess statistical significance. All analyses were conducted in R using publicly available TCGA data, following established computational reproducibility guidelines.

4.16. Single-Sample Gene Set Enrichment Analysis

To explore functional associations, ssGSEA was performed using the Gene Set Variation Analysis (GSVA) R package (v3.21). Curated gene sets related to platelet activation, neutrophil infiltration, and EMT were used as reference pathways [60]. Spearman's rank correlation was applied to assess associations between *DEFA1/3* expression and ssGSEA enrichment scores across samples. Correlation strength was quantified using the rho coefficient, and p -values were calculated to determine the significance. Scatter plots with linear regression lines were generated using the ggplot2 R package version 3.5.1, with rho and p -values indicated in each panel [61]. All analyses were conducted in R (v4.3.0) using publicly available TCGA-PDAC data.

4.17. Correlation Analyses with Aggressiveness-Related Genes

To further explore the molecular programs linked to PDAC aggressiveness, we selected a panel of genes previously reported to stratify tumor subtypes and progression (*SPARC*, *GATA6*, *KDM6A*, and *EGR1*). Transcriptomic scores for invasion (MMPs), motility (integrins), and EMT-like programs were computed using curated hallmark and Gene Ontology (GO) gene sets. Associations between gene expression and program scores were tested using Spearman's correlation, and regression plots were visualized with confidence intervals [62].

To further explore the molecular programs associated with PDAC aggressiveness, we analyzed a curated panel of genes previously reported to stratify pancreatic tumor subtypes and progression (*SPARC*, *GATA6*, *KDM6A*, and *EGR1*) [63]. Transcriptomic activity scores were calculated for invasion (MMP-related), motility (integrin-related), and EMT-like programs using hallmark and GO gene sets from the Molecular Signatures Database (MSigDB v7.5). Associations between gene expression and program scores were evaluated using Spearman's rank correlation, and results were visualized as regression plots with 95% confidence intervals generated in R (v4.3.0).

4.18. Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ S. E. M. from a minimum of three independent experiments, each conducted in triplicate. Group comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test to assess pairwise differences. Statistical significance was set at $p < 0.01$. All statistical analyses and graphical representations were performed using GraphPad Prism software version 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. Conclusions

This study provides compelling evidence that α -defensins, specifically *DEFA1/3*, play a previously underappreciated role in PDAC progression. While most prior research has centered on β -defensins, our findings highlight the importance of α -defensins as both biomarkers and functional modulators of tumor aggressiveness in this malignancy.

By developing a renewable in vitro platelet production model, we demonstrated that platelet-derived α -defensins significantly enhance cancer cell viability, migration, clonogenicity, and spheroid formation. This system faithfully replicates the behavior of platelets isolated from healthy donors, reinforcing its translational utility.

Moreover, our in vivo zebrafish xenograft assays confirmed that *DEFA1/3*-enriched platelets promote tumor growth and dissemination in a complex biological environment. At the molecular level, DRPs selectively induced the expression of aggressiveness-associated genes, including *SPARC*, *KDM6A* and *GATA6*. Patient data analyses linked high *DEFA1/3* expression with poor prognosis, immune infiltration, and EMT activation.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms262210898/s1>.

Author Contributions: J.G.-R. Manuscript writing, data analysis, reviewing, editing, and experimental design; M.S.-C. Manuscript writing, review, and editing; I.B.-O. Design, conceptualization, review, and editing; M.E. Logistics, reviewing, and editing; G.C.-C. Logistics, reviewing, and editing; K.V.-S. Reviewing and editing; V.M. Reviewing and editing; J.M.-Z. Design, funding, conceptualization, direction, logistics, review, and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías CONAHCYT, Mexico (Grant No. CBF-2025-I-4446, awarded to J.M.-Z.). J.G.-R. received a CONAHCYT doctoral scholarship (No. 727202) from the Posgraduate Program in Experimental Biology, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I). The present work was part of J.G.-R. Doctoral thesis from the UAM-I (Experimental Biology Doctorate Program).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of INMEGEN (09/2015/I) in Mexico City on 6 May 2015.

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to the use of anonymized platelet and transcriptomic data classified as minimal-risk research, in accordance with national (NOM-012-SSA3-2012) and international (CIOMS, 2016) ethical guidelines.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author if you want to partner or contribute to the project. The data are not publicly available because of institutional review board politics.

Acknowledgments: We thank all the investigators at the Melendez Laboratory for their data analysis discussions and technical assistance. J.G.-R. acknowledges the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías CONAHCYT, Mexico for the doctoral scholarship support.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interest in any form.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ADP	Adenosine Diphosphate
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosine Triphosphate
ATCC	American Type Culture Collection
AVMA	American Veterinary Medical Association

BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CPM	Counts Per Million
DEFA1/3	Defensin Alpha 1/3
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPF	Days Post Fertilization
DRPs	Defensin-Rich Platelets
EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition
FBS	Fetal Bovine Serum
GDC	Genomic Data Commons
GO	Gene Ontology
GSA	Gene Set Variation Analysis
HNPs	Human Neutrophil Peptides
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
Mks	Megakaryocytes
NES	normalized enrichment score
Nt	Non-treated Control
OS	Overall Survival
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PF4	Platelet factor 4
PLP-Ev	Platelet-Like Particles Empty Vector
PLPs	Platelet-Like Particles
PLTs	Platelets
PRP	Platelet-Rich Plasma
PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
S.E.M.	Standard Error of the Mean
ssGSEA	Single-Sample Gene Set Enrichment Analysis
SVM	Support Vector Machine
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEPs	Tumor-Educated Platelets
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TPO	Thrombopoietin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

References

1. Antunes-Ferreira, M.; D'Ambrosi, S.; Arkani, M.; Post, E.; In't Veld, S.G.J.G.; Ramaker, J.; Zwaan, K.; Kucukguzel, E.D.; Wedekind, L.E.; Griffioen, A.W.; et al. Tumor-educated platelet blood tests for Non-Small Cell Lung Cancer detection and management. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 9359. [\[CrossRef\]](#)
2. Wang, S.; Zheng, Y.; Yang, F.; Zhu, L.; Zhu, X.Q.; Wang, Z.F.; Wu, X.L.; Zhou, C.H.; Yan, J.Y.; Hu, B.Y.; et al. The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: Translational challenges and clinical perspectives. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Leiphrahpam, P.D.; Chowdhury, S.; Zhang, M.; Bajaj, V.; Dhir, M.; Are, C. Trends in the Global Incidence of Pancreatic Cancer and a Brief Review of its Histologic and Molecular Subtypes. *J. Gastrointest. Cancer* **2025**, *56*, 71. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2024**, *74*, 229–263. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Siegel, R.L.; Giaquinto, A.N.; Jemal, A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J. Clin.* **2024**, *74*, 12–49. [\[CrossRef\]](#)
6. Sherman, R.L.; Firth, A.U.; Henley, S.J.; Siegel, R.L.; Negoita, S.; Sung, H.; Kohler, B.A.; Anderson, R.N.; Cucinelli, J.; Scott, S.; et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, featuring state-level statistics after the onset of the COVID-19 pandemic. *Cancer* **2025**, *131*, e35833. [\[CrossRef\]](#)

11. REFERENCIAS

- Antunes-Ferreira, M., D'Ambrosi, S., Arkani, M., Post, E., In 't Veld, S., Ramaker, J., Zwaan, K., Kucukguzel, E. D., Wedekind, L. E., Griffioen, A. W., Oude Egbrink, M., Kuijpers, M. J. E., van den Broek, D., Noske, D. P., Hartemink, K. J., Sabrkhan, S., Bahce, I., Sol, N., Bogaard, H. J.,...Wurdinger, T. (2023). Tumor-educated platelet blood tests for Non-Small Cell Lung Cancer detection and management. *Sci Rep*, 13(1), 9359. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35818-w>
- Asghar, S., Waqar, W., Umar, M., & Manzoor, S. (2020). Tumor educated platelets, a promising source for early detection of hepatocellular carcinoma: Liquid biopsy an alternative approach to tissue biopsy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 44(6), 836–844. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2020.03.023>
- Bandala, E., Espinosa, M., Maldonado, V., & Melendez-Zajgla, J. (2001). Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem Pharmacol*, 62(1), 13–19. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00632-3](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00632-3)
- Best, M. G., Sol, N., Kooi, I., Tannous, J., Westerman, B. A., Rustenburg, F., Schellen, P., Verschueren, H., Post, E., Koster, J., Ylstra, B., Ameziane, N., Dorsman, J., Smit, E. F., Verheul, H. M., Noske, D. P., Reijneveld, J. C., Nilsson, R. J. A., Tannous, B. A.,...Wurdinger, T. (2015). RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*, 28(5), 666–676. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.018>
- Bonamy, C., Sechet, E., Amiot, A., Alam, A., Mourez, M., Fraisse, L., Sansonetti, P. J., & Sperandio, B. (2018). Expression of the human antimicrobial peptide beta-defensin-1 is repressed by the EGFR-ERK-MYC axis in colonic epithelial cells. *Sci Rep*, 8(1), 18043. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36387-z>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Budi, H. S., Elsayed Ramadan, D., Anitasari, S., & Widya Pangestika, E. (2022). Estimation of Platelet Count and Bleeding Time of Mice Treated with *Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kuntze Extract. *J Exp Pharmacol*, 14, 301–308. <https://doi.org/10.2147/JEP.S358105>
- Chang, Y. S., Tu, S. J., Chen, Y. C., Liu, T. Y., Lee, Y. T., Yen, J. C., Fang, H. Y., & Chang, J. G. (2021). Mutation profile of non-small cell lung cancer revealed by next generation sequencing. *Respir Res*, 22(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01608-5>
- Chen, Z., Wei, X., Dong, S., Han, F., He, R., & Zhou, W. (2022). Challenges and Opportunities Associated With Platelets in Pancreatic Cancer. *Front Oncol*, 12, 850485. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.850485>

- Cho, Y., & Hahm, J. H. (2025). The Role of Innate Immunity in Healthy Aging Through Antimicrobial Peptides. *Immunology*, 174(4), 375–383. <https://doi.org/10.1111/imm.13899>
- Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K., & Biankin, A. V. (2019). Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(4), 207–220. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0109-y>
- Dhurat, R., & Sukesh, M. (2014). Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg*, 7(4), 189–197. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.150734>
- Espinosa, M., Ceballos-Cancino, G., Callaghan, R., Maldonado, V., Patino, N., Ruiz, V., & Melendez-Zajgla, J. (2012). Survivin isoform Delta Ex3 regulates tumor spheroid formation. *Cancer Lett*, 318(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.002>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(4), pdb prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Ferraro, B., Bepler, G., Sharma, S., Cantor, A., & Haura, E. B. (2005). EGR1 predicts PTEN and survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 23(9), 1921–1926. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.08.127>
- Figueredo, S. M., & Ouellette, A. J. (2010). Inhibition of bactericidal activity is maintained in a mouse alpha-defensin precursor with proregion truncations. *Peptides*, 31(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.10.004>
- Fu, J., Zong, X., Jin, M., Min, J., Wang, F., & Wang, Y. (2023). Mechanisms and regulation of defensins in host defense. *Signal Transduct Target Ther*, 8(1), 300. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01553-x>
- Ge, X., Yuan, L., Cheng, B., & Dai, K. (2021). Identification of seven tumor-educated platelets RNAs for cancer diagnosis. *J Clin Lab Anal*, 35(6), e23791. <https://doi.org/10.1002/jcla.23791>
- Goldberg, K., Lobov, A., Antonello, P., Shmueli, M. D., Yakir, I., Weizman, T., Ulman, A., Sheban, D., Laser, E., Kramer, M. P., Shteinvil, R., Chen, G., Ibraheem, A., Sysoeva, V., Fishbain-Yoskovitz, V., Mohapatra, G., Abramov, A., Shimshi, S., Ogneva, K.,...Merbl, Y. (2025). Cell-autonomous innate immunity by proteasome-derived defence peptides. *Nature*, 639(8056), 1032–1041. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08615-w>
- Haemmerle, M., Taylor, M. L., Gutschner, T., Pradeep, S., Cho, M. S., Sheng, J., Lyons, Y. M., Nagaraja, A. S., Dood, R. L., Wen, Y., Mangala, L. S., Hansen, J. M., Rupaimoole, R., Gharpure, K. M., Rodriguez-Aguayo, C., Yim, S. Y., Lee, J. S., Ivan, C., Hu, W.,...Sood, A. K. (2017). Platelets reduce anoikis and promote metastasis by activating YAP1 signaling. *Nat Commun*, 8(1), 310. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00411-z>
- Hanzelmann, S., Castelo, R., & Guinney, J. (2013). GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*, 14, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7>
- Jeong, H., Park, S. W., & Hwang, Y. S. (2025). DEFA1, Primarily Expressed at the Invasive Tumor Front, Promotes OSCC Cell Invasion and Tumor Growth. *Cancer Genomics Proteomics*, 22(2), 326–345. <https://doi.org/10.21873/cgp.20504>

- K, R. G., Balenahalli Narasingappa, R., & Vishnu Vyas, G. (2024). Unveiling mechanisms of antimicrobial peptide: Actions beyond the membranes disruption. *Heliyon*, 10(19), e38079. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38079>
- Karp, J. M., Modrek, A. S., Ezhilarasan, R., Zhang, Z. Y., Ding, Y., Graciani, M., Sahimi, A., Silvestro, M., Chen, T., Li, S., Wong, K. K., Ramkhelawon, B., Bhat, K. P., & Sulman, E. P. (2024). Deconvolution of the tumor-educated platelet transcriptome reveals activated platelet and inflammatory cell transcript signatures. *JCI Insight*, 9(19). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.178719>
- Kumar, M. A., Baba, S. K., Sadida, H. Q., Marzooqi, S. A., Jerobin, J., Altemani, F. H., Algehainy, N., Alanazi, M. A., Abou-Samra, A. B., Kumar, R., Al-Shabeeb Akil, A. S., Macha, M. A., Mir, R., & Bhat, A. A. (2024). Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 9(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01735-1>
- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*, 30(3), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.003>
- Lehrer, R. I., & Lu, W. (2012). alpha-Defensins in human innate immunity. *Immunol Rev*, 245(1), 84–112. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01082.x>
- Leiphrakpam, P. D., Chowdhury, S., Zhang, M., Bajaj, V., Dhir, M., & Are, C. (2025). Trends in the Global Incidence of Pancreatic Cancer and a Brief Review of its Histologic and Molecular Subtypes. *J Gastrointest Cancer*, 56(1), 71. <https://doi.org/10.1007/s12029-025-01183-2>
- Li, C. Y., Rajapakshe, K. I., & Maitra, A. (2022). Integrative transcriptomic analysis identifies a novel gene signature to predict prognosis of pancreatic cancer in different subtypes. *Pancreatology*, 22(7), 965–972. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2022.08.007>
- Li, H., Jiang, W., Zhang, S. R., Li, P. C., Li, T. J., Jin, W., Xu, H. X., Yu, X. J., & Liu, L. (2023). The platelet pannexin 1-IL-1beta axis orchestrates pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis. *Oncogene*, 42(18), 1453–1465. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02647-0>
- Li, N., Yu, Z., Zhang, X., Liu, T., Sun, Y. X., Wang, R. T., & Yu, K. J. (2017). Elevated mean platelet volume predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Sci Rep*, 7(1), 10261. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11053-y>
- Li, S., Mu, R., & Guo, X. (2024). Defensins regulate cell cycle: Insights of defensins on cellular proliferation and division. *Life Sci*, 349, 122740. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122740>
- Ling, Y. M., Chen, J. Y., Guo, L., Wang, C. Y., Tan, W. T., Wen, Q., Zhang, S. D., Deng, G. H., Lin, Y., & Kwok, H. F. (2017). beta-defensin 1 expression in HCV infected liver/liver cancer: an important role in protecting HCV progression and liver cancer development. *Sci Rep*, 7(1), 13404. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13332-0>
- Martinez-Lopez, M., Pova, V., & Fior, R. (2021). Generation of Zebrafish Larval Xenografts and Tumor Behavior Analysis. *J Vis Exp*(172). <https://doi.org/10.3791/62373>

- Martinez-Lopez, M. F., & Lopez-Gil, J. F. (2025). Small Fish, Big Answers: Zebrafish and the Molecular Drivers of Metastasis. *Int J Mol Sci*, 26(3). <https://doi.org/10.3390/ijms26030871>
- Matsumoto, K., Fujimori, N., Ichihara, K., Takeno, A., Murakami, M., Ohno, A., Kakehashi, S., Teramatsu, K., Ueda, K., Nakata, K., Sugahara, O., Yamamoto, T., Matsumoto, A., Nakayama, K. I., Oda, Y., Nakamura, M., & Ogawa, Y. (2024). Patient-derived organoids of pancreatic ductal adenocarcinoma for subtype determination and clinical outcome prediction. *J Gastroenterol*, 59(7), 629–640. <https://doi.org/10.1007/s00535-024-02103-0>
- Munasinghe, A., Malik, K., Mohamedi, F., Moaraf, S., Kocher, H., Jones, L., & Hill, N. J. (2020). Fibronectin acts as a molecular switch to determine SPARC function in pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 477, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.031>
- Nagib, M., Sayed, A. M., Korany, A. H., Abdelkader, K., Shari, F. H., Mackay, W. G., & Rateb, M. E. (2025). Human Defensins: Structure, Function, and Potential as Therapeutic Antimicrobial Agents with Highlights Against SARS CoV-2. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 17(3), 1563–1583. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10436-8>
- Najafi, S., Asemani, Y., Majidpoor, J., Mahmoudi, R., Aghaei-Zarch, S. M., & Mortezaee, K. (2024). Tumor-educated platelets. *Clin Chim Acta*, 552, 117690. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117690>
- NOM-012-SSA3-2012;. (Mexico City, Mexico, 2013.). *Que Establece los Criterios para la Ejecución de Proyectos de Investigación para la Salud en Seres Humanos. Diario Oficial de la Federación:*
- Pelosi, E., Castelli, G., & Testa, U. (2017). Pancreatic Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Biomedicines*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines5040065>
- Persson, K. M., Kneller, P. V., Livingston, M. W., Bush, L. M., & Deans, T. L. (2021). High-Throughput Production of Platelet-Like Particles. *Methods Mol Biol*, 2258, 273–283. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1174-6_18
- Qiu, H., Makarov, V., Bolzenius, J. K., Halstead, A., Parker, Y., Wang, A., Iyer, G. V., Wise, H., Kim, D., Thayaparan, V., Lindner, D. J., Haber, G. P., Ting, A. H., Ren, B., Chan, T. A., Arora, V., Solit, D. B., & Lee, B. H. (2023). KDM6A Loss Triggers an Epigenetic Switch That Disrupts Urothelial Differentiation and Drives Cell Proliferation in Bladder Cancer. *Cancer Res*, 83(6), 814–829. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-1444>
- Risitano, A., Beaulieu, L. M., Vitseva, O., & Freedman, J. E. (2012). Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood*, 119(26), 6288–6295. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-396440>
- Sabit, H., Pawlik, T. M., Abdel-Ghany, S., & Arneth, B. (2024). Defensins: Exploring Their Opposing Roles in Colorectal Cancer Progression. *Cancers (Basel)*, 16(15). <https://doi.org/10.3390/cancers16152622>
- Schwarz-Cruz, Y. C. A., Ceballos-Cancino, G., Vazquez-Santillan, K., Espinosa, M., Zampedri, C., Bahena, I., Ruiz, V., Maldonado, V., & Melendez-Zajgla, J. (2020). Basal-Type Breast Cancer Stem Cells Over-Express

- Chromosomal Passenger Complex Proteins. *Cells*, 9(3).
<https://doi.org/10.3390/cells9030709>
- Schweinfurth, N., Hohmann, S., Deuschle, M., Lederbogen, F., & Schloss, P. (2010). Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01. *Platelets*, 21(8), 648–657.
<https://doi.org/10.3109/09537104.2010.513748>
- Scridon, A. (2022). Platelets and Their Role in Hemostasis and Thrombosis-From Physiology to Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*, 23(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232112772>
- Seidel, T., Ohri, N., Glass, M., Sunami, Y., Muller, L. P., & Kleeff, J. (2025). Stromal Cells in Early Inflammation-Related Pancreatic Carcinogenesis-Biology and Its Potential Role in Therapeutic Targeting. *Cancers (Basel)*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/cancers17091541>
- Sherman, R. L., Firth, A. U., Henley, S. J., Siegel, R. L., Negoita, S., Sung, H., Kohler, B. A., Anderson, R. N., Cucinelli, J., Scott, S., Benard, V. B., Richardson, L. C., Jemal, A., & Cronin, K. A. (2025). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, featuring state-level statistics after the onset of the COVID-19 pandemic. *Cancer*, 131(9), e35833.
<https://doi.org/10.1002/cncr.35833>
- Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*, 74(1), 12–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
- Sivapalan, L., Kocher, H. M., Ross-Adams, H., & Chelala, C. (2022). The molecular landscape of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology*, 22(7), 925–936. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2022.07.010>
- Skalamera, D., Dahmer, M., Purdon, A. S., Wilson, B. M., Ranall, M. V., Blumenthal, A., Gabrielli, B., & Gonda, T. J. (2012). Generation of a genome scale lentiviral vector library for EF1alpha promoter-driven expression of human ORFs and identification of human genes affecting viral titer. *PLoS One*, 7(12), e51733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051733>
- Tian, Y., Zong, Y., Pang, Y., Zheng, Z., Ma, Y., Zhang, C., & Gao, J. (2025). Platelets and diseases: signal transduction and advances in targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*, 10(1), 159.
<https://doi.org/10.1038/s41392-025-02198-8>
- Toyoda, T., Isobe, K., Tsujino, T., Koyata, Y., Ohyagi, F., Watanabe, T., Nakamura, M., Kitamura, Y., Okudera, H., Nakata, K., & Kawase, T. (2018). Direct activation of platelets by addition of CaCl₂ leads coagulation of platelet-rich plasma. *Int J Implant Dent*, 4(1), 23.
<https://doi.org/10.1186/s40729-018-0134-6>
- Valle-Jimenez, X., Ramirez-Cosmes, A., Aquino-Dominguez, A. S., Sanchez-Pena, F., Bustos-Arriaga, J., Romero-Tlalolini, M. L. A., Torres-Aguilar, H., Serafin-Lopez, J., & Aguilar Ruiz, S. R. (2020). Human platelets and megakaryocytes express defensin alpha 1. *Platelets*, 31(3), 344–354.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1615612>
- Varghese, A. M., Perry, M. A., Chou, J. F., Nandakumar, S., Muldoon, D., Erakky, A., Zucker, A., Fong, C., Mehine, M., Nguyen, B., Basturk, O., Balogun, F., Kelsen, D. P., Brannon, A. R., Mandelker, D., Vakiani, E., Park, W., Yu, K.

- H., Stadler, Z. K.,...O'Reilly, E. M. (2025). Clinicogenomic landscape of pancreatic adenocarcinoma identifies KRAS mutant dosage as prognostic of overall survival. *Nat Med*, 31(2), 466–477. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03362-3>
- Virolle, T., Krones-Herzig, A., Baron, V., De Gregorio, G., Adamson, E. D., & Mercola, D. (2003). Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. *J Biol Chem*, 278(14), 11802–11810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210279200>
- Walke, V., Das, S., Mittal, A., & Agrawal, A. (2024). Tumor Educated Platelets as a Biomarker for Diagnosis of Lung cancer: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev*, 25(6), 1911–1920. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2024.25.6.1911>
- Wang, S., Zheng, Y., Yang, F., Zhu, L., Zhu, X. Q., Wang, Z. F., Wu, X. L., Zhou, C. H., Yan, J. Y., Hu, B. Y., Kong, B., Fu, D. L., Bruns, C., Zhao, Y., Qin, L. X., & Dong, Q. Z. (2021). The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 249. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00659-4>
- Wang, X., Zhao, S., Wang, Z., & Gao, T. (2022). Platelets involved tumor cell EMT during circulation: communications and interventions. *Cell Commun Signal*, 20(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00887-3>
- Westerfield, M. (2000.). *The zebrafish book. In A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio)*, 4th ed.; (E. U. o. O. Press, Ed.)
- Wu, Z., Ding, Z., Cheng, B., & Cui, Z. (2021). The inhibitory effect of human DEFA5 in growth of gastric cancer by targeting BMI1. *Cancer Sci*, 112(3), 1075–1083. <https://doi.org/10.1111/cas.14827>
- Xing, S., Zeng, T., Xue, N., He, Y., Lai, Y. Z., Li, H. L., Huang, Q., Chen, S. L., & Liu, W. L. (2019). Development and Validation of Tumor-educated Blood Platelets Integrin Alpha 2b (ITGA2B) RNA for Diagnosis and Prognosis of Non-small-cell Lung Cancer through RNA-seq. *Int J Biol Sci*, 15(9), 1977–1992. <https://doi.org/10.7150/ijbs.36284>
- Xu, D., & Lu, W. (2020). Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Front Immunol*, 11, 764. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00764>
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W., & Oppenheim, J. J. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*, 23(6), 291–296. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02246-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02246-9)
- Yu, L. X., Yan, L., Yang, W., Wu, F. Q., Ling, Y., Chen, S. Z., Tang, L., Tan, Y. X., Cao, D., Wu, M. C., Yan, H. X., & Wang, H. Y. (2014). Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein. *Nat Commun*, 5, 5256. <https://doi.org/10.1038/ncomms6256>
- Zhang, J., Liu, Z., Zhou, Z., Huang, Z., Yang, Y., Wu, J., & Liu, Y. (2025). HNP-1: From Structure to Application Thanks to Multifaceted Functions. *Microorganisms*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020458>
- Zhao, X., Lu, M., Liu, Z., Zhang, M., Yuan, H., Dan, Z., Wang, D., Ma, B., Yang, Y., Yang, F., Sun, R., Li, L., & Dang, C. (2022). Comprehensive analysis of alfa

- defensin expression and prognosis in human colorectal cancer. *Front Oncol*, 12, 974654. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.974654>
- Zhong, C., Wang, W., Yao, Y., Lian, S., Xie, X., Xu, J., He, S., Luo, L., Ye, Z., Zhang, J., Huang, M., Wang, G., Wang, Y., Lu, Y., & Fu, C. (2025). TGF-beta secreted by cancer cells-platelets interaction activates cancer metastasis potential by inducing metabolic reprogramming and bioenergetic adaptation. *J Cancer*, 16(4), 1310–1323. <https://doi.org/10.7150/jca.103757>
- Zhou, L., Zhang, Z., Tian, Y., Li, Z., Liu, Z., & Zhu, S. (2023). The critical role of platelet in cancer progression and metastasis. *Eur J Med Res*, 28(1), 385. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01342-w>
- Zhou, Y., Cheng, S., Fathy, A. H., Qian, H., & Zhao, Y. (2018). Prognostic value of platelet-to-lymphocyte ratio in pancreatic cancer: a comprehensive meta-analysis of 17 cohort studies. *Onco Targets Ther*, 11, 1899–1908. <https://doi.org/10.2147/OTT.S154162>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00172

Matrícula: 2163802008

Defensinas plaquetarias como mediadores de la actividad pro-tumoral en cáncer de páncreas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 4 del mes de diciembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. DIDDIER GIOVANNI PRADA ORTEGA
DRA. MAGALI ESPINOSA CASTILLA
DRA. KARLA ITZEL VAZQUEZ SANTILLAN
DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR



JONATHAN GONZALEZ RUIZ
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: JONATHAN GONZALEZ RUIZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. DIDDIER GIOVANNI PRADA ORTEGA

VOCAL

DRA. MAGALI ESPINOSA CASTILLA

VOCAL

DRA. KARLA ITZEL VAZQUEZ SANTILLAN

SECRETARIO

DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR