



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Hemostasia del desarrollo: NUEVOS MECANISMOS  
DE REGULACIÓN DE LA REACTIVIDAD  
PLAQUETARIA EN NEONATOS**

**D<sup>a</sup>. Eva Caparrós Pérez**

**2017**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA**  
*Facultad de Medicina*

Los trabajos de investigación llevados a cabo en la presente memoria de Tesis Doctoral han sido financiados por el proyecto “NUEVOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA EN NEONATOS”, proyecto de Investigación en Salud financiado por el **Instituto de Salud Carlos III (PI14/01956)**.

La autora de esta memoria ha disfrutado durante el periodo de Tesis de varios contratos de investigación financiados por el Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital General Universitario José María Morales Meseguer y de una beca predoctoral concedida por la **Fundación Séneca (19841/FPI/15)**.



*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.*

**Albert Einstein**

*“La ciencia la hacen personas, donde sea, en una buhardilla, cuando tienen el genio investigador, y no los laboratorios, por ricos que se construyan y se doten”*

**Marie Curie**

*“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar.”*

**Hipatia**

*“No temas a las dificultades: lo mejor surge de ellas.”*

**Rita Levi–Montalcini**



*A mis padres*

*A Juanjo*

*A Óliver*



# ***ÍNDICE***

---



|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN</b>  | <b>19</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | <b>25</b> |
| <b>1. Hemostasia</b>  | <b>27</b> |
| <b>2. La plaqueta</b>   | <b>28</b> |
| 2.1. Estructura de la plaqueta  | 28        |
| 2.2. Fisiología plaquetaria   | 29        |
| 2.3. Mecanismos post-transcripcionales y traduccionales en plaquetas  | 32        |
| 2.3.1. Plaquetas y RNA mensajeros   | 32        |
| 2.3.2. Plaquetas y microRNA   | 34        |
| <b>3. Las plaquetas neonatales: Elementos clave de la hemostasia primaria en el sistema hemostático en desarrollo</b> | <b>38</b> |
| 3.1. Trombocitopenia neonatal   | 38        |
| 3.2. Megacariopoyesis y trombopoyesis neonatal: Producción plaquetaria en neonatos                                    | 39        |
| 3.3. Función plaquetaria neonatal   | 41        |
| 3.4. Hemostasia neonatal en sangre total  | 44        |
| 3.5. Limitaciones en el estudio de la fisiología plaquetaria neonatal   | 48        |
| <b>4. Importancia del estudio de la reactividad plaquetaria neonatal</b>  | <b>49</b> |
| 4.1. Riesgo de sangrado   | 49        |
| 4.2. Medicina transfusional: Práctica transfusional en neonatos   | 50        |
| 4.3. Medicina transfusional: Expansión de plaqueta ex vivo  | 53        |
| <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>  | <b>55</b> |
| <b>CAPÍTULOS</b>  | <b>59</b> |
| <b>Capítulo I: COMPARACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA PLAQUETARIO EN NEONATOS Y ADULTOS</b>                                    | <b>61</b> |
| <b>1. Introducción</b>  | <b>63</b> |
| <b>2. Materiales y Métodos</b>  | <b>64</b> |
| 2.1. Obtención de muestras de sangre  | 64        |
| 2.2. Obtención de plaquetas ultrapuras  | 65        |
| 2.3. Aislamiento y purificación de RNA total. Análisis de la contaminación leucocitaria.                              | 66        |
| 2.4. Microarrays  | 66        |
| 2.5. Análisis estadístico y de rutas de los datos de los microarrays  | 67        |
| 2.6. Comparación de las plataformas de microarrays  | 68        |
| 2.7. Validación de los datos de microarray por qRT-PCR  | 68        |
| <b>3. Resultados</b>  | <b>69</b> |
| 3.1. Pureza plaquetaria y calidad del RNA   | 69        |
| 3.2. Análisis comparativo de las plataformas de microarrays   | 70        |
| 3.3. Análisis comparativo con otros estudios de microarrays de transcritos plaquetarios                               | 71        |
| 3.4. Los perfiles de transcriptoma plaquetario de neonatos y adultos revelan genes comunes altamente expresados       | 73        |
| 3.5. Identificación de mRNA diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo plaquetario humano                  | 75        |
| 3.6. Validación de los datos del microarray   | 78        |
| 3.7. Análisis de rutas biológicas   | 79        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4. Discusión</b>  | <b>81</b>  |
| <b>Capítulo II: COMPARACIÓN DEL PERFIL DE MIRNA PLAQUETARIOS EN NEONATOS Y ADULTOS</b>   | <b>87</b>  |
| <b>1. Introducción</b>   | <b>89</b>  |
| <b>2. Materiales y Métodos</b>   | <b>90</b>  |
| 2.1. Obtención de muestras   | 90         |
| 2.1.1. Líneas celulares  | 90         |
| 2.1.2. Plaquetas ultrapuras de neonatos y adultos  | 90         |
| 2.2. Array e identificación de sitios de unión in silico a los mRNA de interés   | 91         |
| 2.3. Experimentos de transfección  | 92         |
| 2.4. Aislamiento de RNA  | 93         |
| 2.5. Medida de mRNA y miRNA  | 93         |
| 2.5.1. En líneas celulares   | 93         |
| 2.5.2. En plaquetas  | 94         |
| 2.6. Medida de los niveles proteicos de los genes de interés   | 94         |
| 2.7. Análisis estadístico  | 95         |
| <b>3. Resultados</b>   | <b>95</b>  |
| 3.1. Los resultados del array muestran expresión diferencial de miRNA entre plaquetas de adulto y neonato  | 95         |
| 3.2. La búsqueda in silico de potenciales dianas revela miRNA con capacidad para unirse a genes plaquetarios   | 98         |
| 3.3. Validación de los niveles de expresión de los miRNA y mRNA seleccionados  | 101        |
| 3.4. Los estudios in vitro no apuntan a una regulación de los genes de interés por parte de ninguno de los miRNA estudiados  | 104        |
| <b>4. Discusión</b>  | <b>108</b> |
| <b>Capítulo III: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN SECRECIÓN Y SPREADING PLAQUETARIO EN NEONATOS Y ADULTOS: MAQUINARIA SNARE Y TUBULINA-<math>\beta</math>1</b> | <b>113</b> |
| <b>1. Introducción</b>   | <b>115</b> |
| <b>2. Materiales y métodos</b>   | <b>117</b> |
| 2.1. Obtención de muestras y extracción de mRNA  | 117        |
| 2.2. Ensayos de citometría de flujo  | 117        |
| 2.3. Análisis de expresión génica  | 118        |
| 2.4. Inmunotransferencia   | 118        |
| 2.5. Aislamiento de exosomas   | 119        |
| 2.6. Microscopía electrónica de transmisión de exosomas  | 120        |
| 2.7. Ensayos de microscopía de fluorescencia   | 120        |
| 2.8. Genotipado TUBB1 Q43P   | 122        |
| 2.9. Ensayos de microscopía electrónica  | 122        |
| 2.10. Análisis estadístico   | 123        |
| <b>3. Resultados</b>   | <b>123</b> |
| 3.1. Los componentes del complejo SNARE y sus reguladores están infraexpresados en plaquetas neonatales  | 123        |
| 3.2. Los exosomas de plasma neonatal poseen menor contenido proteico y son de menor tamaño que los de plasma de adulto   | 126        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3. La adhesión estática y el spreading están reducidos en plaquetas neonatales   | 128        |
| 3.4. Las plaquetas de neonato muestran expresión reducida de tubulina- $\beta$ 1   | 131        |
| 3.5. Efecto de la expresión reducida de tubulina- $\beta$ 1 en la morfología de las plaquetas neonatales                             | 133        |
| 3.6. El análisis de ultraestructura refleja la exocitosis defectuosa de las plaquetas neonatales                                     | 134        |
| 3.7. Estudios morfométricos en plaquetas neonatales en reposo y activadas  | 136        |
| <b>4. Discusión</b>  | <b>138</b> |
| <b><i>Capítulo IV: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL PLAQUETARIA EN NEONATOS Y ADULTOS: PROTEÍNAS G</i></b> | <b>145</b> |
| <b>1. Introducción</b>   | <b>147</b> |
| <b>2. Materiales y Métodos</b>   | <b>150</b> |
| 2.1. Cuantificación de niveles de proteínas G mediante qRT-PCR y western blot  | 150        |
| 2.2. Ensayos de activación de $G\alpha_s$  | 151        |
| 2.3. Análisis estadístico  | 152        |
| <b>3. Resultados</b>   | <b>152</b> |
| 3.1. Las plaquetas de neonato y adulto presentan diferencias en los niveles de proteínas G   | 152        |
| 3.2. Las plaquetas de neonato parecen mostrar un mayor grado de activación de $G\alpha_s$  | 155        |
| <b>4. Discusión</b>  | <b>156</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>159</b> |
| <b>REFERENCIAS</b>   | <b>163</b> |
| <b>ANEXO I</b>   | <b>177</b> |
| <b>ANEXO II</b>  | <b>205</b> |
| <b>APÉNDICE I</b>  | <b>215</b> |
| <b>APÉNDICE II</b>   | <b>221</b> |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | <b>229</b> |



# ***RESUMEN***

---



Las alteraciones en la reactividad plaquetaria se han asociado con el desarrollo de procesos trombóticos y hemorrágicos. Los neonatos, especialmente los pretérmino, tienen mayor incidencia de hemorragia intracraneal (HIC) que cualquier otro grupo de edad y, aunque su patogenia es multifactorial, la hiporreactividad de sus plaquetas podría ser un factor contribuyente. Los mecanismos genéticos y moleculares responsables de la hiporreactividad de las plaquetas neonatales están pobremente caracterizados, por tanto su estudio tendría una gran relevancia clínica para este grupo de población, pero además también supondría un modelo idóneo donde investigar los mecanismos reguladores de la reactividad plaquetaria, aún poco caracterizados, e identificar nuevas dianas terapéuticas. El objetivo general de esta Tesis era identificar nuevos mecanismos moleculares causantes de las diferencias funcionales entre las plaquetas de neonatos (PN) y adultos (PA), lo que se abordó a través del estudio de 4 objetivos específicos: (1) estudio diferencial de la expresión génica en PN vs. PA, (2) estudio del perfil de microRNA (miRNA) en PN vs. PA y de su posible papel regulador del transcriptoma plaquetario neonatal, (3) evaluación de las diferencias en adhesión y secreción en PN vs. PA, y (4) evaluación de la expresión y funcionalidad de proteínas G y los reguladores de su señalización (RGS) en PN.

Para ello se aislaron plaquetas de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos nacidos a término, así como de sangre periférica de un grupo de adultos control sanos. Con RNA procedente de ambos grupos se realizaron dos arrays, uno de expresión génica y otro de miRNA. Las diferencias de expresión en los mRNA y miRNA se validaron en muestras de PN y PA mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), realizándose experimentos de transfección para las parejas miRNA-mRNA validadas. A continuación se estudiaron las diferencias de secreción entre PN y PA mediante qRT-PCR y western blot de elementos del complejo SNARE y de la tubulina- $\beta$ 1. Así mismo se realizaron experimentos de cinética de adhesión, estudios morfométricos pre- y post-activación plaquetaria mediante microscopía de fluorescencia y electrónica y evaluación de las poblaciones de exosomas en plasma de

neonatos y adultos. Las diferencias entre PN y PA en los niveles de expresión y/o funcionalidad de proteínas G se estudiaron mediante qRT-PCR, western blot y ensayos de activación.

Los resultados del array de expresión génica revelaron que existían 201 genes diferencialmente expresados entre PN y PA, 162 sobreexpresados y 39 infraexpresados. Entre los más sobreexpresados en PN se encontraron principalmente: genes que codificaban a proteínas de origen eritroide o asociados con la síntesis y degradación de proteínas. Para el caso de los infraexpresados en PN se observó predominio de los implicados en transporte/metabolismo de calcio, reorganización del citoesqueleto de actina, señalización celular y regulación del ciclo celular. Las rutas más enriquecidas estaban relacionadas con el ribosoma, el proteasoma y el espliceosoma o la proteólisis mediada por ubiquitinación entre otras. Los datos del array de miRNA mostraron un total de 200 miRNA diferencialmente expresados, implicados en rutas relacionadas con la biología del desarrollo, la hemostasia y la funcionalidad plaquetaria entre otras. Partiendo del array de expresión génica se seleccionaron 4 genes con relevancia funcional en plaquetas (*ADRA2A*, *GNAZ*, *RANBP10* y *STX11*) y para ellos, mediante algoritmos, se seleccionaron 7 miRNA con potencial para regularlos, sin embargo, a pesar de las predicciones *in silico* los ensayos *in vitro* no mostraron regulación de ninguno de los 4 mRNA seleccionados por parte de los miRNA estudiados, debido en parte a las limitaciones del estudio *in silico*. En cuanto al objetivo 3, se encontró, en PN vs. PA, infraexpresión de alguno de los componentes del complejo SNARE (*Stx11*) y su regulador (*Munc18b*) lo que podría justificar en parte los defectos en secreción observados en las PN. También observamos una reducción en la adhesión estática y *spreading* en PN vs. PA, así como diferencias morfológicas en las PN tras la activación y diferencias de tamaño en los exosomas derivados de PN con respecto a los de adulto. Por último, los resultados del objetivo 4 mostraron diferencias de expresión de proteínas G y uno de sus reguladores entre PN y PA: las PN expresaron menos  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_z$  y *RGS18* y más  $G\alpha_s$  y  $G\alpha_{i2}$ . Además, las PN también mostraron un mayor grado de activación de  $G\alpha_s$ .

En conclusión, los resultados obtenidos en la presente Tesis identifican, y en algunos casos aclaran, diversos mecanismos moleculares que subyacen a la hiporreactividad de la plaqueta neonatal. Son necesarios estudios futuros para vincular estos mecanismos a procesos patológicos en la población infantil, extrapolarlos a la población adulta y traducirlos en aplicaciones prácticas.



# ***INTRODUCCIÓN***

---



## 1. Hemostasia

La hemostasia es un mecanismo vital que permite al cuerpo humano reaccionar a daños en las paredes de los vasos y controlar el flujo sanguíneo. El equilibrio en el sistema hemostático se mantiene gracias a un delicado balance entre fuerzas opuestas, factores anti- y procoagulantes que permiten reaccionar a las hemorragias a la vez que se evita la formación de un trombo patológico. La hemostasia primaria comprende la formación del tapón plaquetario o coágulo primario. La hemostasia secundaria, comúnmente conocida como coagulación, es un proceso enzimático complejo que incluye el paso de fibrinógeno a fibrina, la cual es capaz de polimerizar y entrecruzarse formando el coágulo secundario, estable e insoluble, en el que quedarían atrapadas las plaquetas. El cese de la hemorragia ocurre por el esfuerzo combinado de la hemostasia primaria y secundaria y, de manera casi simultánea, el sistema anticoagulante se activa para limitar la extensión del coágulo a la zona dañada, evitando así un crecimiento desmesurado y la formación de un trombo patológico.

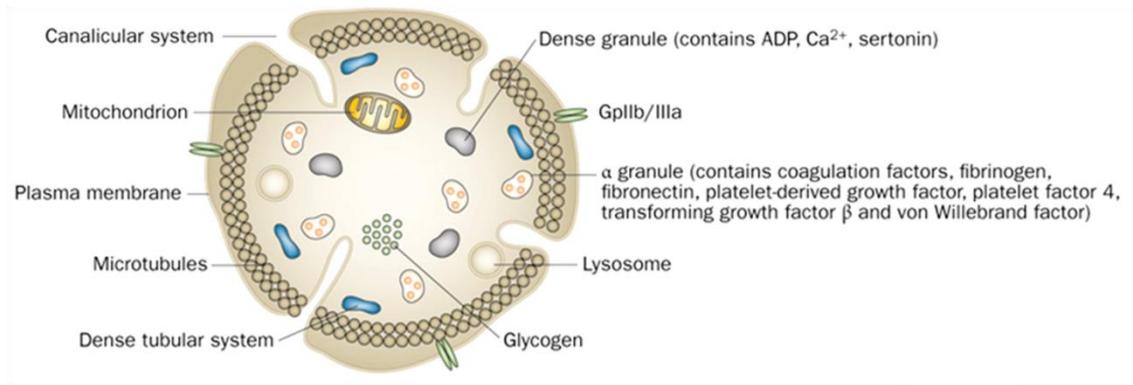
El sistema hemostático neonatal es cuantitativamente y cualitativamente distinto del de un adulto. La regulación del sistema hemostático durante el desarrollo es un proceso dinámico, dependiente de la edad, que comienza ya a nivel embrionario en el útero. Así, el término “hemostasia del desarrollo” se aplica al periodo de tiempo en el que el sistema hemostático neonatal existe en un balance continuo entre factores pro- y anticoagulantes. Sin embargo, mientras los componentes del sistema hemostático secundario maduran de una manera predecible, y los rangos de referencia “normales” de los factores anticoagulantes y procoagulantes<sup>1</sup> son bien conocidos en neonatos de diferentes edades gestacionales, la hemostasia primaria (de la que las plaquetas son un componente clave) ha sido escasamente estudiada.

## 2. La plaqueta

### 2.1. Estructura de la plaqueta

A finales del siglo XIX Giulio Bizzozero descubrió la plaqueta y su implicación en hemostasia y trombosis<sup>2,3</sup>, poco después James Homer Wright demostró que éstas procedían de los megacariocitos<sup>4</sup>. Desde entonces no sólo se ha seguido investigando para esclarecer el papel central de la plaqueta en trombosis y hemostasia, sino que además recientemente se ha descubierto su implicación en procesos tales como inflamación<sup>5</sup>, defensa antimicrobial<sup>6</sup>, reparación de heridas<sup>7</sup>, angiogénesis<sup>8</sup>, crecimiento de tumores y metástasis<sup>9,10</sup>.

Las plaquetas son pequeños fragmentos subcelulares, carentes de núcleo, con un diámetro de 2 a 5  $\mu\text{m}$  que circulan por la sangre alrededor de 10 días<sup>11,12</sup> a una concentración de  $150\text{-}400 \times 10^9$  por litro. En cuanto a sus características estructurales, las plaquetas poseen tres tipos de gránulos secretores: alfa ( $\alpha$ ), densos ( $\delta$ ) y lisosomas, que se diferencian en su morfología, cinética de exocitosis, número y contenido. Los gránulos  $\alpha$ , que son los orgánulos más numerosos de las plaquetas (40-80 por plaqueta), contienen polipéptidos (factores hemostáticos, de crecimiento y angiogénicos, citoquinas, y proteasas), los gránulos  $\delta$ , de morfología variable y de menor tamaño y número que los  $\alpha$  (3-6 por plaqueta), contienen moléculas pequeñas [adenosina difosfato (ADP), calcio y serotonina], y los lisosomas (0-3 por plaqueta) contienen enzimas hidrolíticas ( $\beta$ -hexosaminidasa y catepsinas)<sup>13-15</sup>. Las plaquetas también poseen mitocondrias, citoesqueleto, una banda marginal compuesta por microtúbulos de tubulina, un sistema canalicular conectado con la membrana plasmática, y un sistema tubular denso<sup>16</sup> (Figura 1).



**Figura 1 | Morfología de la plaqueta en estado quiescente.** Reproducida de Martin, *Nature Reviews Cardiology* 2012<sup>17</sup> con permiso.

## 2.2. Fisiología plaquetaria

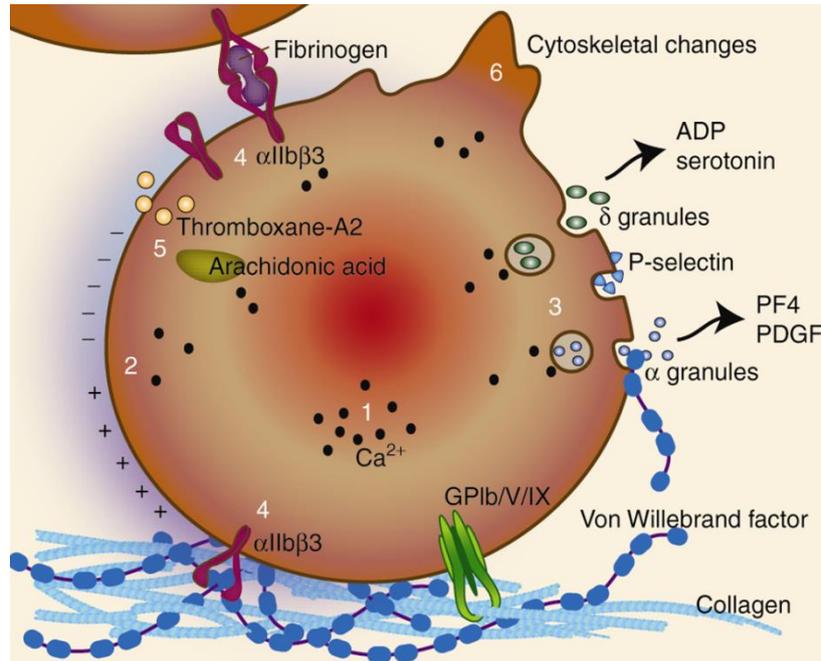
En condiciones fisiológicas, tras el daño endotelial, se produce la adhesión plaquetaria al subendotelio expuesto (Figura 2). Esta etapa inicial del proceso de hemostasia primaria está mediada por interacciones secuenciales del tipo receptor-ligando<sup>18,19</sup>:

- (1) La interacción entre el factor de von Willebrand (FvW) extracelular y el complejo glicoproteico plaquetario (GP) Ib/V/IX permite el reclutamiento inicial de plaquetas en el área lesionada.
- (2) Las interacciones entre la integrina  $\beta 1$  plaquetaria y el colágeno, la laminina y la fibronectina de la matriz extracelular expuesta, así como de la GPVI plaquetaria y el colágeno de la matriz, permiten reforzar la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular dañado.

Tras la adhesión plaquetaria los niveles de calcio intracelular se incrementan lo que conduce a la activación plaquetaria, etapa caracterizada por:

- (1) La exposición de fosfatidilserina en la superficie de la membrana plasmática plaquetaria lo que permite el ensamblaje de los factores de coagulación.

(2) La generación de Tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) a partir de ácido araquidónico.

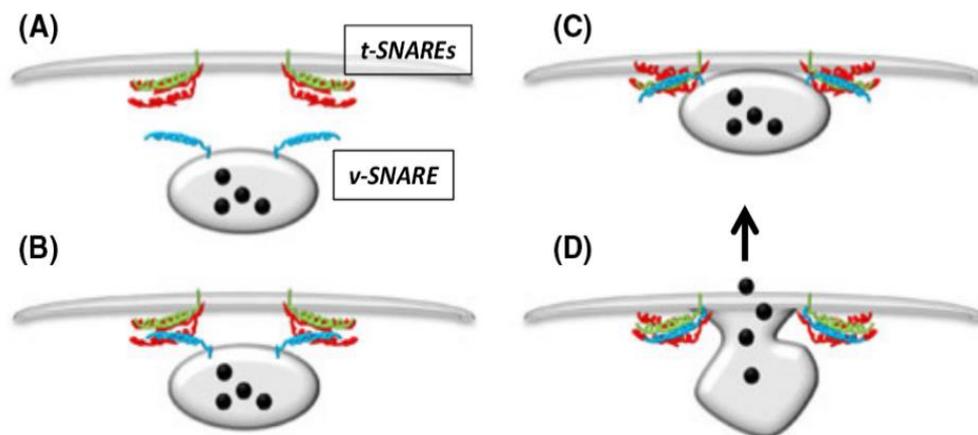


**Figura 2| Mecanismo de adhesión, activación y secreción plaquetaria.** Reproducida de Haley, *Pediatr Res.* 2014<sup>20</sup> con permiso.

(3) La reorganización del citoesqueleto para incrementar la superficie de área plaquetaria adherida. Las plaquetas, con morfología discoide en estado de reposo, son capaces de cambiar su forma tras la activación, para lo cual necesitan de la polimerización del citoesqueleto de actina y de la contracción de la banda marginal plaquetaria, compuesta por microtúbulos constituidos por heterodímeros de  $\alpha\beta$  tubulina (siendo la isoforma  $\beta 1$  el componente mayoritario). La activación plaquetaria causa la emisión por parte de la plaqueta de varios tipos de protuberancias celulares<sup>21</sup>, las cuales tienen distintas funciones fisiológicas: los filopodios, finos, alargados y formados por haces de filamentos de actina<sup>22</sup>, conectan unas plaquetas con otras en el trombo en formación<sup>21</sup>, y los lamelipodios, que se extienden más lateralmente y permiten a la plaqueta aumentar la superficie en contacto con el área de lesión<sup>23</sup>, están formados por una red de filamentos de actina entrecruzados<sup>22</sup>. Este proceso de

adhesión y extensión de la plaqueta, conocido como *spreading*, junto con la centralización de gránulos  $\alpha$  y  $\delta$ , promovida por la contracción de la banda marginal de tubulina, son imprescindibles para que tenga lugar la exocitosis o secreción plaquetaria<sup>24</sup>.

(4) La secreción de gránulos  $\alpha$  y  $\delta$ . Esta es una etapa especialmente importante ya que se libera una gran variedad de moléculas (ADP, calcio, serotonina, FvW, factores de coagulación V y VIII y fibrinógeno) que contribuyen a la mayoría de funciones de la plaqueta (adhesión, amplificación del trombo en desarrollo y reparación de tejidos). El proceso de exocitosis (Figura 3) está mediado por los complejos SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) que dirigen la fusión entre las membranas plasmáticas y las membranas de los gránulos secretores, formando un poro de fusión que permite la descarga de contenidos<sup>25</sup>.



**Figura 3 | Modelo molecular de secreción plaquetaria granular.** En respuesta a un estímulo adecuado, las vesículas secretoras se translocan a la membrana plasmática (A) y las *v*- y *t*-SNAREs, residentes en la membrana granular y plasmática respectivamente, comienzan a interactuar (B). La formación del complejo SNARE de prefusión (C) es un proceso energéticamente muy favorable que permite superar las fuerzas iónicas repulsivas entre las bicapas lipídicas, y que facilita la fusión de membranas que da lugar a la secreción de contenido granular (D). Reproducida de Golebiewska, *BJH*, 2013<sup>26</sup> con permiso.

(5) Cambio del receptor GPIIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3) de la membrana plaquetaria a una conformación de alta afinidad por el FvW y el fibrinógeno. Este último paso, permite a la plaqueta establecer interacciones estables con el fibrinógeno, el FvW y la fibronectina, y por consiguiente con otras plaquetas (agregación plaquetaria). Se trata pues de un elemento clave en el desarrollo del agregado plaquetario, el producto final de la hemostasia primaria<sup>18</sup>.

La hemostasia primaria se logra por tanto por medio de una red sinérgica de interacciones receptor-ligando que promueven la adhesión y activación plaquetarias simultáneas, la secreción que permite activar a plaquetas vecinas, su agregación, y por último, la formación del coágulo primario que servirá como base para el ensamblaje de los factores de coagulación en la segunda etapa de la hemostasia.

### **2.3. Mecanismos post-transcripcionales y traduccionales en plaquetas**

#### *2.3.1. Plaquetas y RNA mensajeros*

Una de las características clave de las plaquetas es que carecen de núcleo, debido a lo cual tradicionalmente se han considerado incapaces de realizar expresión génica regulada y síntesis de proteínas. La primera prueba de que las plaquetas podían sintetizar proteínas *de novo* la aportaron Warshaw y col. a finales de la década de los 60<sup>27</sup>, cuando demostraron que las plaquetas incorporaban [<sup>14</sup>C]leucina conforme oxidaban glucosa y que la puromicina, un inhibidor de la síntesis proteica, reducía la incorporación de este aminoácido, lo que supuso el primer indicio de que las plaquetas sintetizaban proteínas. Muy poco tiempo después Booyse y Rafelson publicaron dos trabajos que revelaban que las plaquetas incorporaban aminoácidos a proteínas contráctiles<sup>28,29</sup> y que poseían RNA mensajeros (mRNA) estables, sugiriendo que podría existir una relación entre la estabilidad de esos mRNA y la vida media de la plaqueta<sup>25</sup>. Posteriormente Booyse y Steiner de forma independiente desarrollaron sistemas libres de

células para demostrar que las plaquetas contenían ribosomas y otros constituyentes necesarios para la síntesis proteica y que esta maquinaria era funcional<sup>30,31</sup>. Durante las siguientes 3 décadas continuaron las investigaciones en esta área, sin embargo, el avance en la comprensión de mecanismos y significado biológico de la síntesis de proteínas plaquetarias ha sido controvertido ya que algunos investigadores seguían cuestionándose la importancia que la síntesis de proteínas pudiera tener en la función plaquetaria. Durante los últimos 20 años varios estudios han revelado que las plaquetas son capaces de realizar tanto síntesis proteica constitutiva como síntesis en respuesta a estímulos. Así, Rosenwald y col. demostraron que las plaquetas expresan de forma constitutiva dos factores de iniciación de la traducción, el F4E y eIF2 $\alpha$ , los cuales facilitan la síntesis continua de proteínas en plaquetas almacenadas<sup>32</sup>. Un trabajo posterior de Thon y col. reveló que durante el almacenamiento las plaquetas también sintetizaban integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ <sup>33</sup>. Por otro lado Weyrich y col. encontraron que las plaquetas podían realizar síntesis dependiente de activación de varias proteínas, incluyendo a Bcl-3, IL1 $\beta$  y al factor tisular<sup>34-36</sup> y que esta traducción dependiente de señalización podía estar controlada por la maquinaria de *splicing* plaquetaria<sup>37</sup> o por un mecanismo vía mTor<sup>34</sup>. De manera que los descubrimientos hasta la fecha demuestran que las plaquetas han desarrollado mecanismos para procesar y traducir eficientemente su abundante y complejo transcriptoma (entre 4000 y 6000 transcritos)<sup>38,39</sup> a proteínas y actualmente la posesión de mecanismos post-transcripcionales y traduccionales especializados se considera una parte normal del repertorio funcional plaquetario.

Tanto la maquinaria molecular necesaria para la traducción, como los mRNA con los que cuentan las plaquetas, han sido aportados por los megacariocitos de los que provienen. Cecchetti y col. publicaron un trabajo en el que mostraban que el perfil de transcritos en megacariocitos y plaquetas es distinto y concluían que el megacariocito posee un mecanismo para clasificar y entregar selectivamente ciertos mRNA a las plaquetas. Además, proponían un modelo hipotético de cómo el mRNA de los megacariocitos podría distribuirse dentro de las

plaquetas a través de las extensiones de las proplaquetas durante la trombopoyesis. Según este modelo el mRNA se sintetiza en el núcleo del megacariocito y a continuación, se une a una proteína de unión a mRNA (mRBP=*mRNA binding protein*), formando un complejo que se transloca al citoplasma y que viaja por los microtúbulos a través de la extensión de la proplaqueta, de forma análoga a como ocurre el transporte de mRNA a través de axones y dendritas en la neurona. El modelo se fundamenta en el hecho de que Cecchetti y col. demostraron que tanto los megacariocitos como las plaquetas expresan varios genes como CASC3, STAU1, STAU2 y EIF4A3 que codifican proteínas implicadas en el transporte de mRNA en neuronas<sup>40,41</sup>. Algunos de los transcritos heredados por las plaquetas se expresarán constitutivamente, mientras que otros lo harán en función del grado de activación. Los transcritos que fallan en unirse a la mRBP, se trasladan al retículo endoplásmico rugoso (RER) donde se traducen. Las proteínas resultantes se empaquetan en gránulos secretores que se envían a las plaquetas en formación.

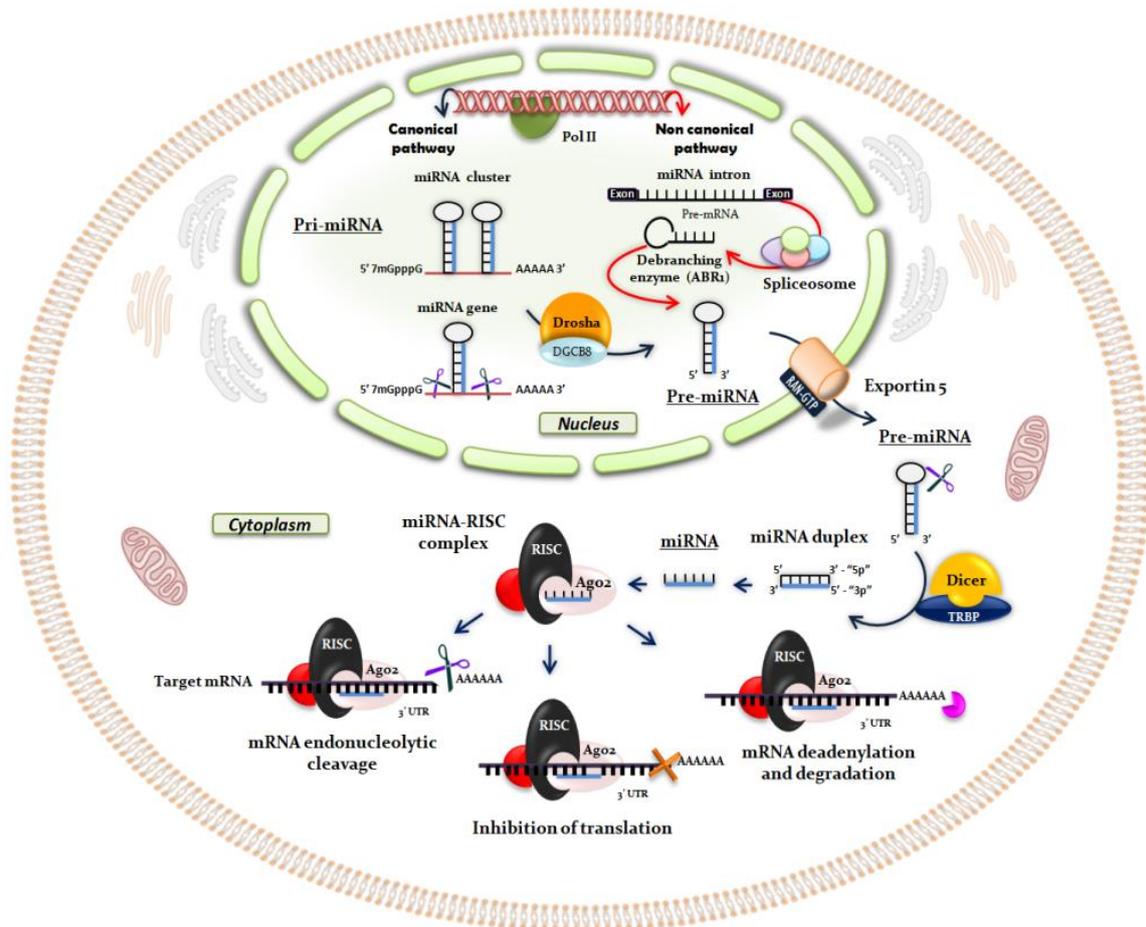
### 2.3.2. Plaquetas y *microRNA*

Se estima que la proporción del genoma humano que se transcribe a RNA alcanza el 85% pero sólo un 3% se traduce a proteínas<sup>42</sup>. Actualmente se sabe que el RNA no codificante (ncRNA) regula la expresión de la fracción codificante del genoma a varios niveles incluyendo transcripción, procesamiento y traducción<sup>43</sup>. Las plaquetas son ricas en muchas clases de RNA no codificantes, principalmente en *microRNA* (miRNA)<sup>44,45</sup>, una familia conservada de RNA monocatenarios pequeños de ~22nt de longitud en su forma madura<sup>46</sup> que regulan alrededor del 60% de los genes humanos<sup>47</sup>.

La biogénesis de miRNA puede dividirse en dos etapas (Figura 4):

(1) La transcripción de miRNA ocurre en el núcleo por medio de la RNA polimerasa II<sup>48</sup>, generando en un primer momento una estructura en horquilla de varios cientos de

nucleótidos de longitud denominada miRNA primario (pri-miRNA) que es procesada por la ribonucleasa (RNAsa) Drosha<sup>49</sup> hasta una estructura en horquilla más pequeña (70-90 nt) denominada miRNA precursor (pre-miRNA). Los pre-miRNA son transportados entonces hasta el citoplasma mediante la Exportina 5<sup>50</sup>.

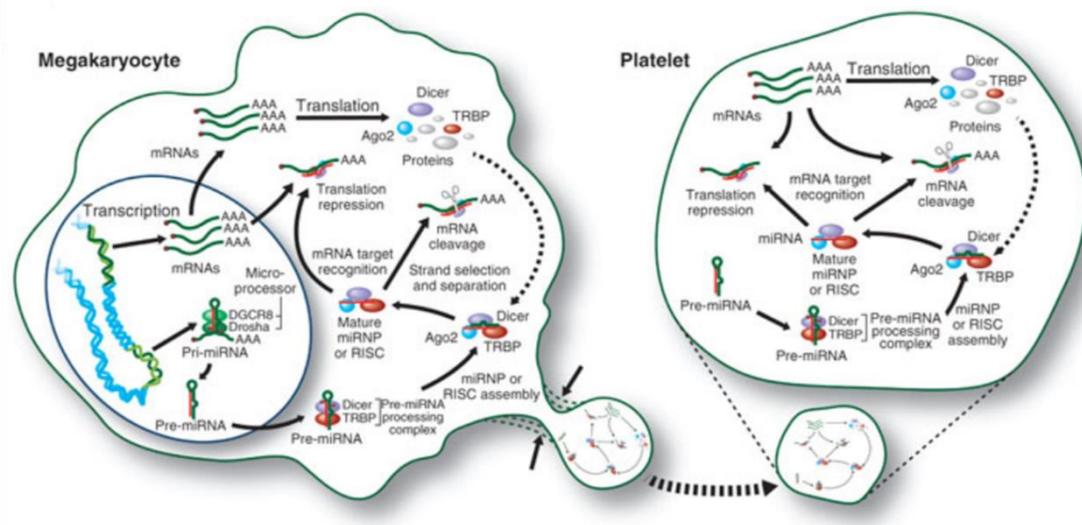


**Figura 4| Biogénesis de miRNA y mecanismo de regulación de los mRNA Diana.** Reproducida de Teruel-Montoya, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2015<sup>51</sup> con permiso.

(2) Una vez en el citoplasma los pre-miRNA son procesados por la ribonucleasa (RNAsa) Dicer hasta miRNA de doble cadena de ~22nt de longitud<sup>52</sup>. A continuación una de las dos hebras de miRNA será incorporada al complejo proteico RISC (RNA-induced silencing complex) formando el complejo mi-RISC (miRNA-Induced Silencing Complex) para dirigir el silenciamiento del mRNA diana<sup>53</sup>.

El complejo mi-RISC comúnmente se une a las regiones 3'-untranslated region (3'-UTR) del mensajero diana sin embargo, aunque no es lo normal, también puede unirse a las regiones 5'-UTR, causando descomposición<sup>54</sup> o estabilización<sup>55</sup>, o bien a las regiones codificantes de su diana<sup>56</sup> lo que pone de manifiesto la alta complejidad de las interacciones miRNA-mRNA. El grado de complementariedad entre el miRNA y el extremo 3'UTR del mRNA diana determina cómo va a producirse la acción represora del miRNA: si la complementariedad es perfecta (como ocurre siempre en las plantas) se produciría por degradación del mensajero y, en el caso de que fuese parcial, podría producirse además inhibición de la traducción, aunque el mecanismo mayoritario en animales seguiría siendo la degradación<sup>57-60</sup>(Figura 4).

Durante la trombopoyesis, las plaquetas heredan de los megacariocitos tanto miRNA, como una vía de maduración de los mismos, parcial y carente de los pasos iniciales que transcurren en el núcleo pero, no obstante, todavía funcional<sup>61</sup> (Figura 5)



**Figura 5] Modelo de Landry y col.** Reproducida de Landry, *Nature Structural & Molecular Biology* 2009<sup>61</sup> con permiso.

Aunque se ha descrito que las plaquetas contienen casi 500 miRNA distintos<sup>62</sup> su papel es, en la mayoría de los casos, desconocido. En los últimos años, se ha sugerido que

determinados miRNA plaquetarios son biológica y clínicamente relevantes como biomarcadores de reactividad plaquetaria<sup>63,64</sup>. De este modo, Nagalla y col. descubrieron que los miRNA miR-200b, miR-495 y miR-107 son capaces de reprimir la expresión del mRNA de genes diana importantes en reactividad plaquetaria (miR-200b:PRKAR2B, miR-495:KLHL5, y miR-107: CLOCK). Los autores mostraron que las plaquetas carentes de PRKAR2B, subunidad reguladora de la vía inhibitoria de la protein kinasa A<sup>65</sup>, eran hiporreactivas, y comprobaron mediante estudios de transfección cómo el miR200b modulaba la expresión de PRKAR2B. Por su parte, Landry y col. también describieron que el miR-223 (el más abundante en plaquetas) podría unirse al mRNA del receptor del ADP, el P2Y<sub>12</sub>, regulando sus niveles<sup>61</sup>. Dada la relación existente entre funcionalidad plaquetaria alterada, desórdenes trombóticos y enfermedades cardiovasculares, en los últimos años ha crecido el interés por encontrar el posible papel de los miRNA plaquetarios como biomarcadores de susceptibilidad a enfermedad, pronóstico y tratamiento. Así se ha descubierto un patrón de expresión de miRNA diferente entre plaquetas de pacientes que han sufrido un infarto de miocardio con elevación de segmento ST (STEMI) y los no-STEMI<sup>66</sup>. También se han relacionado los niveles circulantes de miR-328 con la fibrilación auricular<sup>67</sup> y los de miR-126 con enfermedad coronaria<sup>68</sup>. Por otro lado los miRNA plaquetarios parecen tener un importante papel no sólo en la regulación de la propia funcionalidad plaquetaria sino también sobre otros tipos celulares, “a distancia”. Aunque los miRNA muestran localización principalmente intracelular, han sido además detectados en suero y plasma<sup>69</sup> transportados en diversos tipos de micropartículas<sup>70-72</sup> las cuales tienen mayoritariamente origen plaquetario<sup>73</sup> y son liberadas sobre todo tras activación<sup>74</sup>. Recientemente ha sido descubierto que miR-223 contenido en micropartículas derivadas de plaquetas activadas con trombina es capaz de regular *in vitro* la expresión génica de células HUVEC a nivel de mRNA<sup>75</sup> e incluso de inducir apoptosis en este mismo tipo celular<sup>76</sup>. Finalmente, en los últimos años se ha demostrado una implicación de los miRNA en la regulación de la megacario-trombopoyesis<sup>77</sup>.

### **3. Las plaquetas neonatales: Elementos clave de la hemostasia primaria en el sistema hemostático en desarrollo**

#### ***3.1. Trombocitopenia neonatal***

Las plaquetas aparecen en el feto humano en la 5ª semana de gestación, incrementando su número hasta alcanzar las  $150 \times 10^9$  plaquetas/L, al final del primer trimestre de embarazo<sup>78</sup>; y, hasta los valores que se consideran de referencia en el adulto ( $\sim 250 \times 10^9$  plaquetas/L) entre las semanas 22 y 24 de gestación<sup>79-82</sup>. Es por ello que en neonatos, al igual que en adultos, se define trombocitopenia cuando el recuento de plaquetas es inferior a  $150 \times 10^9$  plaquetas/L.

Un reciente y extenso estudio realizado tanto en neonatos a término como pretérmino con edades gestacionales entre las 22 y las 42 semanas, ha puesto de manifiesto que los recuentos de plaquetas, medidos en los primeros tres días de vida, están comprendidos entre las  $100-350 \times 10^9$  plaquetas/L (percentil 5-95%), valor que se incrementa con la edad gestacional<sup>83</sup>. En este mismo estudio, la media del volumen plaquetario medio (VPM) (7-9 fL) tanto en neonatos a término como prematuros es similar a la encontrada en adultos (Figura 6)<sup>83</sup>.

Usando la definición tradicional (recuento plaquetario inferior a  $150 \times 10^9$  plaquetas/L), la incidencia de trombocitopenia en neonatos varía significativamente dependiendo de la población estudiada<sup>84</sup>. Así, mientras la incidencia de trombocitopenia es baja en el momento del nacimiento (< 1%); hasta un 30% de los pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos neonatal (UCIN) desarrollan trombocitopenia en algún momento de su estancia, especialmente durante la primera semana de vida, y de ellos, el 70% son neonatos de muy bajo peso (menos de 1000 g)<sup>85,86</sup>.

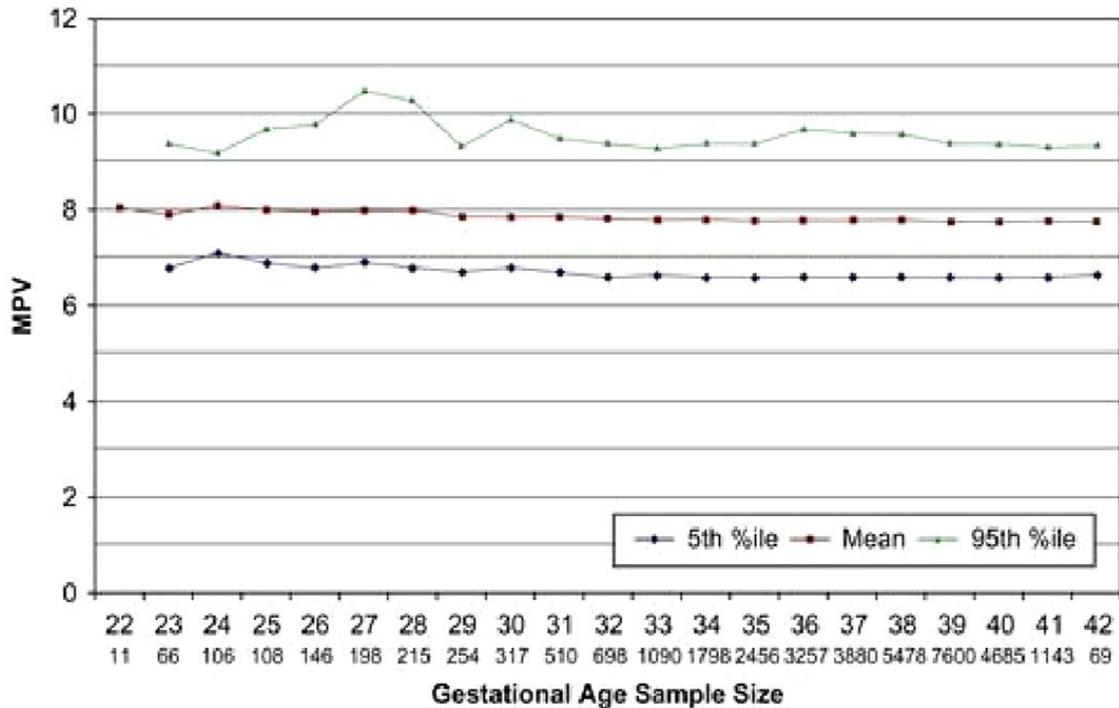


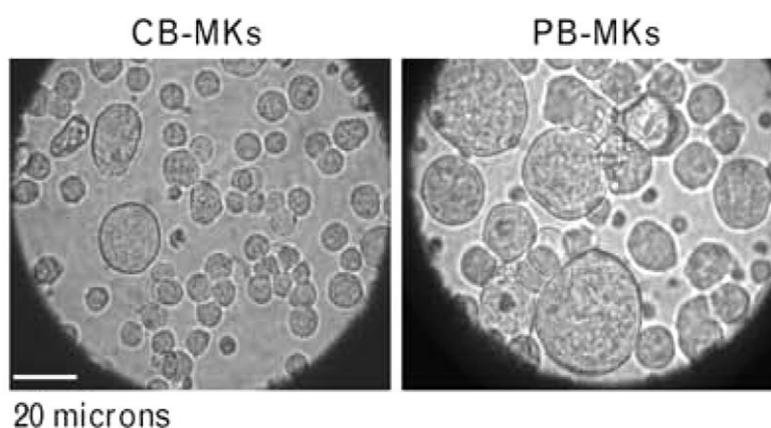
Figura 6| Volumen plaquetario medio en neonatos. Medido en los tres primeros días tras el nacimiento en neonatos de 22 a 42 semanas de edad gestacional. La línea roja indica valores medios, las líneas verde y azul representan los percentiles 5º y 95º respectivamente. Reproducida de Israels, *Platelets*, 2012<sup>87</sup> con permiso.

Las causas de esta mayor incidencia de trombocitopenia entre los neonatos más pequeños y prematuros no se conocen suficientemente, pero se cree que podría deberse a diferencias entre la megacariopoyesis fetal/neonatal y la del adulto<sup>88</sup>.

### 3.2. Megacariopoyesis y trombopoyesis neonatal: Producción plaquetaria en neonatos

La primera evidencia *in vivo* de la existencia de una célula progenitora megacariocítica embrionica-fetal diferente de la del adulto deriva de observaciones clínicas. El desorden mieloproliferativo transitorio (DMT) se caracteriza por una expansión de células con hallazgos megacarioblásticos vista exclusivamente en el periodo neonatal (neonatos con síndrome de Down y mutaciones de *GATA-1*). La trombocitopenia amegacariocítica congénita es un desorden del eje trombopoyetina (Tpo) y su receptor (cMpl) que se presenta de forma distinta en neonatos y adultos.

Los megacariocitos neonatales son más pequeños (Figura 7) y alcanzan menor ploidía que los de adulto (2-4N vs. 16N) y se sabe que el volumen citoplasmático del megacariocito se incrementa en paralelo con la ploidía y se correlaciona con la producción plaquetaria<sup>89</sup>. En consecuencia, los megacariocitos neonatales producen menos plaquetas y proplaquetas por célula que los megacariocitos adultos, a pesar de mostrar niveles similares de maduración citoplasmática. En contraposición, y posiblemente como mecanismo de compensación, los progenitores megacariocíticos fetales/neonatales presentan un mayor potencial proliferativo, así como, una mayor sensibilidad a la trombopoyetina<sup>88</sup>.



**Figura 7 | Tamaño de megacariocitos fetales y neonatales de cordón umbilical (CB-MKs) y de sangre periférica de adulto (PB-MKs).** Fotomicrografía tomada tras 14 días de cultivo con magnificación de 600x. Reproducida de Liu, *Curr Opin Hematol.* 2011<sup>88</sup> con permiso.

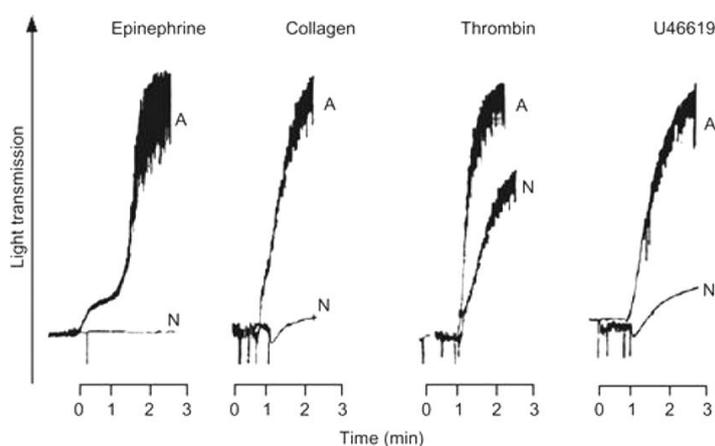
En las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado diferencias notables entre los megacariocitos fetales/neonatales y los del adulto a distintos niveles: transcriptoma<sup>90</sup>; vías de señalización<sup>91</sup>; factores de transcripción y microRNA<sup>88</sup>. A la luz de estos hallazgos, se postula que tanto factores intrínsecos celulares<sup>92,93</sup> como derivados del microambiente donde se generan (hígado fetal vs. médula ósea) contribuyen al fenotipo característico de estos megacariocitos. Hoy en día este fenotipo se entiende más como una forma de adaptación a los más altos requerimientos de plaquetas en un cuerpo en continuo crecimiento, que como un signo de inmadurez. Ante situaciones de incremento en las

demandas, sin embargo, los megacariocitos neonatales aumentan en número pero, a diferencia de los del adulto, son incapaces de aumentar su tamaño<sup>94</sup>, haciéndolos propensos a la trombocitopenia<sup>95-97</sup>

En resumen, al igual que en otras líneas hematopoyéticas (eritroide, macrófagos), en el momento actual, existe suficiente evidencia como para afirmar que los megacariocitos fetales/neonatales son diferentes de los del adulto y producen plaquetas con diferente funcionalidad<sup>98</sup>.

### 3.3. Función plaquetaria neonatal

La primera evidencia de una “disfunción plaquetaria” o de la existencia de diferencias del desarrollo también en la hemostasia primaria entre neonatos y adultos procede de los estudios de agregación en plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido a partir de cordón umbilical de neonatos a término. Así, las plaquetas de neonato presentan, con respecto a las de adulto, agregación retardada, atenuada o disminuida en respuesta a ADP, trombina, epinefrina, colágeno o a U46619, un análogo del tromboxano A<sup>2</sup> (TxA<sub>2</sub>)<sup>99-104</sup> (Figura 8), diferencias que son más marcadas en las plaquetas de los pretérmino<sup>105</sup>. Estos resultados, han sido posteriormente confirmados por medio de agregometría en sangre total<sup>106</sup>.



**Figura 8 | Experimentos de agregación en plaquetas lavadas procedentes de cordón umbilical (N) y adulto (A).** Las plaquetas fueron estimuladas con epinefrina (5µM), colágeno tipo I (2µM), trombina(0.5 U/mL) o U46619 (1µM) Reproducida de Israels, *Platelets*, 2012<sup>87</sup> con permiso.

Resultados similares se obtuvieron en estudios de activación plaquetaria por citometría de flujo. La citometría de flujo en sangre total es una forma bastante exacta de medir la activación plaquetaria que requiere muestras pequeñas de sangre (entre 5 y 100  $\mu$ L) y poca manipulación previa al análisis. La mayoría de los resultados indican una reducción general en la expresión de glicoproteínas de membrana plaquetaria en neonatos prematuros de muy bajo peso al nacimiento con respecto a los neonatos a término<sup>107-117</sup> así como una menor sensibilidad a agonistas tales como ADP (con o sin epinefrina), péptido activador del receptor de trombina (TRAP) o U46619 durante los primeros días de vida de neonatos a término<sup>107-113,115,118,119</sup>, manifestada por ejemplo como una menor expresión de P-selectina en comparación con las plaquetas de adultos. La secreción de serotonina en respuesta a colágeno se encuentra también marcadamente mermada<sup>120</sup>.

Es importante destacar que la hiporreactividad de las plaquetas neonatales se ha demostrado tanto en sangre de cordón como en sangre periférica de neonato en el primer día de vida postnatal, siendo más acentuada en neonatos pretérmino que a término<sup>107-113,115,118,119</sup>. Así, el grado de hiposensibilidad de las plaquetas neonatales está relacionado con la edad gestacional (mayor hiporrespuesta a menor número de semanas de gestación<sup>115</sup>).

Los mecanismos responsables de la hipofunción de las plaquetas neonatales no se conocen del todo. Las explicaciones más aceptadas incluyen:

1. Diferente regulación de la activación de GPIIb/IIIa. Rajasekhar y col. demostraron expresión reducida de marcadores de activación en plaquetas de sangre de cordón umbilical de neonatos a término y pretérmino (menos de 30 semanas de gestación) tras la estimulación con trombina, ADP/epinefrina y U46619: la exposición del sitio de unión de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 a fibrinógeno en respuesta a estos agentes fue menor en plaquetas neonatales que en las de controles adultos<sup>108,110</sup>

2. Menor nivel de expresión de ciertos receptores. Algunos autores apuntan que una menor expresión de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  y de los receptores activados por proteasa 1 y 4 (PAR1/4) podría ser la causa de la hiporrespuesta de las plaquetas neonatales a epinefrina y trombina respectivamente<sup>101,121</sup>.
3. Movilización defectuosa de calcio como causa de la falta de reactividad en respuesta a colágeno<sup>99,122</sup>.
4. Transducción intracelular de señales disminuida como causa de una secreción defectuosa y de la hiporrespuesta al TxA<sub>2</sub>.
  - a. La secreción de P-selectina, tras estimulación con trombina, ADP/epinefrina y U46619, y de serotonina, en respuesta a colágeno, se halla muy disminuida en las plaquetas neonatales en comparación con la de adulto<sup>99,108,110</sup>. Un estudio evaluó mediante citometría de flujo la desgranulación de gránulos  $\delta$  plaquetarios en un grupo pequeño de neonatos mostrando que sus plaquetas presentan, respecto a las de los adultos, capacidad similar para absorber mepacrina (y, por tanto, un número similar de gránulos  $\delta$ ) pero capacidad reducida para liberar su contenido en respuesta a trombina<sup>123</sup>. No obstante, un estudio más reciente parece mostrar una disminución en el número de gránulos  $\delta$  en plaquetas neonatales<sup>124</sup>. Otro estudio reveló que las plaquetas de neonato presentaban mayor tamaño, menos pseudópodos, microtúbulos y depósitos de glicógeno, pero más gránulos  $\alpha$  que las de los adultos<sup>125</sup>. Algunas de estas diferencias, sin embargo, podrían deberse a problemas en la recolecta y procesamiento de las muestras<sup>126</sup>. En general los análisis por microscopía electrónica no han revelado diferencias sustanciales en la ultraestructura de las plaquetas de neonatos y adultos, tampoco a nivel del número de gránulos<sup>100,127</sup>, que justifiquen la deficiente secreción de sus gránulos. Así, la deficiencia en las vías de traducción de señales, se ha propuesto como la causa fundamental de la deficiente secreción de las plaquetas neonatales.

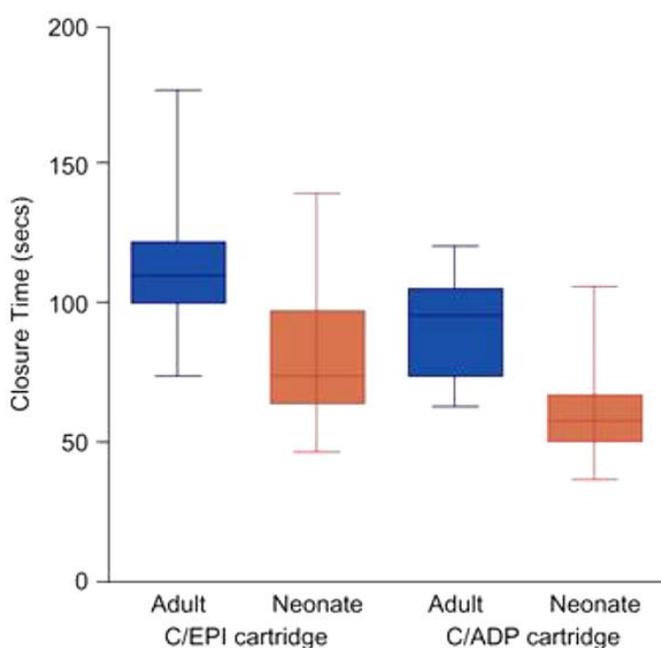
- b. El  $\text{TxA}_2$ , un potente activador plaquetario endógeno necesario para potenciar la señal de agonistas tales como colágeno o bajas concentraciones de trombina, es producido en las propias plaquetas a partir de ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos de membrana de forma agonista-dependiente. Se ha comprobado que la tasa de conversión de ácido araquidónico a  $\text{TxA}_2$  en plaquetas neonatales también es menor<sup>105</sup>. Aunque no existe diferencia ni en número ni en afinidad de los receptores de  $\text{TxA}_2$  entre plaquetas de neonato y de adulto, la activación vía U46619 está disminuida en plaquetas de neonatos a término y pretérmino<sup>105,108</sup>. Un único estudio muestra que la respuesta deficiente a  $\text{TxA}_2$  en plaquetas neonatales tiene su origen en un déficit funcional de la proteína  $\text{G}\alpha_q$  a la que está asociado su receptor<sup>128</sup>

Respecto a la duración del fenotipo plaquetario hiporreactivo tras el nacimiento o cómo ocurre la maduración hasta el fenotipo de plaqueta adulta son cuestiones que aún no han sido clarificadas. Algunos autores declaran que incluso en neonatos de peso extremadamente bajo (menos de 1000 g) la hiporrespuesta mejora a las dos semanas del nacimiento<sup>107,118,129</sup>, mientras que, en otros estudios, el análisis de plaquetas de bebés que ya han pasado el periodo neonatal y de niños mayores sugiere un incremento leve aunque continuo en la reactividad plaquetaria hasta alrededor de los 15 años de vida<sup>113,130</sup>.

#### **3.4. Hemostasia neonatal en sangre total**

A pesar de esta “hipofunción” de las plaquetas neonatales, no existen evidencias clínicas de que los neonatos a término tengan más sangrados o una hemostasia global alterada. De hecho, los neonatos a término sanos presentan tiempos de sangrado más cortos que los adultos<sup>131,132</sup>.

El analizador de función plaquetaria 100 (PFA-100) es un método *in vitro* de evaluación de la hemostasia primaria en sangre total bajo condiciones de flujo dinámico. La combinación del flujo constante y la exposición a agonistas (ADP o epinefrina) generan adhesión, activación y agregación plaquetaria lo que finalmente conduce a la formación de un tapón plaquetario y el cese del flujo de sangre.<sup>106,133</sup> De manera análoga a como ocurre con los tiempos de sangría, los tiempos de oclusión del PFA-100 también son significativamente más cortos en neonatos que en adultos y niños sanos<sup>134-137</sup> (Figura 9).



**Figura 9 | Tiempos de oclusión en PFA-100.** Diagrama de cajas en el que se compara los tiempos de oclusión en adultos sanos (cajas azules) y neonatos a término sanos (cajas rojas) medidos con cartuchos de colágeno/epinefrina (C/EPI) o colágeno/ADP (C/ADP). Reproducida de Israels, *Platelets*, 2012<sup>87</sup> con permiso.

Este hallazgo aparentemente paradójico de una hemostasia normal, o incluso incrementada, en el contexto de una reactividad plaquetaria disminuida se ha atribuido a factores en la sangre neonatal que incrementan la adhesión de las plaquetas a la pared del vaso incluyendo mayores hematocritos<sup>138</sup>, mayor volumen corpuscular medio de los hematíes neonatales, concentraciones incrementadas de FvW con mayor capacidad adhesiva<sup>139-142</sup>, o la presencia de multímeros ultralargos de esa misma glicoproteína sanguínea<sup>134-136</sup>.

Las concentraciones más altas de FvW en la sangre neonatal también contribuyen a la mayor capacidad de adhesión de las plaquetas neonatales medida con el Analizador de Cono y

Placa. Se trata de un aparato que, empleando pequeños volúmenes de sangre total citratada (200µL), permite medir la adhesión y agregación plaquetarias a una superficie o plato de poliestireno bajo condiciones de flujo similares a las fisiológicas<sup>87,106</sup>. El porcentaje de área total cubierta por plaquetas indicaría la extensión de la adhesión plaquetaria<sup>143,144</sup>. Coincidiendo con los resultados de tiempos de sangría y tiempos de oclusión, estudios en sangre periférica y de cordón umbilical de neonatos sanos a término demostraron, con respecto a los adultos control, una adhesión plaquetaria incrementada evaluada con este ensayo, la cual se correlaciona con las concentraciones plasmáticas y la actividad funcional elevada del FvW<sup>145</sup>.

La correlación inversa, previamente descrita, entre edad gestacional e hiporreactividad plaquetaria<sup>115</sup> también se refleja en los estudios de hemostasia global. Así, los tiempos de sangría son más largos en neonatos pretérmino que en neonatos a término<sup>146</sup>. De forma similar, los tiempos de oclusión de colágeno/ADP en el PFA-100 son también más largos en neonatos pretérmino que en a término<sup>147</sup>. Finalmente los ensayos en el Analizador de Cono y Placa en sangre periférica de neonatos pretérmino demostraron adhesión deficitaria (alrededor de un 20% menos) en comparación con los neonatos a término<sup>148</sup>, resultados que han sido confirmados por estudios en sangre de cordón umbilical<sup>143</sup>.

Esta menor capacidad de adhesión de las plaquetas de los neonatos pretérmino sobre los neonatos a término no se relacionó con diferencias en los niveles antigénicos de FvW o de su cofactor de ristocetina (FvW funcional), los cuales son similares en ambos grupos, sugiriendo que las diferencias en la capacidad de adhesión no dependen exclusivamente del medio (plasma/sangre) donde circulan, sino que son intrínsecas a las plaquetas<sup>148</sup>. El comportamiento diferente de las plaquetas procedentes de neonatos a término, pretérmino y de muy bajo peso al nacimiento en lo que refiere al FvW ha sido recientemente caracterizado mediante un ensayo que, bajo condiciones de flujo que mimetizan las fisiológicas, cuantifica la

interacción de las plaquetas con una superficie que contiene FvW inmovilizado<sup>149</sup>. Los resultados de este estudio muestran que los neonatos pretérmino presentan una mayor expresión de la glicoproteína Ib $\alpha$  así como un mayor número de plaquetas que interaccionaban con el FvW bajo condiciones de flujo arterial, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el número de plaquetas adheridas al FvW en estado estacionario.

Un aspecto interesante en el estudio de la hemostasia neonatal es conocer cómo afecta la hiporrespuesta de las plaquetas neonatales a la dinámica de formación, estabilización y disolución del coágulo. Los primeros estudios no demostraban defectos en la formación del coágulo de fibrina, en su firmeza o en el grado de fibrinólisis en neonatos<sup>150,151</sup>. Estudios más recientes sugieren, sin embargo, tiempos de formación del coágulo [medidos por tromboelastografía (TEG)] más cortos en neonatos pretérmino y a término que en los adultos control<sup>152,153</sup> y también que la estabilidad del coágulo parece estar directamente relacionada con la edad gestacional. Estos resultados están en consonancia con los menores tiempos de sangrado y de oclusión del PFA encontrados en sangre neonatal.

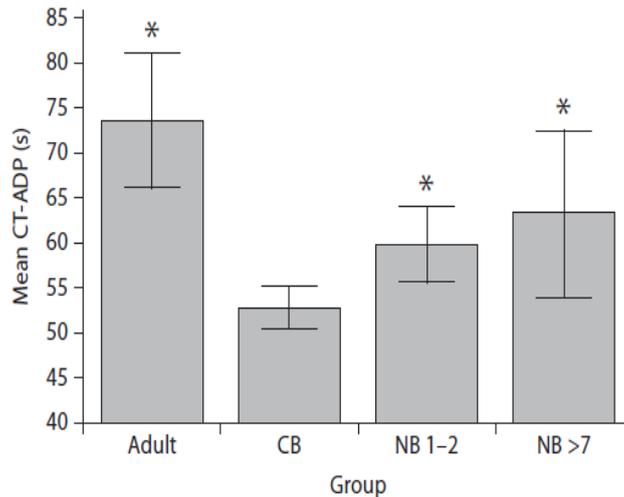
En conjunto, el hallazgo de una hemostasia “global” más robusta en neonatos sanos en el contexto de una hiporreactividad plaquetaria se entiende, hoy en día, como parte de un delicado equilibrio en el sistema hemostático, el cual, bajo circunstancias normales podría ser ligeramente hipercoagulable.

Es importante, tener en mente, sin embargo, que el examen de los tiempos de sangría, tiempos de oclusión en PFA-100 y tiempos de formación del coágulo en TEG, no es un reflejo específico de la función plaquetaria en sí misma ya que todos estos parámetros están sustancialmente influenciados por otros factores como el hematocrito, el recuento plaquetario, el FvW neonatal (inusualmente largo y activo) o, en el caso del tromboelastógrafo, por la actividad de factores de coagulación que están también alterados en neonatos<sup>134-137,147</sup>.

### ***3.5. Limitaciones en el estudio de la fisiología plaquetaria neonatal***

El estudio de la función plaquetaria en neonatos supone retos a más de un nivel. Por un lado la dificultad de obtener volúmenes adecuados de muestra con los que trabajar obliga en muchos casos a sustituir el uso de sangre periférica de neonato por sangre de cordón umbilical. Ante la duda de si las plaquetas derivadas de sangre de cordón umbilical representan con exactitud la función plaquetaria neonatal, en 1994 Rajasekhar y col.<sup>108</sup>, mediante estudios de citometría de flujo en sangre total, determinaron que no existían diferencias de activación entre las plaquetas de cordón umbilical y plaquetas de sangre periférica de neonatos bajo estimulación con los agonistas ADP/epinefrina, trombina y U46649 (análogo del TxA<sub>2</sub>). Posteriormente, Sitaru y col. confirmaron estos resultados, también mediante citometría de flujo en sangre total, al comprobar que no existían diferencias entre plaquetas de cordón umbilical y sangre periférica de neonato en lo que a expresión y activación de glicoproteínas con el agonista TRAP se refería<sup>107</sup>.

Tampoco está claro cómo afectan a la función plaquetaria otras variables hemostáticas, concretamente aun no ha sido bien definido qué influencia podrían tener los niveles alterados de proteínas pro- y anticoagulantes. Un estudio de Saxonhouse y col. llevado a cabo en 30 neonatos de 28 o más semanas de gestación y 21 neonatos a término demuestra que los tiempos de oclusión en sangre neonatal periférica (recolectada en las primeras 48h o a los 7 días) eran significativamente más largos que los de cordón umbilical (Figura 10), lo que quizás esté reflejando cambios tras el nacimiento como serían un hematocrito decreciente o la exposición a medicación. Aun siendo diferentes, tanto la sangre de cordón umbilical como la sangre periférica de neonatos presentaban tiempos de oclusión más cortos que los de adultos<sup>147</sup>.



**Figura 10| Comparación de los tiempos de oclusión en respuesta a ADP de muestras de sangre de neonatos y adultos.** Las muestras procedían de sangre periférica de adultos (Adult), sangre de cordón umbilical (CB) y sangre periférica neonatal tomadas en las primeras 48 horas tras el nacimiento (NB 1-2) y tras 7 días (NB>7). Se representa media  $\pm$  DE para cada grupo. Reproducida de Saxonhouse, *Neonatology* 2010<sup>147</sup> con permiso.

## 4. Importancia del estudio de la reactividad plaquetaria neonatal

### 4.1. Riesgo de sangrado

La población neonatal tiene mayor riesgo de hemorragia intracraneal (HIC) que cualquier otro grupo de edad. Específicamente, hasta un 25-30% de los neonatos pretérmino nacidos con un peso inferior a los 1500g experimentan HIC<sup>85</sup>, la mayoría de las cuales ocurren en la primera semana de vida.

Aunque diversos estudios han mostrado una asociación entre la trombocitopenia (muy frecuente entre los neonatos) y la incidencia de HIC, aun no ha sido establecida una relación causal entre ambas. Es importante señalar que muchos neonatos que experimentan HIC tienen recuentos plaquetarios normales o sólo mínimamente disminuidos en el momento de la

hemorragia<sup>154</sup> y el único ensayo controlado aleatorizado realizado en neonatos prematuros concluyó que el mantener un recuento superior a  $150 \times 10^9$  plaquetas/L durante la primera semana de vida no disminuía la incidencia de HIC<sup>155</sup>.

La relación entre grado de trombocitopenia y riesgo de sangrado ha sido evaluada en diferentes estudios<sup>156,157</sup>. La mayoría de estos estudios concluyen que, aunque la trombocitopenia es un factor de riesgo en neonatos, existe una pobre correlación entre contajes de plaquetas y sangrado clínicamente significativo. Esto sugiere que, en este grupo de población, otros factores distintos al número de plaquetas son más determinantes del riesgo de sangrado<sup>154</sup>.

Así, la patogenia de la HIC en la población neonatal se considera multifactorial y dependiente de la fragilidad intrínseca de la vasculatura de la matriz germinal, de perturbaciones en el flujo sanguíneo cerebral y de desórdenes de la coagulación o de la hemostasia<sup>158</sup>. El fenotipo hipofuncional único atribuido a las plaquetas neonatales podría ser un factor contribuyente. Sin embargo, su relación causal o el grado en el que contribuye a las alteraciones del equilibrio hemostático en esta etapa del desarrollo están aún por determinar.

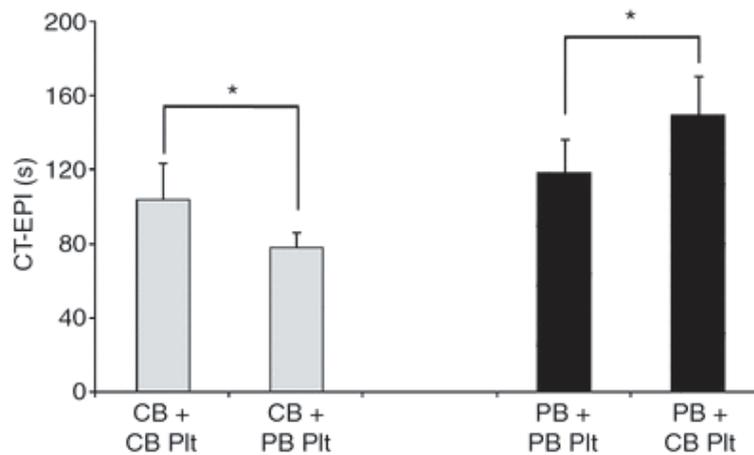
#### **4.2. Medicina transfusional: Práctica transfusional en neonatos**

Debido al mayor riesgo de trombocitopenia y de HIC, los neonatos, especialmente los pretérmino, con frecuencia son transfundidos profilácticamente cuando los contajes de plaquetas caen por debajo de un dintel o límite arbitrario, por lo general más alto que para niños más mayores o adultos. Así, entre un 5 y un 9% de los pacientes de la UCI neonatal reciben al menos una transfusión de plaquetas durante su ingreso<sup>159,160</sup> y un 50% de estos neonatos recibirán 2 o más transfusiones<sup>161,162</sup>. El 95% de estas transfusiones son administradas de manera profiláctica a neonatos sin evidencia clínica de sangrado. Dicha práctica clínica se basa más en recomendaciones de expertos que en una clara evidencia

científica, de hecho las transfusiones profilácticas no necesariamente influyen la extensión o severidad de las HIC <sup>155</sup>.

Las transfusiones de plaquetas, sin embargo, no están exentas de riesgos. Como en cualquier otro grupo de población, las transfusiones de plaquetas pueden tener efectos adversos indeseables: transmisión de organismos infecciosos, infusión de citoquinas, aloinmunización o la lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión <sup>163</sup>.

Otros riesgos potenciales podrían ser derivados de las propias diferencias en el estadio del desarrollo. Un único estudio ha evaluado el efecto de las transfusiones de plaquetas en la hemostasia neonatal. Este estudio investiga si la transfusión de plaquetas de adulto (comparativamente hiperreactivas) dentro de la sangre neonatal puede conducir a un estado hipercoagulable. Para probar esta hipótesis, plaquetas procedentes de cordón umbilical o de adultos sanos fueron resuspendidas *in vitro* en sangre de cordón umbilical o de adulto depleccionadas de plaquetas. A continuación, mediante PFA-100 y TEG se evaluaron los tiempos de oclusión (Figura 11), encontrándose que estos eran significativamente más cortos en sangre neonatal transfundida *in vitro* con plaquetas de adulto que en sangre neonatal transfundida *in vitro* con plaquetas neonatales <sup>164</sup>. Lo contrario también fue cierto: plaquetas de neonato, mezcladas con sangre de adulto tienen tiempos de oclusión más largos que si la mezcla es con plaquetas de adulto. Este estudio demuestra, por un lado, que la hiporreactividad de la plaqueta neonatal es una característica intrínseca de la misma, no dependiente exclusivamente del medio en el que circulan. Por otro, “alerta” sobre el uso liberal de las transfusiones profilácticas de plaquetas de adulto a neonatos con trombocitopenia moderada, sin sangrados, en los que se podría inducir un estado potencialmente procoagulante.



**Figura 11| Efecto en la hemostasia neonatal de las transfusiones *in vitro* de plaquetas adultas.** Tiempos de oclusión el PFA-100 tras estimulación con colágeno/epinefrina. Las muestras resuspendidas en sangre de cordón umbilical (CB, representada por barras grises) generaron tiempos más cortos que las resuspendidas en sangre periférica de adultos (PB, barras negras). Las plaquetas de neonato mostraban tiempos de oclusión más largos independientemente del medio de resuspensión. Reproducida de Ferrer-Marin, *J Thromb Haemost.* 2011<sup>164</sup> con permiso.

Más allá de su efecto hemostático principal, las plaquetas pueden tener un papel destacado en la respuesta inmune frente al huésped y son importantes mediadores en la inflamación. Recientemente se ha sugerido que pudiera existir un incremento en la morbilidad o en la mortalidad de aquellos neonatos que reciben transfusiones de plaquetas<sup>165,166</sup>. Si bien es cierto que se cree que la asociación entre trombocitopenia y mortalidad refleja el hecho de que la trombocitopenia es un marcador de severidad de la enfermedad, existe una preocupación creciente de que las propias transfusiones de plaquetas puedan tener un efecto negativo en el desenlace<sup>166,167</sup>. Dado que la mayoría de las transfusiones de plaquetas de donantes adultos son administradas a neonatos con trombocitopenia y procesos infecciosos o inflamatorios (sepsis, enterocolitis necrotizante, etc), es importante realizar estudios que, como el nuestro, profundicen en el conocimiento de las diferencias biológicas entre las plaquetas de neonato y adulto con el fin de establecer si realmente este desequilibrio del desarrollo puede repercutir negativamente en el pronóstico de los neonatos.

### **4.3. Medicina transfusional: Expansión de plaqueta *ex vivo***

En las últimas décadas, el aumento del número de trasplantes y el uso, cada vez más frecuente, de tratamientos que inducen trombocitopenia como efecto secundario, ha derivado en una mayor demanda de concentrados de plaquetas. Desgraciadamente, el número de donantes disponibles no ha seguido el ritmo de crecimiento de las necesidades de transfusión de plaquetas, y esta discrepancia muy probablemente va a seguir intensificándose. Estas dificultades de suministro de plaquetas se agravan por la corta caducidad de los concentrados de plaquetas (de sólo cinco días) debido al almacenamiento a temperatura ambiente de estos hemoderivados, lo que aumenta el riesgo de contaminación bacteriana.

La generación de un sistema complementario de producción de plaquetas, eficaz e independiente de donaciones, podría eliminar muchas de estas preocupaciones. Actualmente hay un gran interés en desarrollar estrategias para generar plaquetas desde células precursoras generadas exógenamente a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs). Las células madre pluripotentes inducidas son células adultas genéticamente reprogramadas, que no existen en el cuerpo humano y que exhiben un estado de pluripotencia y unas cualidades llamativamente parecidas a las de las células embrionarias (ESCs).

La generación de plaquetas *ex vivo* podría ser una alternativa a la transfusión de plaquetas tradicional dependiente de donantes. Dado que estas plaquetas serían fenotípica y genéticamente más similares a las neonatales que a las de adulto, un conocimiento más profundo de la funcionalidad plaquetaria de los neonatos y de los mecanismos moleculares que la gobiernan ayudaría a establecer la eficacia de estos procedimientos tan innovadores.

A modo de resumen podemos concluir que la reactividad plaquetaria condiciona la ocurrencia de eventos tanto trombóticos como hemorrágicos, los cuales son causa de alta

morbi-mortalidad en nuestro medio. Las plaquetas de los neonatos son hiporreactivas respecto a las de adulto, constituyendo así un modelo idóneo donde investigar los mecanismos reguladores de la reactividad plaquetaria, aun hoy pobremente caracterizados. La investigación de la hiporreactividad plaquetaria en los neonatos tiene *per se* una alta relevancia clínica en este grupo de población, dado su mayor riesgo de sangrado, y específicamente de HIC. Finalmente, su estudio, podría tener interés también en el campo de la medicina transfusional.

# ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

---



## **HIPÓTESIS**

La hemostasia neonatal constituye un proceso fisiológico complejo, sujeto a un delicado equilibrio donde la función plaquetaria y los factores pro- y anticoagulantes y fibrinolíticos se interconectan y contrarrestan para evitar la hemorragia. Así, la hiporreactividad de las plaquetas neonatales compensaría otras características de la sangre neonatal que la hacen mostrar cierta tendencia a la coagulación, como son el alto hematocrito y volumen corpuscular medio de sus células sanguíneas o las altas concentraciones de multímeros de FvW ultralargos e hiperactivos. Sin embargo este equilibrio es frágil y factores tales como la prematuridad o determinadas patologías pueden alterarlo provocando consecuencias nefastas para el neonato como son las secuelas neurológicas graves tras una HIC o incluso la muerte. A pesar del creciente interés y de los grandes avances alcanzados durante los últimos 60 años en este campo de estudio, aun no se han identificado todos los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la hemostasia primaria neonatal.

En esta Tesis pretendemos evaluar la hipótesis de que la hiporreactividad de las plaquetas neonatales, respecto al adulto, se asienta en diferencias en la expresión y/o función de proteínas esenciales en la fisiología plaquetaria, en su transcriptoma o en nuevos elementos reguladores de las mismas como los miRNA

## **OBJETIVOS**

Esta hiporreactividad intrínseca característica de las plaquetas neonatales hace de ellas un buen modelo para identificar nuevos mecanismos reguladores de la reactividad plaquetaria.

El objetivo general de este proyecto es evaluar los mecanismos que controlan la reactividad plaquetaria y subsiguientemente, la modulación del riesgo trombótico o hemorrágico, ambos estrechamente relacionados con la reactividad plaquetaria. Esto se abordará desde una

perspectiva innovadora, tomando como modelo las plaquetas neonatales, comparativamente hiporreactivas respecto a las de adulto.

Profundizaremos en el estudio de la hiporreactividad de las plaquetas neonatales a través del análisis de los siguientes objetivos específicos:

- Estudio del perfil de expresión génica en plaquetas de neonato y adulto (*Capítulo I*).
- Estudio del perfil de microRNA en plaquetas de neonato y adulto y de su posible papel regulador del transcriptoma plaquetario neonatal (*Capítulo II*).
- Evaluación de las diferencias en adhesión y secreción plaquetaria entre neonatos y adultos (*Capítulo III*).
- Evaluación de la expresión y funcionalidad de proteínas G y los reguladores de su señalización (RGS) en plaquetas neonatales (*Capítulo IV*).

# ***CAPÍTULOS***

---



**Capítulo I: COMPARACIÓN DEL  
TRANSCRIPTOMA PLAQUETARIO EN  
NEONATOS Y ADULTOS**



## 1. Introducción

Las plaquetas no sólo desempeñan un papel crucial en hemostasia y trombosis, sino que también tienen funciones importantes en situaciones patológicas como reguladores o mediadores de la angiogénesis, en inflamación y en inmunidad<sup>9</sup>. Generadas a partir de la fragmentación de megacariocitos del citoplasma, las plaquetas son células sanguíneas anucleadas que retienen miles de transcritos heredados de los megacariocitos así como retículo endoplásmico rugoso y polirribosomas, todos ellos requisitos indispensables para mantener las capacidades de traducción de proteínas funcionalmente intactas<sup>168</sup>.

El análisis del transcriptoma es una herramienta útil para identificar cambios funcionales en la biología de las plaquetas. De hecho, mediante el uso de estas técnicas genómicas, en los últimos años, se han conseguido asociar ciertos perfiles de expresión de mRNA con la reactividad plaquetaria<sup>169</sup>, o las enfermedades cardiovasculares<sup>170</sup>, entre otros. El análisis del transcriptoma también puede convertirse en un instrumento valioso para estudiar los cambios ontogénicos que, si bien son conocidos en las células eritropoyéticas, por los cambios asociados al tipo de hemoglobina, y en macrófagos<sup>171</sup>, están muy pobremente caracterizados en el linaje megacariopoyético-plaquetar. En las últimas décadas, se ha establecido claramente la existencia de diferencias biológicas sustanciales en la megacariopoyesis humana a través del desarrollo<sup>88,90</sup>. Los megacariocitos fetales/neonatales son diferentes a los del adulto y producen plaquetas con diferente funcionalidad<sup>98</sup>. A nivel celular, los neonatos a término muestran una hiporreactividad plaquetaria generalizada frente a muchos agonistas fisiológicos, lo que es más evidente cuanto menor es la edad gestacional<sup>99,108,172-174</sup>. Los cambios en el desarrollo no sólo son observables en términos de reactividad plaquetaria, sino que también lo son en la biología de las plaquetas<sup>175</sup>. Un estudio reciente ha demostrado que las plaquetas murinas neonatales tienen una vida media más larga en la circulación que las plaquetas de ratones adultos<sup>175</sup>.

En este estudio, hemos utilizado un array de expresión de mRNA para proporcionar la primera comparación global del transcriptoma de plaquetas humanas de recién nacido y adulto. Empleamos técnicas de microarrays en dos muestras pool de mRNA de plaquetas puras derivadas de sangre del cordón umbilical y sangre periférica de adultos, además de plataformas de dos laboratorios independientes.

El análisis del transcriptoma de plaquetas neonatales no sólo es clínicamente relevante para este grupo de edad, dado su mayor riesgo de HIC. Es bien sabido que existen variaciones individuales en la reactividad plaquetaria en la población adulta sana que pueden contribuir a situaciones patológicas, tales como derrame cerebral o hemorragia. Dado que los neonatos, en comparación con los adultos, muestran variaciones extremas de la reactividad plaquetaria, los perfiles de expresión génica de las plaquetas en estos dos grupos de edad, representan un modelo ideal para investigar los mecanismos de regulación de la función plaquetaria e identificar nuevas dianas terapéuticas.

## **2. Materiales y Métodos**

### ***2.1. Obtención de muestras de sangre***

El estudio fue aprobado por el comité de ensayos clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y fue llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Las muestras de sangre neonatal fueron extraídas de sangre de cordón umbilical procedente de neonatos sanos nacidos a término (edad gestacional 38-41 semanas) y con peso normal, por cesárea programada o parto vaginal y tras firma de consentimiento informado por parte de sus madres. Los criterios de exclusión para la toma de muestras fueron: que la parturienta hubiese tomado antibióticos o fármacos antiinflamatorios en los 10 días anteriores

al momento del parto, que existiese historia familiar de trombocitopenia o alteraciones en la funcionalidad plaquetaria, evidencia de infecciones, diabetes gestacional, preeclampsia, defectos de coagulación, retardo de crecimiento uterino o historial de abuso de alcohol o drogas. Paralelamente se recogieron, mediante punción antero cubital, muestras de sangre periférica de adultos sanos voluntarios libres de medicación antiagregante en los 10 días previos a la extracción.

En ambos grupos, se extrajo un volumen mínimo de 40 mL por medio de agujas de 21G en tubos conteniendo tampón citrato sódico al 3.2% (0.105 M buffered Citrate, Vacutainer System; Diagnostica Stago Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido). Tras un reposo de 10-15 min, se les realizó un hemograma para comprobar el recuento plaquetario.

## **2.2. Obtención de plaquetas ultrapuras**

Las muestras de sangre se centrifugaron a 140xg durante 15 min a temperatura ambiente para obtener el PRP. Dada la inevitable contaminación del PRP por leucocitos y dado que los leucocitos contienen entre 10.000 y 100.000 veces más RNA que las plaquetas, el PRP obtenido se filtró empleando filtros de leucodepleción específicos para plaquetas (PL1BE, Haemonetics, Braintree, MA)<sup>176</sup> y posteriormente se sometió a separación magnética en autoMACSProSeparator (MACS Mitenyi Biotec® S.L., Madrid, España) tras una incubación de 15 min a 4°C con 35µL de CD45 MicroBeads Reagent (MACS Mitenyi Biotec®)<sup>177</sup> recogándose la fracción negativa. Con este protocolo se consiguió una pureza de menos de 1 leucocito por cada 5 millones de plaquetas. Finalmente, para eliminar la posible contaminación por eritrocitos las muestras se sometieron a lisis osmótica con salino al 0.2% durante 1 min. Cada muestra de plaquetas ultrapuras se dividió en dos alícuotas que se centrifugaron a 6000 x RPM durante 1 min (Heraeus® Biofuge® Pico, DJB Labcare, Reino Unido). Los pellets resultantes fueron congelados a -80°C hasta su uso posterior.

### **2.3. Aislamiento y purificación de RNA total. Análisis de la contaminación leucocitaria.**

El aislamiento de RNA total de las muestras de plaquetas ultrapuras se realizó con TRIzol® (15596026, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) según las instrucciones del fabricante. Este reactivo, que contiene clorhidrato de guanidinio y fenol, permite lisar la muestra a la vez que mantiene la integridad del RNA durante todo el proceso. La adición de cloroformo logra la separación de la muestra en dos fases, una orgánica conteniendo lípidos y proteínas y una acuosa donde queda confinado el RNA. Para precipitar el RNA una vez aislada la fase acuosa se emplea isopropanol y glicógeno y, finalmente, tras ser lavado con etanol, el RNA se resuspende en agua. La concentración de RNA y la relación 260/280 se determinaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). La integridad y calidad del RNA fue evaluada mediante el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

La posible contaminación residual leucocitaria de las preparaciones de plaquetas se comprobó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) utilizando primers específicos para *PTPRC* (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C o *CD45*)<sup>178</sup>, mientras que la confirmación de la presencia de plaquetas se realizó utilizando primers específicos para *ITGA2B* (ITGA2B F: GAATGGCCCCTGCTGTCGTG; ITGA2B-R: ACGTCATCTTCCCCACAGTC).

### **2.4. Microarrays**

Para la determinación de los perfiles de expresión génica de plaquetas neonatales y de adulto usamos la plataforma GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) que contenía 54.675 sondas para analizar la expresión relativa de 38.500 genes. Para cada microarray, se emplearon 350 ng de RNA total constituidos por mezclas pool de RNA plaquetario de adulto o neonato, procesados según las indicaciones del fabricante (PN 703210, Rev 1, Affymetrix). Las muestras de adultos y recién nacidos fueron separadas en dos

grupos con el fin de enviar uno de cada clase a un laboratorio diferente. Una pareja de muestras, consistentes en una muestra pool de 4 recién nacidos y otra de 4 adultos, se envió a los laboratorios de LC Sciences (Houston, TX) (array A). El otro par de muestras pool, consistente en 2 neonatos y 2 adultos fue enviado a la Sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia (Murcia, España) (array B).

### **2.5. Análisis estadístico y de rutas de los datos de los microarrays**

Se realizaron controles de calidad de los datos de los microarrays A y B y los datos en bruto de expresión génica (archivos .Cel) fueron normalizados empleando la función RMA<sup>179</sup> del software ACCC [Affymetrix Gene Expression Console (Affymetrix)]. La estadística y el análisis de rutas de los datos normalizados se realizaron con los softwares Partek Genomic suite 6.6 y Partek Pathway (Partek Incorporated, Chesterfield, MO) y TAC (Affymetrix® Transcriptome Analysis Console 3.0, Affymetrix). Con el fin de generar una lista de genes que representase el patrón de expresión diferencial entre adultos y neonatos se aplicó a los datos de los arrays A y B el método estadístico ANOVA, creando un array A-B combinado. Los resultados de este análisis fueron filtrados por Fold Change <-2 o >2 y por nivel de significación de  $p < 0,05$ . La agrupación jerárquica se realizó considerando para cada gen su valor normalizado<sup>180</sup>. El análisis de enriquecimiento de genes se realizó utilizando PANTHER Overrepresentation Test (release 20160715)<sup>181</sup> como herramienta de análisis y GO biological process como base de datos biológica (<http://geneontology.org>). El test estadístico empleado en este caso fue la prueba de Bonferroni, y se consideró como significativo  $p < 0,05$  para el análisis de genes altamente expresados y  $p < 0,01$  para el análisis de genes diferencialmente expresados.

## **2.6. Comparación de las plataformas de microarrays**

La concordancia entre los resultados de los arrays A y B fue evaluada mediante el uso de gráficos de densidad, en base a la intensidad de la señal para cada sonda y mediante diagramas de Venn que representaban los 1.000 genes más expresados en cada tipo de muestra, creados utilizando GraphPad (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) y el programa SUMO (OncoExpress Software, Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania)], respectivamente.

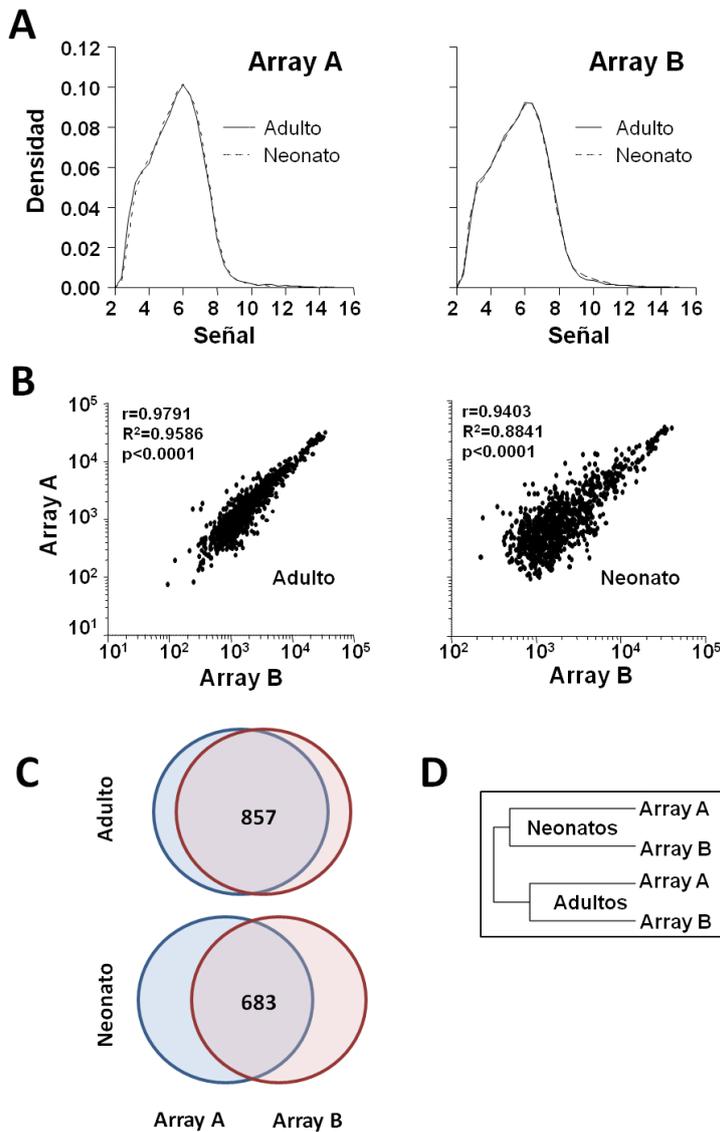
## **2.7. Validación de los datos de microarray por qRT-PCR**

La cohorte de validación incluyó 16 muestras/grupo (neonatos y adultos). La validación de datos de los microarrays se llevó a cabo mediante qRT-PCR de una serie de genes seleccionados. La reacción de retro-transcripción se realizó usando 150 ng de RNA total para cada muestra, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (SuperScriptIII First Strand, Thermo Fisher Scientific). Para las reacciones de PCR en un sistema LC480 Real Time PCR (Roche Pharma, Basel, Suiza) se emplearon la mezcla Taqman *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) y sondas comerciales para *GNAZ* (Hs00157731\_m1), *GNB5* (Hs00272529\_m1), *RANBP10* (Hs00398714\_m1) y *ACTB* (Hs99999903\_m1) (Thermo Fisher Scientific), así como SYBR *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc.) con primers específicos para *ADRA2A* y *ACTB* (*ADRA2A*-F: CGACCAGAAGTGGTACGTCA; *ADRA2A*-R: TAGATGCGCACGTAGACCAG; *ACTB*-F: TAGCACAGCCTGGATAGCAA; y *ACTB*-R: TGACCCAGATCATGTTTGAGA).



### 3.2. Análisis comparativo de las plataformas de microarrays

Debido al reducido número de muestras y a las limitaciones que ello supone, nuestro primer objetivo fue asegurar la solidez de la técnica/plataforma utilizada. Por esta razón, además de analizar la expresión de genes en función del grupo de edad (adulto/neonato), también se compararon los datos entre los arrays A y B. Los gráficos de densidad de los arrays A y B, exhiben una coincidencia en adultos y neonatos para cada array (Figura 2A), lo que significa que todas las muestras mostraron una distribución similar de señal génica. La solidez de los datos de microarrays se refleja en los gráficos de dispersión, donde se observó una alta correlación entre los arrays A y B para ambas muestras de adultos y neonatos (Figura 2B).

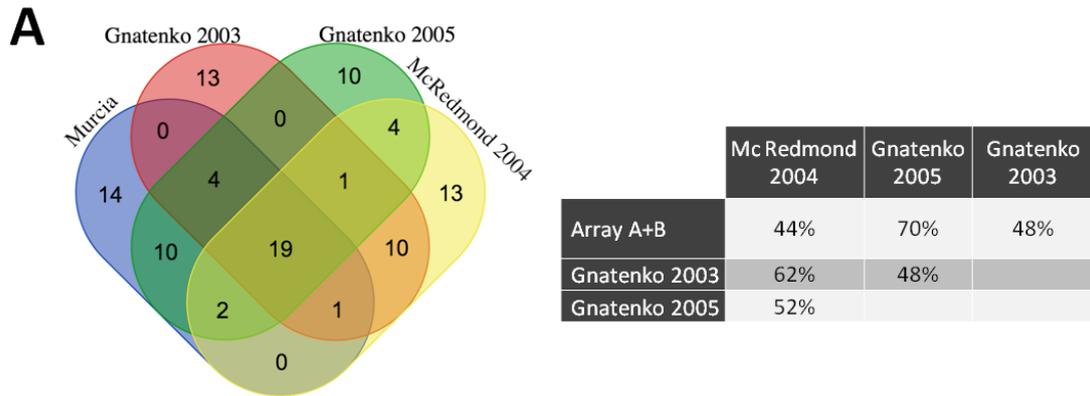


**Figura 2 | Comparación de datos de microarray.** (A) Gráfico de densidad vs. intensidad de señal (para datos procesados, escala en log-2) para ambos microarrays. (B) Gráficos de dispersión que muestran la correlación positiva entre ambos arrays para cada tipo de muestra (adulto o neonato). (C) Diagrama de Venn de los genes coincidentes entre los 1000 más expresados en ambos arrays y para cada tipo de muestra. (D) Dendrograma de clúster jerárquico de agrupación de muestras por grupo de edad.

En consecuencia, los diagramas de Venn (Figura 2C), confirmaron que 857 de las 1000 sondas más expresadas en adultos y 683 de las 1000 más expresadas en los neonatos eran coincidentes entre las dos plataformas. Un clúster jerárquico no-supervisado para las señales de todas las sondas, mostró un dendrograma donde las muestras se reúnen según el estado de desarrollo (Figura 2D).

### ***3.3. Análisis comparativo con otros estudios de microarrays de transcritos plaquetarios***

Para probar la consistencia y solidez de nuestros resultados, comparamos los datos de nuestro array de muestras de plaquetas de adulto con otros microarrays de plaquetas previamente publicados. Se seleccionó el estudio de Gnatenko de 2005<sup>182</sup> para establecer la comparación porque las sondas representadas en dicho array, HU133A GeneChip (Affymetrix), están todas presentes en el array utilizado en este estudio (GeneChip® HU133 Plus 2,0 array), aunque por ser una versión anterior al nuestro, el número de sondas evaluadas en dicho array era sustancialmente menor: 54675 (HU133 Plus 2,0) vs. 22283 (HU133A) sondas, respectivamente. Además, comparamos nuestros datos con otros dos arrays, el del estudio de 2003 de Gnatenko<sup>183</sup> y el de 2004 de McRedmond<sup>184</sup>, que utilizaron la versión de microarrays HG-U95v2 (10.000 genes analizados). Los 50 genes más expresados en cada uno de estos 4 arrays se muestran en la Tabla Suplementaria 1 (Anexo I). La comparación de nuestros datos de adultos con estudios previos de plaquetas (Figura 3A, panel izquierdo) indica porcentajes de coincidencia que van desde el 44 hasta 70% entre los 50 genes más expresados en cada microarrays (Figura 3A, panel derecho). Este nivel concordancia, refuerza la validez de nuestros datos y muestra la buena reproducibilidad de la técnica. 19 genes, de entre los 50 más expresados en adultos, eran coincidentes en todos los microarrays (Figura 3C).



**B**

|                           | Gnatenko  | McRedmond | Gnatenko  | Array A+B   |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| <b>Año de publicación</b> | 2003      | 2004      | 2005      |             |
| <b>Versión Microarray</b> | HGU95Av2  | HGU95Av2  | HGU133A   | HGU133plus2 |
| <b>Nº de Sondas</b>       | 12600     | 12600     | 22000     | 55000       |
| <b>Nº de Genes</b>        | 10000     | 10000     | 14500     | 38500       |
| <b>Fabricante</b>         | Afymetrix | Afymetrix | Afymetrix | Afymetrix   |

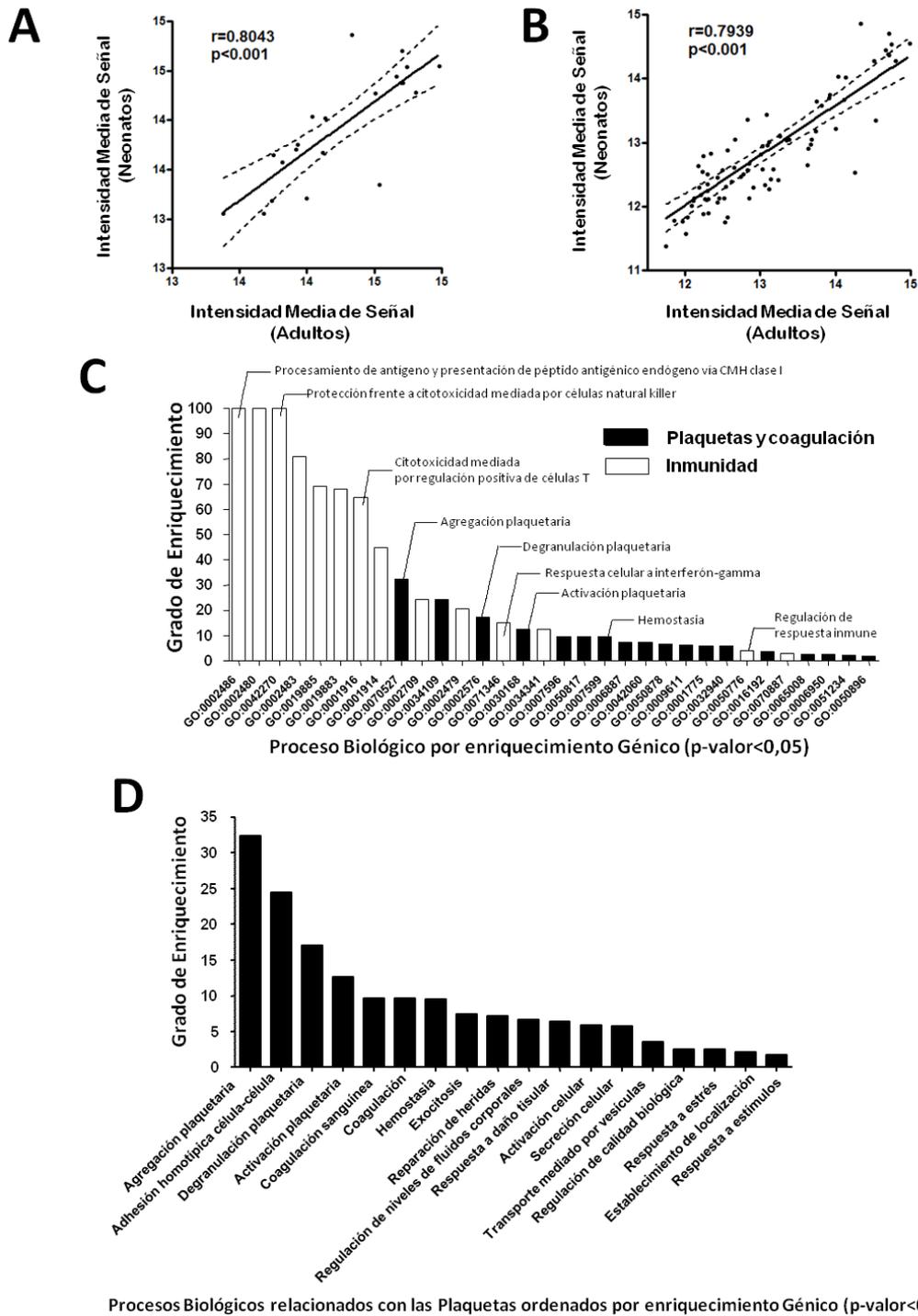
**C**

| Gene Symbol | Orden Gnatenko 2003 | Orden McRedmond 2004 | Orden Gnatenko 2005 | Orden Array A+B |
|-------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| PPBP        | 22                  | 21                   | 3                   | 3               |
| HBB         | 3                   | 9                    | 11                  | 5               |
| TMSB4X      | 1                   | 5                    | 9                   | 7               |
| PF4         | 8                   | 8                    | 4                   | 8               |
| B2M         | 9                   | 3                    | 1                   | 9               |
| HBA1/2      | 16                  | 19                   | 14                  | 10              |
| FTH1        | 18                  | 11                   | 8                   | 11              |
| NRGN        | 2                   | 4                    | 5                   | 16              |
| NCOA4       | 25                  | 25                   | 12                  | 18              |
| OAZ1        | 6                   | 6                    | 35                  | 19              |
| ACTB        | 10                  | 10                   | 6                   | 21              |
| GNAS        | 20                  | 16                   | 13                  | 26              |
| CCL5        | 14                  | 33                   | 22                  | 27              |
| F13A1       | 39                  | 17                   | 46                  | 30              |
| MYL6        | 17                  | 32                   | 43                  | 34              |
| RPL41       | 28                  | 34                   | 16                  | 38              |
| SPARC       | 19                  | 13                   | 38                  | 39              |
| HLA-C       | 21                  | 14                   | 24                  | 45              |
| TAGLN2      | 11                  | 7                    | 39                  | 47              |

**Figura 3 | Comparación de datos de varios microarrays de plaquetas. (A)** Diagrama de Venn mostrando la coincidencia entre los 50 genes más expresados entre nuestro array y los de los estudios de Gnatenko 2003, McRedmond 2004 y Gnatenko 2005. **(B)** Breve descripción de los microarrays usados. **(C)** Lista de los 19 genes coincidentes entre las diferentes plataformas ordenadas según los datos de nuestro array.

### **3.4. Los perfiles de transcriptoma plaquetario de neonatos y adultos revelan genes comunes altamente expresados**

En primer lugar, se identificaron los transcritos más expresados en ambas etapas del desarrollo. Los resultados mostraron 21 genes coincidentes entre los 25 más expresados en plaquetas neonatales y de adulto, con una concordancia del 84% y una excelente correlación en los niveles de expresión de mRNA ( $r = 0,8043$ ,  $p < 0,001$ ), (Figura 4A). Los resultados fueron similares al extender la comparación a los 100 genes más expresados (79,4% de coincidencia,  $p < 0,001$ ) (Figura 4B). La Tabla Suplementaria 2 (Anexo I) muestra una lista detallada de los genes coincidentes, entre los más expresados, entre los recién nacidos y adultos. Para evaluar la veracidad de los datos obtenidos en el array, se exploró la importancia biológica de dichos genes. Con este propósito se realizó un análisis de enriquecimiento de genes y se encontró que en ambas etapas del desarrollo, los genes relacionados con actividad plaquetaria e inmunidad, eran los dos grupos más altamente expresados (Figura 4C). En consonancia con nuestra hipótesis, encontramos diferentes procesos biológicos relacionados con las funciones plaquetarias, por ejemplo: agregación plaquetaria, desgranulación plaquetaria, activación de las plaquetas o exocitosis entre otros (Figura 4D), enriquecidos en genes altamente expresados en las plaquetas como *GNAS*, *ACTG1*, *ACTB*, *VCL*, *SPARC*, *SRGN*, *PPBP*, *F13A1*, *TMSB4X*, o *PF4* (Tabla Suplementaria 3, Anexo I). Además, no sólo encontramos genes implicados en la activación de las plaquetas, sino también relacionados con la activación celular en general, por ejemplo *CCL5*, *B2M* o *ITGB1* (Tabla Suplementaria 3, Anexo I). Curiosamente, algunos de los genes antes mencionados también tienen funciones de inmunidad (*CCL5* o *B2M*). De hecho, encontramos que los procesos biológicos relacionados con inmunidad estaban enriquecidos en genes de alta expresión en plaquetas como son *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-E*, *B2M*, y *HLA-C*, los cuales participan en el procesamiento y presentación de péptidos antigénicos exógenos y endógenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o en la regulación de la citotoxicidad mediada por células T entre otros (Tabla Suplementaria 3, Anexo I).



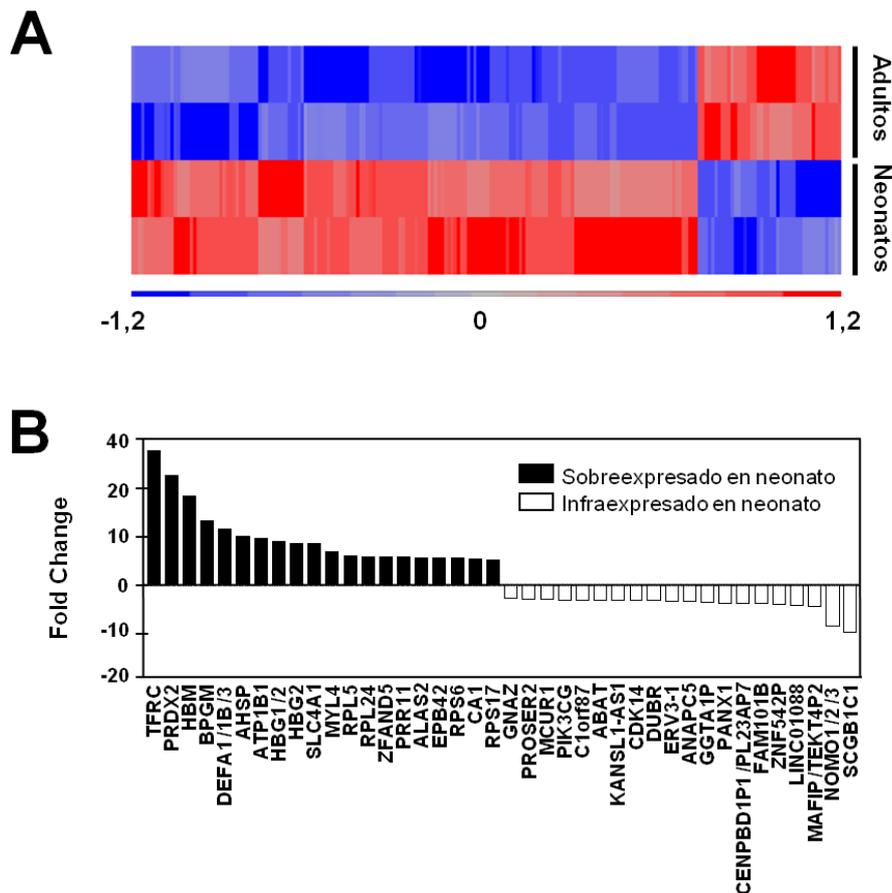
**Figura 4|** Correlación neonato-adulto y análisis de enriquecimiento génico de los genes comunes más expresados en ambos grupos de edad. **(A)** y **(B)** Gráfico de dispersión que ilustra la correlación de Pearson positiva y significativa ( $p < 0,001$ ) para los genes coincidentes entre los 25 **(A)** o 100 **(B)** más expresados en neonatos (eje Y) y adultos (eje X). **(C)** Análisis de enriquecimiento génico ordenado por grado de enriquecimiento. Los procesos biológicos relacionados con actividad plaquetaria se representan con barras negras y los relacionados con inmunidad se indican con barras blancas. **(D)** Procesos biológicos relacionados con actividad plaquetaria, ordenados por grado de enriquecimiento.

### **3.5. Identificación de mRNA diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo plaquetario humano**

Para identificar la expresión diferencial de genes plaquetarios entre los distintos estados de desarrollo, utilizamos los programas Partek Genomics Suite y Transcriptome Affymetrix Expression Console. Realizamos un test estadístico (ANOVA) con el fin de obtener una lista de genes fiable que representase cambios en la expresión génica de plaquetas entre los recién nacidos y adultos. Los criterios de selección fueron: (i) p-valor inferior a 0,05 y (ii) Fold Change mayor de 2 o menor de -2. Obtuvimos una lista de 201 genes expresados diferencialmente entre neonatos y adultos, 162 genes sobreexpresados y 39 infraexpresados en neonatos respecto a adultos (Tabla Suplementaria 4, Anexo I). En la Figura 5A se representa un *heatmap* de los genes diferencialmente expresados.

A continuación centramos nuestra atención en los 20 genes más diferentemente expresados ( $p < 0,05$  y mayores cambios de Fold Change) (Figura 5B). Los 20 genes más sobreexpresados en plaquetas neonatales con respecto a adulto se dividen básicamente en dos grupos: genes que codifican a proteínas de origen eritroide (*TFRC*, *BPGM*, *AHSP*, varios genes de *HBs*, *SLC4A1*, *ALAS2*, *EPB42*, *CA1*) y genes asociados con la síntesis y degradación de proteínas, observándose un enriquecimiento en genes implicados en la producción de proteínas tales como ribonucleoproteínas (*RPL5*, *RPL24*, *RPS6*, *RPS17*) o el sistema de la ubiquitina-proteasoma (*ZFAND5*) (Figura 5B). El segundo gen más significativamente sobreexpresado en plaquetas neonatales en comparación con las plaquetas de adultos, con un Fold Change de 22, fue *PRDX2*, una enzima antioxidante relacionada con la reactividad plaquetaria. Es importante destacar que algunos de los genes que más diferentemente se expresan a lo largo de la ontogenia (Fold Change > 7) están implicados en la reorganización del citoesqueleto (*MYL4*).

Para el caso de los genes infraexpresados en plaquetas neonatales encontramos enriquecimiento de aquellos relacionados con importantes funciones biológicas plaquetarias, incluyendo el transporte/metabolismo de calcio (*C1orf87*, *MCUR1*), la reorganización del citoesqueleto de actina (*FAM101B*), la señalización celular (*GNAZ*, *NOMOS*, *ABAT*, *PANX1*), la regulación del ciclo celular (*MAFIP*, *ANAPC5*, *CDK14*, *PROSER2*) (Figura 5B).



**Figura 5 | Análisis de expresión diferencial. (A)** Clúster jerárquico de los genes diferencialmente expresados entre plaquetas de neonato y adulto (FCh2,  $p < 0,05$ ). Las muestras, agrupadas en base al estado del desarrollo, se representan en filas y los genes en columnas. Los genes sobreexpresados tienen valores positivos y se muestran en rojo. Los genes infraexpresados tienen valores negativos y se muestran en azul. **(B)** 20 genes más diferencialmente expresados ordenados por fold change. Los genes sobreexpresados tienen valores positivos y se muestran como barras negras. Los genes infraexpresados tienen valores negativos y se muestran como barras blancas.

Se sabe que las plaquetas neonatales son profundamente hiporreactivas a la epinefrina debido a una reducción de la expresión de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$ <sup>172</sup>. En consecuencia, en nuestro microarray, los niveles de expresión de *ADRA2A* en plaquetas

neonatales fueron 1,9 veces menores que en los adultos, sin embargo, probablemente como resultado del reducido número de muestras de nuestro ensayo, el p-valor de este gen estaba por encima del umbral de significación (p=0,07). Por este motivo se decidió ampliar la lista de genes diferencialmente expresados para incluir aquellos que aun teniendo un p-valor comprendido entre 0,05 y 0,15 mostraban grandes diferencias de Fold Change (Tabla 1).

**Tabla 1|20 genes más sobreexpresados e infraexpresados en plaquetas neonatales ordenadas por Fold Change.**

P-valor comprendido entre 0,05 y 0,15.

| Gen                  | Fold Change | p-valor |
|----------------------|-------------|---------|
| GYPA                 | 20,3        | 0,07    |
| S100A8               | 12,1        | 0,06    |
| YOD1                 | 11,6        | 0,14    |
| B3GNT2               | 11,4        | 0,12    |
| DLK1                 | 10,9        | 0,05    |
| TUBB2A               | 10,5        | 0,05    |
| HMGB2                | 9,8         | 0,06    |
| RHAG                 | 9,4         | 0,12    |
| CAT                  | 7,7         | 0,13    |
| HSPD1                | 7,3         | 0,11    |
| NPM1                 | 7,1         | 0,09    |
| LXN                  | 6,9         | 0,10    |
| RPL35                | 6,2         | 0,05    |
| FECH                 | 6,0         | 0,13    |
| TMEM110-MUSTN1       | 5,7         | 0,06    |
| HSPA8 /// SNORD14C-D | 5,5         | 0,08    |
| CCNB1                | 5,4         | 0,12    |
| GSPT1                | 5,3         | 0,06    |
| RPS21                | 5,2         | 0,12    |
| GCH1                 | 5,2         | 0,08    |
| MOB1A                | -3,2        | 0,08    |
| RAB30                | -3,2        | 0,13    |
| PLA2G12A             | -3,4        | 0,13    |
| RTN1                 | -3,5        | 0,06    |
| NREP                 | -3,7        | 0,12    |
| CABP5                | -3,8        | 0,14    |
| C17orf57             | -3,8        | 0,07    |
| ITGB3BP              | -4,1        | 0,12    |
| OVOS2                | -4,2        | 0,06    |
| HLA-DPB1             | -4,3        | 0,08    |
| ENDOD1               | -4,5        | 0,08    |
| MSRB3                | -5,0        | 0,06    |
| ZBTB38               | -5,0        | 0,13    |
| TMEM70               | -5,5        | 0,13    |
| BEND2                | -5,7        | 0,09    |
| KIAA0564             | -6,3        | 0,13    |
| LOC100129973         | -6,6        | 0,06    |
| SLC25A43             | -7,0        | 0,12    |
| ZNF385D              | -7,8        | 0,08    |
| GRHL1                | -8,1        | 0,08    |

Tras la aplicación de este criterio, encontramos que las plaquetas neonatales mostraban una vez más un enriquecimiento en genes implicados en el procesamiento de DNA/mRNA (*HMGB2*), reorganización del citoesqueleto (*TUBB2A*), y genes que codifican a enzimas indirectamente relacionadas con la reactividad plaquetaria (*CAT*). En contraste, los genes que codifican a proteínas de unión a calcio (*C17orf57*, *CABP5*) y exocitosis de gránulos (*RTN1*) mostraron una fuerte tendencia a estar infraexpresados en neonatos, en comparación con adultos.

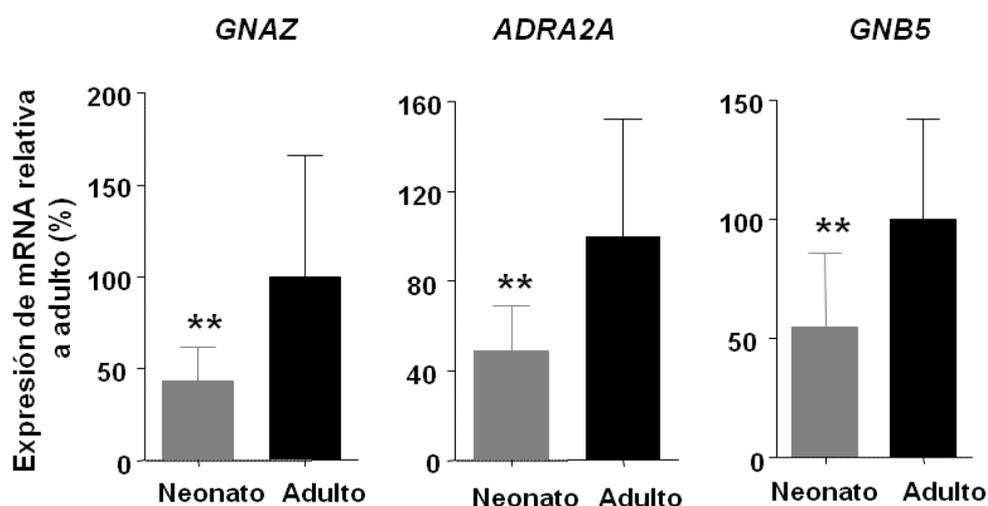
### **3.6. Validación de los datos del microarray**

Con la finalidad de validar los datos del array, realizamos experimentos de qRT-PCR usando el mismo mRNA que originalmente se empleó en los arrays, pero también mRNA de otras muestras (N = 16 muestras / grupo). Centramos nuestro interés en el estudio de un conjunto de transcritos expresados diferencialmente durante el desarrollo y que participan en: (i) la señalización adrenérgica: *GNAZ* y *ADRA2A* y (ii) señalización acoplada a proteína G (*GNB5*).

*GNAZ* codifica a  $G_{\alpha_z}$ , la subunidad GTPasa de la proteína G, la cual media la transducción de señales aguas abajo de los receptores adrenérgicos- $\alpha_{2A}$  (epinefrina), menos expresados en plaquetas neonatales<sup>172</sup>. Además, *GNAZ* participa en otras vías canónicas como la señalización por Efrina B o la señalización por medio de la familia de Rho GTPasas. Nuestros resultados de qRT-PCR, revelaron una reducción del 57% en los niveles de mRNA de *GNAZ* en las plaquetas neonatales en comparación con las de adulto ( $p < 0,01$ , Figura 6). Estos datos confirman la infraexpresión de *GNAZ* en las plaquetas neonatales encontrada en el microarray (2,83 veces menor en las plaquetas neonatales respecto a las plaquetas de adulto).

Las expresiones reducidas de *ADRA2A* y *GNB5* en las plaquetas neonatales encontrada en nuestro array (-1,9 y -2,5 veces, respectivamente), también se confirmaron en los estudios

de validación. Así, las plaquetas neonatales muestran una reducción de ~ 50% en los niveles de mRNA tanto de *ADRA2A* como de *GNB5* en comparación con las plaquetas de adultos ( $p < 0,01$ , Figura 6).



**Figura 6 | Validación del microarray.** Cuantificación de niveles de mRNA medidos por qRT-PCR. N=16 muestras/grupo. Los valores representan expresión media relativa al adulto control (tomado éste como el 100%)  $\pm$  DE de cada mRNA normalizado con respecto a *ACTB* ( $\beta$ -Actina) (\*\* $p < 0,01$ ).

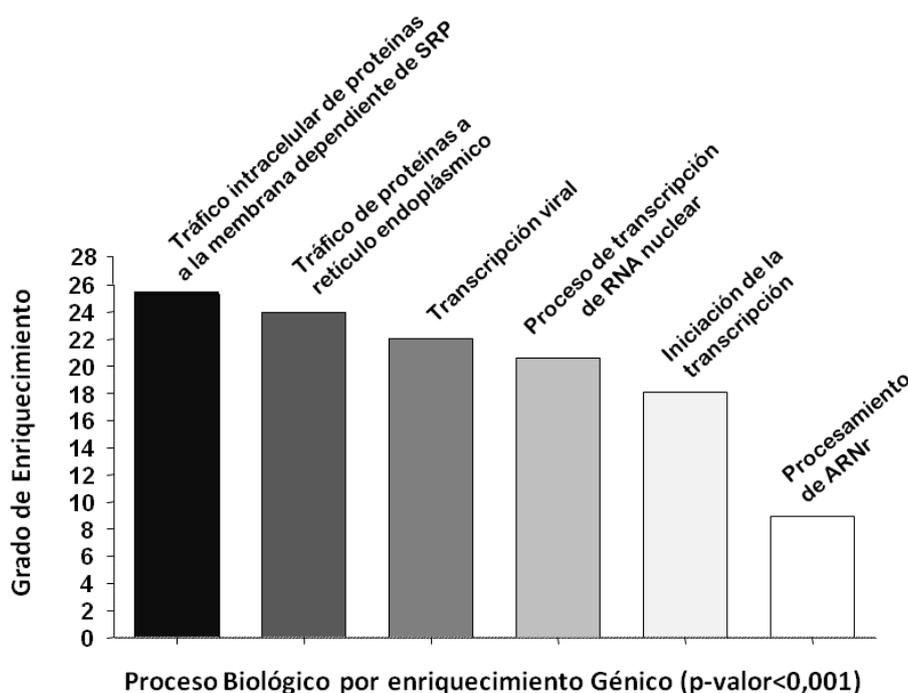
### 3.7. Análisis de rutas biológicas

La lista de genes diferencialmente expresados filtrada por p-valor  $< 0,05$  y Fold Change  $> 2$  o  $< -2$  se analizó utilizando los softwares Partek Genomics Suite and Partek Pathway vinculados a la base de datos de KEGG (Tabla 2). Los resultados mostraron una lista de rutas biológicas ordenadas por el valor de enriquecimiento (se representa también el p-valor y el % de genes presentes descritos para la vía). Debido al hecho de que los transcritos más expresados en recién nacido están involucrados en el procesamiento del mRNA y en síntesis y degradación de proteínas, no es sorprendente que las vías más diferencialmente enriquecidas estén relacionadas con el ribosoma, el proteasoma (con el mayor porcentaje de genes) y la vía de señalización de p53, seguida por el espliceosoma, el ciclo celular, las vías de conservación y transporte del mRNA y, finalmente, la proteólisis mediada por ubiquitinación.

**Tabla 2 | Rutas de señalización más diferentemente expresadas (Sobre- e infraexpresadas) entre plaquetas de neonatos y adultos**

| Nombre de la ruta                      | Enriquecimiento | p-valor<br>Enriquecimiento | % Genes<br>presentes | Genes  |
|--|-----------------|----------------------------|----------------------|--|
| Ribosoma                               | 13,3            | 1,67E-06                   | 21,97                | MRPL14, MRPS15, MRPS16, RPL5, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL21, RPL22, RPL24, RPL26L1, RPL27A, RPL32, RPL34, RPL35A, RPL36, RPL36AL, RPL37, RPL37A, RPL38, RPS4X, RPS6, RPS10, RPS15A, RPS17, RPS17L, RPS28, RPSA |
| Proteasoma                             | 8,3             | 2,38E-04                   | 27,27                | PSMA4, PSMB1, PSMB2, PSMB4, PSMC1, PSMC5, PSMD1, PSMD4, PSMD8, PSMD12, PSME4, SHFM1  |
| Ruta de Señalización de p53            | 5,4             | 4,69E-03                   | 19,12                | BID, CCNE1, CCNG2, CHEK2, GADD45B, MDM4, PTEN, RRM2, SERPINE1, SESN3, SFN, THBS1, TNFRSF10B  |
| Esplíceosoma                           | 4,9             | 7,36E-03                   | 15,38                | ALYREF, DDX46, DHX16, HNRNPA1, HNRNPM, ISY1, LSM5, NCBP1, PRPF18, PRPF38A, RBMXL1, SF3B1, SLU7, SNRPA1, SNRPE, SNRPG, SRSF5, SRSF10, THOC2, U2SURP   |
| Ciclo Celular                          | 4,8             | 8,50E-03                   | 15,45                | ABL1, ANAPC1, ANAPC5, ANAPC10, ANAPC11, BUB1B, CCNE1, CDC14A, CDC14B, CDC27, CDKN1C, CHEK2, E2F2, FZR1, GADD45B, MCM6, SFN, SMC3, TGFB2  |
| Conservación del RNA                   | 3,9             | 2,09E-02                   | 15,56                | ALYREF, CPSF2, CPSF6, CSTF3, GSPT2, MSI2, NCBP1, NXT1, PABPC1, PABPC3, PNN, PPP2R1B, PPP2R5E, RNGTT  |
| Transporte de RNA                      | 3,2             | 3,93E-02                   | 12,88                | ALYREF, CLNS1A, EEF1A1, EIF1, EIF2S3, EIF3B, EIF4G3, FXR1, GEMIN8, KPNB1, NCBP1, NDC1, NUP43, NUP50, NUP153, NUPL1, NXT1, PABPC1, PABPC3, PNN, THOC2   |
| Proteólisis mediada por Ubiquitinación | 3,2             | 4,03E-02                   | 13,33                | ANAPC1, ANAPC5, ANAPC10, ANAPC11, CDC27, CDC34, CUL2, CUL5, DET1, FZR1, HERC3, HERC4, SOCS3, TRIM32, UBA6, UBE2NL, UBE2O, XIAP   |

Al realizar análisis adicionales de enriquecimiento utilizando PANTHER Overrepresentation Test, tras eliminar los genes más expresados en reticulocitos de sangre de cordón<sup>185</sup> y tomando como significación  $p < 0,001$ , encontramos resultados similares a los anteriores (que se enumeran en la Tabla Suplementaria 5, Anexo I), resumidos en la Figura 7.



**Figura 7| Análisis de enriquecimiento génico de genes diferencialmente expresados.** Gráfico de barras representando un análisis de enriquecimiento génico ordenado por fold de enriquecimiento. Sólo se muestran los procesos biológicos estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ).

#### 4. Discusión

Con el fin de realizar una comparación completa del transcriptoma de plaquetas ultrapuras de neonato y adulto hemos empleado como herramienta de estudio los perfiles de expresión de microarray. A pesar del limitado número de muestras analizadas en nuestros ensayos de microarray, el uso de pools de muestras ayudó a homogeneizar los resultados

dentro de cada grupo. De hecho, estudios previos informan de que los resultados para la mayoría de los genes no se ven afectados negativamente por el uso de muestras pool<sup>69</sup>. El simple hecho de haber obtenido resultados comparables en dos laboratorios independientes habla positivamente de la solidez de la técnica. Además, en lo que se refiere a los 50 genes más expresados en plaquetas adultas, nuestros datos coinciden con los publicados en trabajos anteriores con un rango de coincidencia que alcanza el 70%<sup>182-184</sup> para el array más similar al nuestro (Gnatenko, 2005)<sup>182</sup>.

En primer lugar nos centramos en el análisis de los genes más expresados en plaquetas. No fue una sorpresa encontrar que muchos de los mRNA más altamente expresados y conservados a lo largo del desarrollo estuvieran relacionados con la biología plaquetaria, es decir, con la agregación y desgranulación plaquetarias, como *GNAS*, *ACTB*, *VCL* y *TMSB4X*. Es de destacar que algunos de estos genes son altamente conservados (*SRGN*, *PPBP*, *F13A1* y *PF4*) y ya aparecían como genes de alta expresión tanto en humanos como en plaquetas de ratón en estudios previos al nuestro<sup>186</sup>. En concreto llama nuestra atención *PPBP*, que codifica la Proteína Básica Pro-Plaquetaria (*Pro-Platelet Basic Protein*), un factor de crecimiento derivado de plaquetas perteneciente a la familia de quimioquinas CXC altamente expresado durante la megacariopoyesis, el cual es almacenado en gránulos  $\alpha$  y activa los neutrófilos antes de la secreción a través de CXCR2<sup>70</sup>. También destaca *PF4*, otra proteína abundante en gránulos  $\alpha$ , con funciones claras y bien conocidas en la hemostasia y la trombosis y que también puede ejercer un efecto pro-inflamatorio en presencia de otros estímulos, como TNF- $\alpha$ , activando neutrófilos<sup>71</sup>. Consideramos importante señalar que, más allá del conocido papel tradicional de las plaquetas en el mantenimiento de la hemostasia, hay un consenso creciente de que las plaquetas también tienen un papel crítico en inflamación y respuesta inmune<sup>72</sup>. Concretamente nuestros datos muestran que la expresión de muchos mRNA que codifican a genes implicados en el sistema inmune se conserva durante el desarrollo en plaquetas humanas. De hecho, se encontró alta expresión, tanto en plaquetas

humanas neonatales como en las de adulto, de transcritos que codifican a subunidades del CMH clase I, como la beta 2 (*B2M*) y también de genes que codifican a *HLA*, como son, *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, y *HLA-E*. Las plaquetas expresan y segregan multitud de moléculas pro- y antiinflamatorias que ayudan a iniciar y modular procesos inmunológicos. Esta conexión de las plaquetas con la inmunidad ha evidenciado un nuevo papel relevante de las plaquetas en los procesos infecciosos y otras patologías, como la trombosis, que pueden ayudar a desentrañar nuevas diferencias a través del desarrollo humano que van mucho más allá de la hemostasia<sup>73,74</sup>.

Además de identificar transcritos de expresión conservada a lo largo del desarrollo en plaquetas, también confirmamos la existencia de genes diferentemente expresados entre plaquetas neonatales y de adultos. Se encontraron 201 genes diferencialmente expresados entre recién nacidos y adultos, de ellos, 162 estaban sobreexpresados y 39 infraexpresados en neonatos. Entre los transcritos diferencialmente expresados prevalecen los relacionados con el procesamiento de mRNA y la síntesis de proteínas (Tabla 2, Figura 7 y Tabla Suplementaria 5 en Anexo I). Esto explicaría por qué las rutas más diferentemente expresadas están relacionadas con síntesis, tráfico y degradación de proteínas: ribosoma, proteasoma, espliceosoma, supervivencia del mRNA, transporte de RNA y proteólisis mediada por ubiquitinación (Tabla 2). Ya que las plaquetas humanas son anucleadas y carecen de capacidad de transcripción, existía la creencia de que la síntesis de proteínas ocurría casi exclusivamente en su célula precursora, el megacariocito. Sin embargo, desde finales de los años 60 numerosos estudios han sugerido que las plaquetas son capaces de sintetizar proteínas tanto *de novo* como en respuesta a estímulos<sup>168,187</sup>. Los megacariocitos dotan a las plaquetas con las herramientas de traducción necesarias para ello: maquinaria citosólica de *splicing*, retículo endoplásmico y ribosomas, factores de inicio y de terminación de la traducción, reguladores de la misma, tales como microRNA y, los elementos más importantes, los mRNA que sirve de molde para la síntesis de proteínas<sup>37</sup>. Surge entonces la pregunta de por qué existen estas

enormes divergencias en la maquinaria de síntesis de proteínas entre plaquetas de neonato y de adulto. Una posible explicación se basa en investigaciones recientes realizadas en plaquetas murinas neonatales cuyos resultados probablemente puedan extrapolarse a seres humanos: las plaquetas neonatales murinas tienen una vida media más larga que las plaquetas adultas. Así es como en un sistema hemostático sometido a continuo crecimiento volumétrico, como es el caso de los neonatos, se pueden mantener los recuentos plaquetarios sin aumentar la producción de plaquetas<sup>175</sup>. Este metabolismo proteico exacerbado en los recién nacidos podría ser un contribuyente importante (o incluso podría ser requisito imprescindible) en la prolongación de la esperanza de vida media de las plaquetas neonatales. Otra proteína que podría estar involucrada en el alargamiento de la vida media plaquetaria neonatal es JunD, cuyo transcrito *JUND* está sobreexpresado en plaquetas neonatales (4,76 veces,  $p < 0,01$ ). De acuerdo con estudios realizados en fibroblastos, JunD tendría un papel protector frente a la senescencia y apoptosis celular dependientes de p53<sup>188</sup>.

Si examinamos en detalle algunas de los transcritos infraexpresados y sus papeles biológicos, aparecen hallazgos que pueden explicar algunos de los comportamientos funcionales de las plaquetas neonatales. En particular, los resultados de nuestro array mostraron que *ADRA2A* está infraexpresado en plaquetas neonatales, lo cual confirmamos en los estudios de validación. Además, demostramos que *GNAZ* un gen involucrado en la activación plaquetaria a través de epinefrina<sup>75,76</sup> está reducido en neonatos lo cual podría también contribuir a la hiporreactividad plaquetaria observada en neonatos a este agonista (mucho más acusada que para otros).

Por último, debemos reconocer ciertas limitaciones en nuestro estudio. Debido a la gran cantidad de sangre requerida en nuestros ensayos, usamos sangre de cordón umbilical como fuente de plaquetas neonatales. Aunque no podemos descartar que las plaquetas de cordón umbilical y la sangre periférica de los neonatos pueden comportarse de manera

diferente, estudios previos han demostrado que las plaquetas neonatales son hiporreactivas y muestran secreción inducida por agonistas alterada independientemente de la fuente de sangre de procedencia (cordón umbilical o sangre periférica neonatal)<sup>107</sup>

Tomados en conjunto, estos resultados apoyan el papel emergente de las plaquetas como células inmunes y describen cómo las variaciones en el transcriptoma plaquetario pueden cooperar para crear el diferente fenotipo de comportamiento observado en las plaquetas neonatales en comparación con las plaquetas adultas. Son necesarios más estudios para evaluar el origen de estas diferencias, si son o no un reflejo de las diferencias a nivel del megacariocito y su posible repercusión en la biología plaquetaria a lo largo del desarrollo. Por último, este estudio proporciona por primera vez datos acerca del transcriptoma de plaquetas neonatales humanas que podrían emplearse en investigaciones futuras con el fin de encontrar nuevas dianas terapéuticas aplicables a la población general.



*Capítulo II: COMPARACIÓN DEL PERFIL DE  
MIRNA PLAQUETARIOS EN NEONATOS  
Y ADULTOS*



## 1. Introducción

Las plaquetas son células anucleadas capaces de mantenerse funcionales en la circulación sanguínea durante un tiempo medio de 10 días. Esta necesidad de adaptarse a las situaciones de su microambiente explica que las plaquetas conserven muchos de los procesos metabólicos de regulación de RNA característicos de las células nucleadas, como son la capacidad de *splicing*, o la de traducir y regular los niveles de RNA por medio de mecanismos post-transcripcionales como por ejemplo los microRNAs (miRNA)<sup>34,37,61</sup>. Los miRNA son moléculas de RNA no codificante de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica por medio de degradación del mensajero o la inhibición de su traducción<sup>189</sup>. Los miRNA regulan la diferenciación del precursor de la plaqueta, el megacariocito<sup>190-192</sup>, y en ausencia de transcripción en la plaqueta, esa estrecha dependencia de mecanismos post-transcripcionales ha resultado en que éstas posean una proporción de miRNA mayor que otros tipos celulares<sup>45,61,193</sup>.

El estudio del contenido de miRNA en plaquetas a lo largo del desarrollo humano (neonato vs. adulto) es importante por varios motivos: (1) La expresión diferencial de mRNA y miRNA se ha asociado con la funcionalidad plaquetaria<sup>61,63,170,194</sup> y por tanto puede ser utilizada para identificar nuevos elementos reguladores de reactividad; (2) los niveles de expresión de miRNA en plaquetas pueden usarse como marcadores biológicos para identificar las diferencias en función plaquetaria entre individuos sanos y enfermos<sup>195,196</sup>; o entre grupos extremos (hiper vs. hiporreactivas) dentro de la población “sana”; (3) finalmente, dada la relativa facilidad con la que se obtienen muestras de plaquetas en comparación con las de megacariocitos y la estrecha relación entre sus transcriptomas<sup>190</sup>, el estudio del perfil de miRNA en plaquetas podría aportar información sobre la biología del megacariocito en estos dos grupos de edad.

Nuestra hipótesis es, por tanto, que los miRNA, como reguladores de la expresión génica y por consiguiente de la funcionalidad plaquetaria, podrían tener un papel relevante en las diferencias en reactividad plaquetaria de los neonatos con respecto a los adultos.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Obtención de muestras**

#### *2.1.1. Líneas celulares*

Las líneas celulares megacariocíticas DAMI, MEG01 y HEL fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), las K562 en medio DMEM (Thermo Fisher Scientific) y las CHP212 en una mezcla 1:1 de MEM y F12K Nut Mix (Thermo Fisher Scientific). Todos los medios se suplementaron con 0.1mM de aminoácidos no esenciales (Thermo Fisher Scientific), un 1% de antibióticos estreptomomicina/penicilina (Thermo Fisher Scientific) y un 10% de suero bovino fetal (Thermo Fisher Scientific). Todas las líneas celulares fueron adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

#### *2.1.2. Plaquetas ultrapuras de neonatos y adultos*

Se recolectaron muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos nacidos a término tras embarazos y partos no complicados y sangre de adultos sanos, de acuerdo con los criterios de exclusión previamente mencionados (ver *Capítulo I, apartado 2.1.*), a través de agujas de calibre 21-G en tubos de citrato sódico al 3,2% (Vacutainer System®; Diagnostica Stago Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido). Las muestras se centrifugaron a 140xg durante 15s para obtener el PRP del que posteriormente se aislaron las plaquetas ultrapuras, tal y como se describió previamente (ver *Capítulo I, apartado 2.2.*).

## 2.2. Array e identificación de sitios de unión in silico a los mRNA de interés

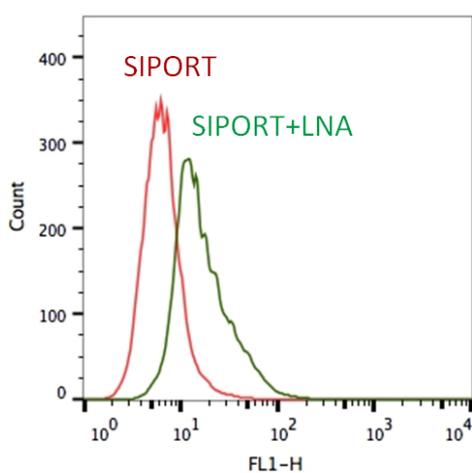
Con el objetivo de identificar el perfil de miRNA en plaquetas neonatales, en comparación con plaquetas de adulto, realizamos un microarray de expresión que permitió la detección de 1.898 miRNA maduros humanos (LCSciences, Houston, TX; Sanger miRBase v18.0 y v19.0) para lo que se empleó 1 muestra pool de RNA total por grupo (neonato vs. adulto). Cada muestra pool estaba formada por 4 muestras individuales de plaquetas de adultos o neonatos humanos sanos.

El array de expresión génica combinado A+B descrito en el *Capítulo 1* confirmó la existencia de 201 genes diferentemente expresados entre plaquetas de adulto y neonato ( $p < 0,05$ ). 162 genes estaban sobreexpresados (Fold Change  $> 2$ ) y 39 genes estaban infraexpresados (Fold Change  $< -2$ ) en plaquetas de neonato con respecto a adulto. Para la validación de este array se estudió por qRT-PCR la expresión de ciertos genes seleccionados en base a su relevancia funcional en plaquetas: *ADRA2A*, *GNAZ* (previamente estudiados en el *Capítulo 1*, *Figura 5 A(i) y B(i)*), *RANBP10* y *STX11* (*Figura 5C(i) y 5D(i)*). Todos ellos, fueron por tanto seleccionados para el estudio de una posible regulación por miRNA.

Para la determinación de miRNA maduros con capacidad potencial para regular, por unión a sus correspondientes extremos 3'UTR, los genes de interés seleccionados, se utilizaron varios algoritmos de predicción de miRNA: microRNA.org<sup>157</sup> (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), TargetScan<sup>197</sup> ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)), miRanda<sup>198</sup> (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), miRDB<sup>199</sup> (<http://www.mirdb.org/miRDB/>), Pictar2<sup>200</sup> (<http://pictar.mdc-berlin.de/>), PITA<sup>201</sup> ([https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07\\_data.html](https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html)), RNA22<sup>202</sup> (<https://cm.jefferson.edu/rna22/>) y RNAhybrid<sup>203</sup> (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>).

### 2.3. Experimentos de transfección

Para validar las predicciones de los experimentos *in silico*, se llevaron a cabo ensayos de transfección con la línea celular escogida como la más adecuada, las MEG-01. Muy brevemente, las células se sembraron 24h antes de la transfección en placas de 6 pocillos en medio completo sin antibióticos. Transcurrido ese tiempo fueron transfectadas con 100nM de miRNA mimic (RNA de doble cadena químicamente modificado que imita a los miRNA endógenos) o con un scramble (un control negativo no específico, SCR) empleando siPORT™ NeoFX™ (Thermo Fisher Scientific) como agente de transfección. Tras 48h de incubación, se cosecharon las células. La eficacia de la transfección mediante siPORT en esta línea celular, evaluada por fluorescencia medida por citometría de flujo tras transfección con un vector GFP, fue de ~50% (Figura 1).



|   | Sample Name          | Subset Name | Count | FITC pos :: Freq. of Parent |
|---|----------------------|-------------|-------|-----------------------------|
| ■ | Meg01 LNA-FITC 1.007 | meg         | 9889  | 55.8                        |
| ■ | Meg01 c-1.003        | meg         | 9914  | 5.65                        |

**Figura 1. Eficacia de transfección.**

Empleando, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, siPORT NeoFX (Thermo Fisher Scientific) se transfectaron células MEG (una transfección por duplicado) con el control negativo miRCURY LNA microRNA Inhibitor (100 nM) marcado con fluoresceína (Exiqon, Vadbaek, Dinamarca). Tras 8 horas, las células se recogieron, se lavaron con salino

tamponado con fosfato (PBS) y se realizó citometría de flujo en un citómetro BD FACScalibur™ (BD Biosciences, Madrid, España). Las muestras se pasaron a través del citómetro de flujo hasta que se captaron 10.000 eventos. El eje X (FH1-H) representa la intensidad de fluorescencia para el canal FL1 en escala logarítmica y el eje Y (count) el número de células. Definimos la eficacia de transfección como el porcentaje de células positivas para FL1 (línea verde) con respecto a la señal de las células no transfectadas con LNA (línea roja) que en este caso fue ~50%.

## **2.4. Aislamiento de RNA**

El aislamiento de RNA total de las líneas celulares transfectadas y de las muestras de plaquetas ultrapuras se realizó mediante TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) siguiendo instrucciones del fabricante. La concentración de RNA y la relación 260/280 se determinaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). La integridad y calidad del RNA fue evaluada mediante el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

## **2.5. Medida de mRNA y miRNA**

### *2.5.1. En líneas celulares*

150ng de RNA total de cada línea celular fueron sometidos a retrotranscripción con el sistema SuperScript III First-Strand Synthesis (Thermo Fisher Scientific). La expresión génica de *ADRA2A*, *GNAZ*, *RANBP10* y *STX11* junto con *ACTB* (como control de referencia endógeno) fue cuantificada por qRT-PCR en un sistema LC480 Real Time PCR (Roche Applied Science, Barcelona, España). La cuantificación de *ADRA2A* se llevó a cabo mediante ensayo SYBRGreen, empleando los primers F: CGACCAGAAGTGGTACGTCA y R: TAGATGCGCACGTAGACCAG. El resto de genes a estudiar fueron evaluados mediante ensayos Taqman: *GNAZ*: Hs00157731\_m1, *RANBP10*: Hs00398714\_m1 y *STX11*: Hs00186823\_m1, (Thermo Fisher Scientific). Para cuantificar la expresión de los miRNA seleccionados se emplearon ensayos comerciales Exiqon (*hsa-miR-127-5p*: 204161, *hsa-miR-433-3p*: 204036; *hsa-miR-539-5p*: 205656, *hsa-miR-940*: 204094 y *snRNA U6*: 203907 como miRNA control; Exiqon Inc, Vedbaek Dinamarca) y Taqman (*hsa-miR-203a*: 000507, *hsa-miR-431-5p*: 001979 y *snRNA U6*: 001973 como miRNA control; Thermo Fisher Scientific).

### 2.5.2. En plaquetas

150ng de RNA total de cada muestra de plaquetas ultrapuras fueron destinados a los experimentos de determinación de niveles de mRNA (N mínima=15 muestras/grupo) y miRNA (N mínima=10 muestras/grupo) mediante qRT-PCR empleando las mismas sondas que en el apartado 2.5.1 de este mismo capítulo, con la excepción del gen usado como control endógeno en los experimentos de miRNA: *hsa-miR-107* [204468 (Exiqon) y 000443 (Taqman)].

### 2.6. Medida de los niveles proteicos de los genes de interés

Las suspensiones de células transfectadas se lisaron en PBS frío suplementado con un 1% de Triton X-100 y un 1% de inhibidores de proteasas y fosfatasas (P8340 y P5726, Sigma-Aldrich, Madrid, España) en hielo durante 15 min. Los lisados se centrifugaron a 12.000xg durante 20 min a 4°C y los sobrenadantes se recogieron para el análisis de la concentración de proteína usando el ensayo de determinación proteica del ácido bicinquinónico (BCA) de Pierce (Sigma-Aldrich). Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-Dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), transferidas a membranas de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) (GE Healthcare, Barcelona, España) e incubadas con el anticuerpo policlonal anti-receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  [ $\alpha_{2A}$ -AR, C19 (Santa Cruz, CA)] y con el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich). A continuación se empleó un anticuerpo secundario apropiado en cada caso marcado con peroxidasa (GE Healthcare). La detección por quimioluminiscencia se llevó a cabo utilizando el kit ECL Western Blot Detection Primer (GE Healthcare) y el equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). El análisis densitométrico se realizó empleando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y los datos se expresaron como cambios en relación a  $\beta$ -actina, empleada como control interno.

## **2.7. Análisis estadístico**

El análisis estadístico del array de miRNA, basado en un análisis de replicados de 1 muestra pool de neonatos vs. 1 muestra pool de adultos, fue realizado por LC Sciences. Los valores de Fold Change obtenidos de dicho análisis fueron los que se emplearon en este estudio.

En lo que respecta a los experimentos de validación de niveles de mRNA, miRNA o proteínas, las comparaciones estadísticas entre los grupos de neonato vs. adulto o de células SCR vs. transfectadas se realizaron por medio del programa SPSS Statistics (IBM, versión 21.0. Armonk, NY) utilizando la prueba de Mann-Whitney o la prueba de la t de Student de dos colas, según el caso. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos.

## **3. Resultados**

### ***3.1. Los resultados del array muestran expresión diferencial de miRNA entre plaquetas de adulto y neonato***

Los datos del array muestran que de las 1.898 sondas para miRNA maduros ensayados, 583 (un 30,7%) fueron detectadas en nuestras muestras de plaquetas. Para probar la solidez de estos datos decidimos comparar los resultados de nuestro array de plaquetas de adulto con algunos de los arrays de plaquetas publicados. Seleccionamos los arrays de Landry (Nature, 2009), Osman (*Platelets*, 2011) y Nagalla (*Blood*, 2011)<sup>61,63,189</sup>, que aun habiendo sido realizados en otras plataformas [miRCURY LNA array versiones 8.1 y 11 (Exiqon) en los casos de Landry y Nagalla, y Taqman microRNA RT kit y Megaplex™ RT primers: Human Pool Set v3.0 containing pool A v2.1 y pool B v3.0 (Applied Biosystem) para Osman] detectaron porcentajes de expresión de miRNA plaquetarios similares a los nuestros (42,7% de un total de 398 sondas

ensayadas en el caso de Landry; 37,3% de 754 sondas para Nagalla y 31,5% de 900 sondas para Osman). La comparación de los 25 miRNA más expresados en nuestro array de adulto con los arrays de plaquetas anteriormente mencionados mostró unos porcentajes de coincidencia del 60% con los arrays de Landry y Nagalla y del 56% con el array de Osman (Tabla 1).

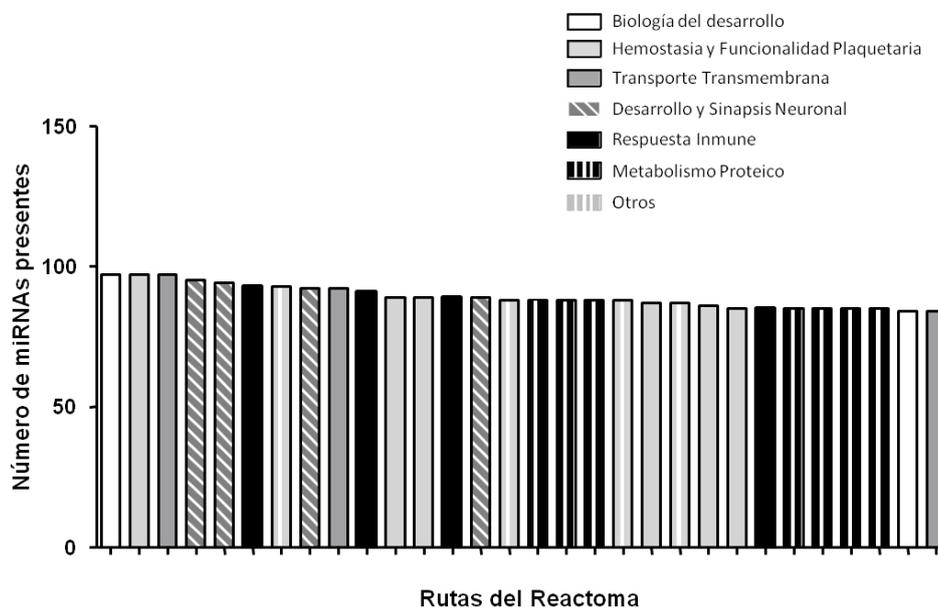
**Tabla 1| Comparativa de los 25 miRNA maduros más expresados en plaquetas de adulto con otros arrays de miRNA publicados**

|              | <b>Caparrós,<br/>2012</b> | <b>Landry, <i>Nature</i>,<br/>2009</b> | <b>Osman, <i>Platelets</i>,<br/>2011</b> | <b>Nagalla, <i>Blood</i>,<br/>2011</b> |
|--------------|---------------------------|--|--|--|
| hsa-miR-26a  | 1                         | 13                                     | 12                                       | 3                                      |
| hsa-miR-191  | 2                         | 14                                     | 6  | 15                                     |
| hsa-miR-146a | 3                         | 16                                     | 10                                       | 28                                     |
| hsa-let-7d   | 4                         | 42                                     | 203                                      | 34                                     |
| hsa-miR-26b  | 5                         | —                                      | 26                                       | 2                                      |
| hsa-let-7g   | 6                         | 83                                     | 43                                       | 26                                     |
| hsa-miR-103a | 7                         | 9                                      | —  | —                                      |
| hsa-miR-107  | 8                         | 24                                     | 150                                      | 43                                     |
| hsa-miR-23a  | 9                         | 19                                     | 81                                       | 4                                      |
| hsa-miR-15b  | 10                        | 22                                     | 70                                       | 18                                     |
| hsa-miR-151a | 11                        | 38                                     | 66                                       | 41                                     |
| hsa-miR-30c  | 12                        | 11                                     | 13                                       | 24                                     |
| hsa-miR-126  | 13                        | 8                                      | 2  | 5                                      |
| hsa-miR-16   | 14                        | 34                                     | 3  | 11                                     |
| hsa-miR-199a | 15                        | 35                                     | 20                                       | 45                                     |
| hsa-miR-30b  | 16                        | 15                                     | 11                                       | 17                                     |
| hsa-miR-24   | 17                        | 29                                     | 4  | 9                                      |
| hsa-miR-92a  | 18                        | —                                      | 35                                       | 95                                     |
| hsa-miR-223  | 19                        | 3                                      | 1  | 1                                      |
| hsa-miR-451a | 20                        | 25                                     | 155                                      | 16                                     |
| hsa-miR-17   | 21                        | 21                                     | 7  | 21                                     |
| hsa-miR-222  | 22                        | 26                                     | 14                                       | 40                                     |
| hsa-miR-106a | 23                        | 21                                     | 8  | 23                                     |
| hsa-miR-20a  | 24                        | 27                                     | 15                                       | 33                                     |
| hsa-miR-21   | 25                        | 18                                     | 28                                       | 6                                      |

Debido al reducido número de muestras empleadas en la realización del array de miRNA (N= 1 muestra pool/grupo), las comparaciones neonato vs. adulto se basaron

exclusivamente en los valores de Fold Change. De los 583 miRNA detectados en nuestro array, 200 aparecieron como diferencialmente expresados entre plaquetas de adulto y neonato. Un 59% (118 miRNA) estaban sobreexpresados en neonato (Fold change>2) y un 41% infraexpresados (82 miRNA, Fold change<-2) (Tablas Suplementarias. 1 y 2, Anexo 2).

Usando el software myRsystem v. 20160511 (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>)<sup>62</sup>, confirmamos que los miRNA con mayores diferencias de expresión entre plaquetas de adultos y neonatos están implicados en rutas relacionadas con la biología del desarrollo, con la hemostasia y la funcionalidad plaquetaria, el transporte transmembrana y metabolismo proteico o la respuesta inmune entre otras (Figura 2). En la Tabla Suplementaria. 3 (Anexo 2) se muestra la identidad de estas rutas junto con el número de miRNA diferencialmente expresados implicados en ellas y otros parámetros como el número de genes de la ruta con los que potencialmente interaccionarían o el *score* de dicha ruta.



**Figura 2| Representación de rutas del reactoma.** Imagen obtenida mediante el software myRsystem v. 20160511 (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>)<sup>62</sup>. En esta representación de rutas se encuentran implicados los miRNA con mayores diferencias de expresión entre plaquetas de neonato y adulto. Se representan las 30 primeras rutas, ordenadas según el número de miRNA involucrados.

### **3.2. La búsqueda in silico de potenciales dianas revela miRNA con capacidad para unirse a genes plaquetarios**

Como ya se ha comentado previamente, los genes a estudiar se seleccionaron de forma dirigida en base a su relevancia en la función plaquetaria (Tabla Suplementaria 4 en Anexo 2). Con el fin de seleccionar los miRNA con capacidad potencial para unirse a estos genes, se establecieron 3 criterios: (i) que los miRNA de interés estuviesen diferentemente expresados ( $\text{Fold change} > 2$  o  $< 0.5$ ) entre plaquetas de neonato y adulto en nuestro array (ver Tablas Suplementarias 1 y 2 en Anexo 2), (ii) que existiese correlación negativa entre los niveles de expresión del miRNA y su correspondiente gen diana según los datos de nuestros arrays y (iii) que la unión miRNA-mRNA fuese pronosticada por al menos 3 de los 8 algoritmos de predicción empleados. Tales criterios permitieron la selección de 7 miRNA para los 4 genes de interés: hsa-miR-376c-3p y 431-5p para *ADRA2A* (ambos predichos por 5 algoritmos), hsa-miR-127-5p y 203a para *GNAZ* (6 y 4 algoritmos respectivamente), hsa-miR-940 para *RANBP10* (7 algoritmos) y hsa-miR-433-3p y hsa-miR-539-5p para *STX11* (ambos predichos por 3 algoritmos) (Tabla 2).

MicroRNA.org predijo 2 sitios de unión para cada uno de los miRNA con capacidad potencial para unirse a *ADRA2A*, 1 sitio de unión para hsa-miR-127-5p y 2 para el hsa-miR-203a (*GNAZ*), 10 para el hsa-miR-940 (*RANBP10*) y 3 y 6 sitios de unión para los hsa-miR-433-3p y hsa-miR-539-5p, respectivamente (*STX11*). En la Figura 3A-D se muestra el sitio de unión de mayor *score* (en caso de haber más de uno) supuesto para cada uno de los miRNA a estudiar en el extremo 3'UTR de su correspondiente gen diana.

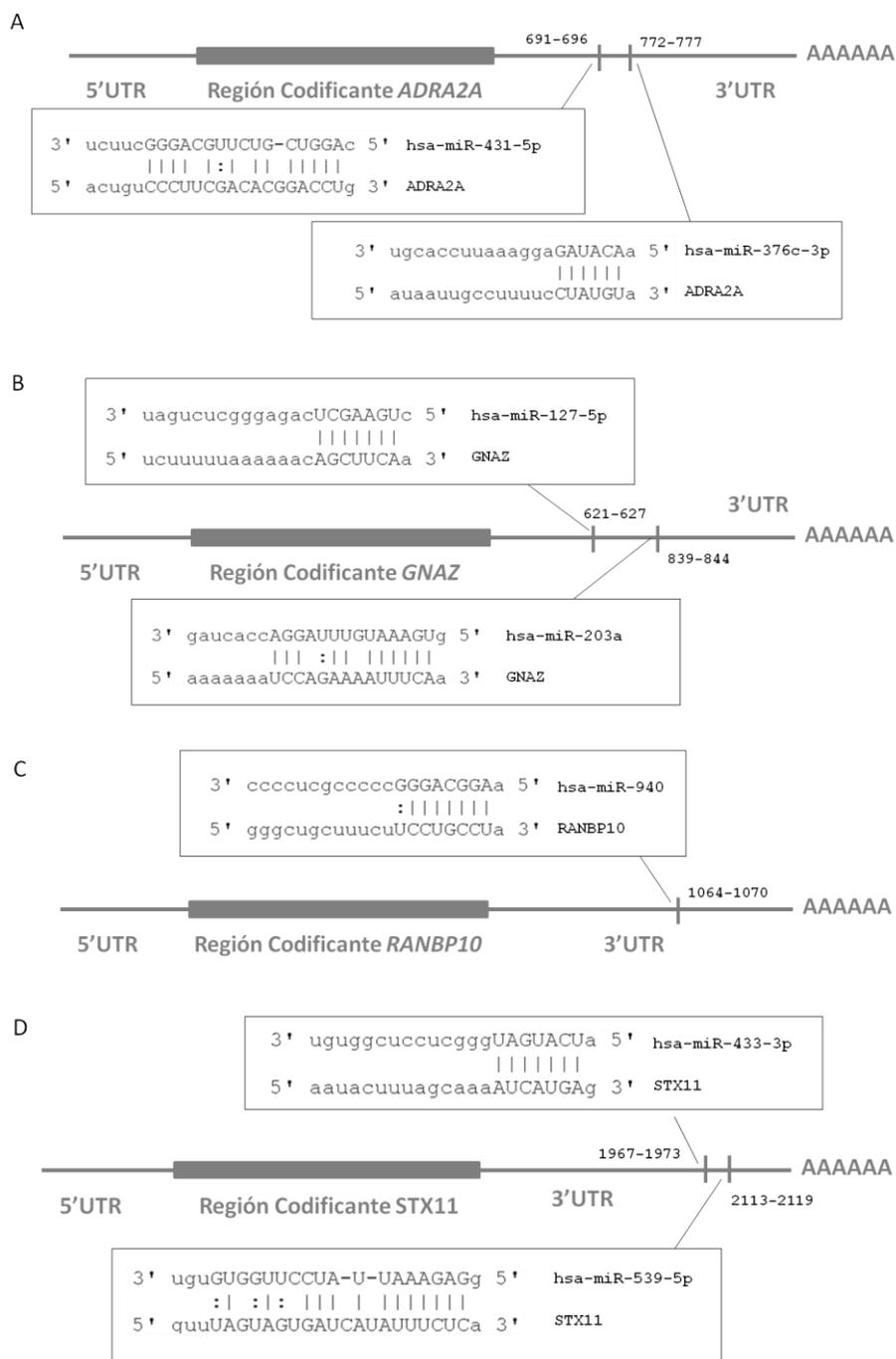
Tabla 2 | Predicciones *in silico* basadas en los datos de los arrays de transcriptómica de mRNA y miRNA

| mRNA    | Fold Change               | miRNA           | Fold Change | miRSVR      | miRWALK |       |         |      |       |           |            | TOTAL |
|---------|---------------------------|-----------------|-------------|-------------|---------|-------|---------|------|-------|-----------|------------|-------|
|         | N vs. A†<br><br>(p-valor) |                 | N vs. A†    |             | miRanda | miRDB | Pictar2 | PITA | RNA22 | RNAhybrid | Targetscan |       |
| ADRA2A  | N↓ (p>0,05)               | hsa-miR-376c-3p | N↑          | 1 (-0,4412) | 1       | 0     | 0       | 1    | 0     | 1         | 1          | 5     |
| ADRA2A  | N↓ (p>0,05)               | hsa-miR-431-5p  | N↑          | 1 (-0,2957) | 0       | 0     | 0       | 1    | 1     | 1         | 1          | 5     |
| GNAZ    | N↓ (p<0,05)               | hsa-miR-127-5p  | N↑          | 1 (-1,0914) | 1       | 1     | 0       | 1    | 0     | 1         | 1          | 6     |
| GNAZ    | N↓ (p<0,05)               | hsa-miR-203a    | N↑          | 1 (-0,1452) | 0       | 0     | 0       | 1    | 0     | 1         | 1          | 4     |
| RANBP10 | N↑ (p<0,01)               | hsa-miR-940     | N↓          | 1 (-0,5163) | 1       | 1     | 1       | 1    | 0     | 1         | 1          | 7     |
| STX11   | N↓ (p>0,05)               | hsa-miR-433-3p  | N↑          | 1 (-0,1191) | 0       | 0     | 0       | 0    | 1     | 0         | 1          | 3     |
| STX11   | N↓ (p>0,05)               | hsa-miR-539-5p  | N↑          | 1 (-0,2560) | 0       | 0     | 0       | 0    | 1     | 0         | 1          | 3     |

La presencia o ausencia del miRNA de interés en la herramienta bioinformática de predicción se representa en la tabla como un “1” o un “0” respectivamente.

En la columna correspondiente a miRSVR se representa entre paréntesis el *score* de la predicción.

† Descripción de la tendencia de Fold Change en el correspondiente array (de mRNA o de miRNA)



**Figura 3** | Representación simplificada de los supuestos sitios de unión para los miRNA seleccionados en sus correspondientes genes diana: *ADRA2A* (A), *GNAZ* (B), *RANBP10* (C) y *STX11* (D). Se muestran los sitios de unión predichos para hsa-miR-376c-3p y hsa-miR-431-5p en el extremo 3'UTR de *ADRA2A* (1526kb), para hsa-miR-127-5p y hsa-miR-203a en el extremo 3'UTR de *GNAZ* (1606kb), para hsa-miR-940 en el extremo 3'UTR de *RANBP10* (3359kb) y para hsa-miR-433-3p y hsa-miR-539-5p en el extremo 3'UTR de *STX11* (4481kb). En cada caso se indican tanto las posiciones de inicio y fin de la secuencia complementaria de cada pareja miRNA-mRNA como la identidad de dichas secuencias de interacción. (Datos obtenidos por medio del algoritmo mirSVR<sup>204</sup>: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>)

### 3.3. Validación de los niveles de expresión de los miRNA y mRNA seleccionados

Antes de comenzar los experimentos de transfección se debían validar los resultados de los arrays. Dado que snU6 no parecía ser un buen control endógeno debido a su baja expresión en plaquetas, decidimos buscar un gen control alternativo para los estudios de miRNA por qRT-PCR en plaquetas de adulto y neonato. Para ello escogimos 2 miRNA que mostraban poca variación entre adulto y neonato según los datos del array (Tabla 3) y comparamos sus niveles de expresión con los de snU6, encontrando que el que menos variaba entre ambos grupos de edad era hsa-miR-107 (Figura 4) por lo que fue seleccionado como gen control.

Tabla 3| Expresión, según array de miRNA, de dos posibles genes control (hsa-miR-16-5p y hsa-miR-107) para ensayos de miRNA en plaquetas humanas

| Reporter Name | Señal Media Adulto | Señal Media Neonato | Fold Change (N vs.A) |
|---------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| hsa-miR-16-5p | 28.517             | 32.062              | 0,17                 |
| hsa-miR-107   | 31.617             | 31.045              | -0,03                |

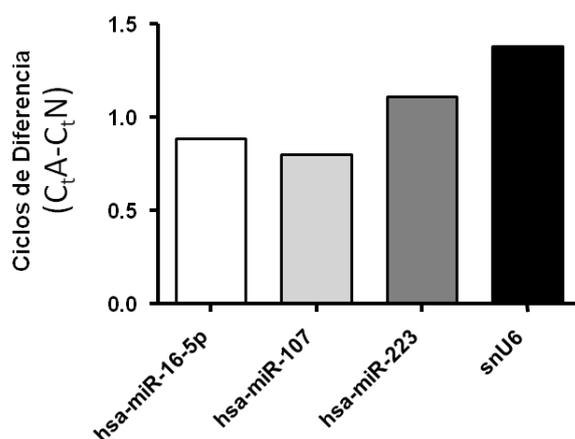
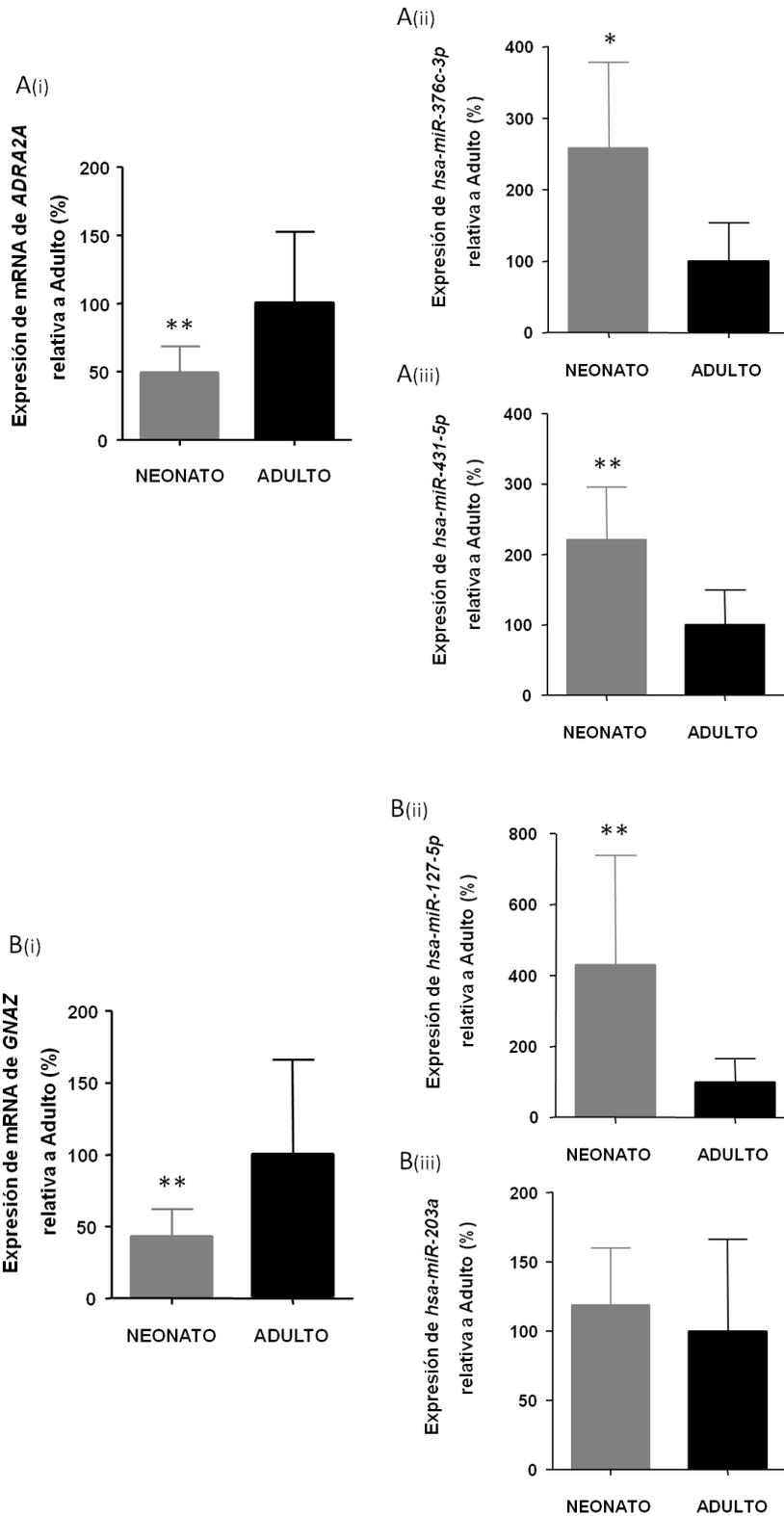
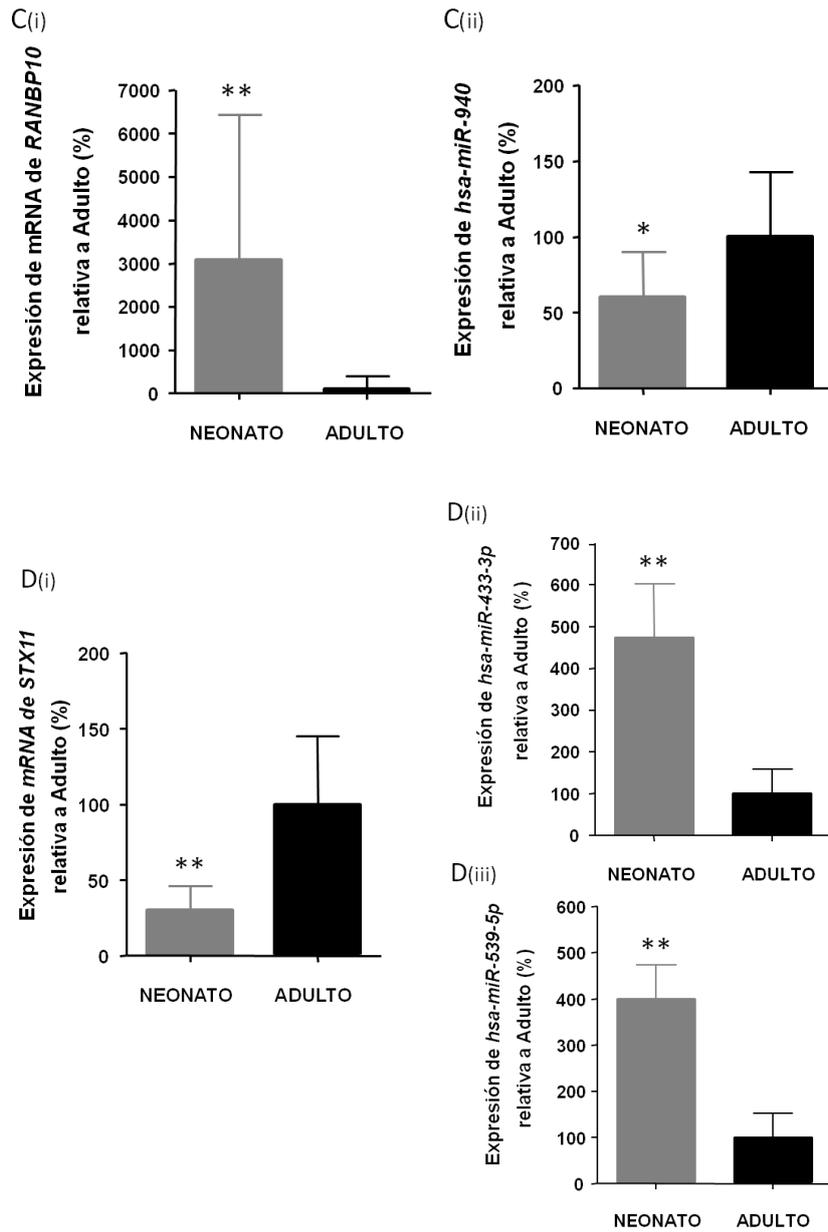


Figura 4| Comparación entre plaquetas de adultos y neonatos de niveles de expresión de hsa-miR-16-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-223 y snU6. Evaluación de los niveles de miRNA que podrían emplearse como genes control en plaquetas mediante qRT-PCR en 2 muestras de adulto (A) y 2 de neonato (N).

A continuación se procedió a la validación de los datos de los arrays por qRT-PCR en un número mínimo de 15 muestras/grupo para los genes diana y 10 muestras/grupo para los miRNA seleccionados. Como indican las Figuras 5A-D todas las parejas a estudiar, salvo una, mostraban una correlación negativa significativa validada por qRT-PCR. La excepción

correspondió a la pareja *GNAZ*: *hsa-miR-203a* donde a pesar de existir una ligera tendencia a una mayor expresión de *hsa-miR-203a* en neonatos ésta no era significativa, por lo que se abandonó su estudio.

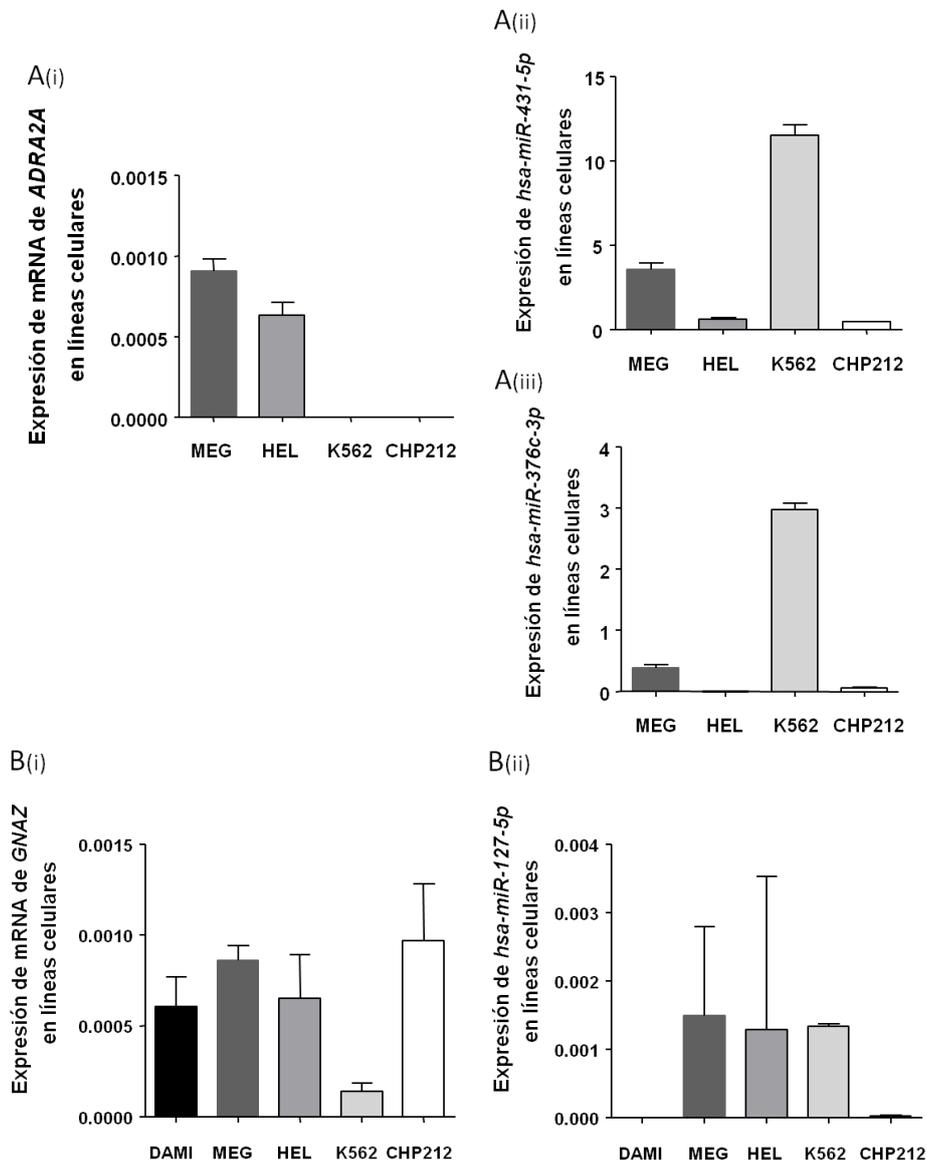


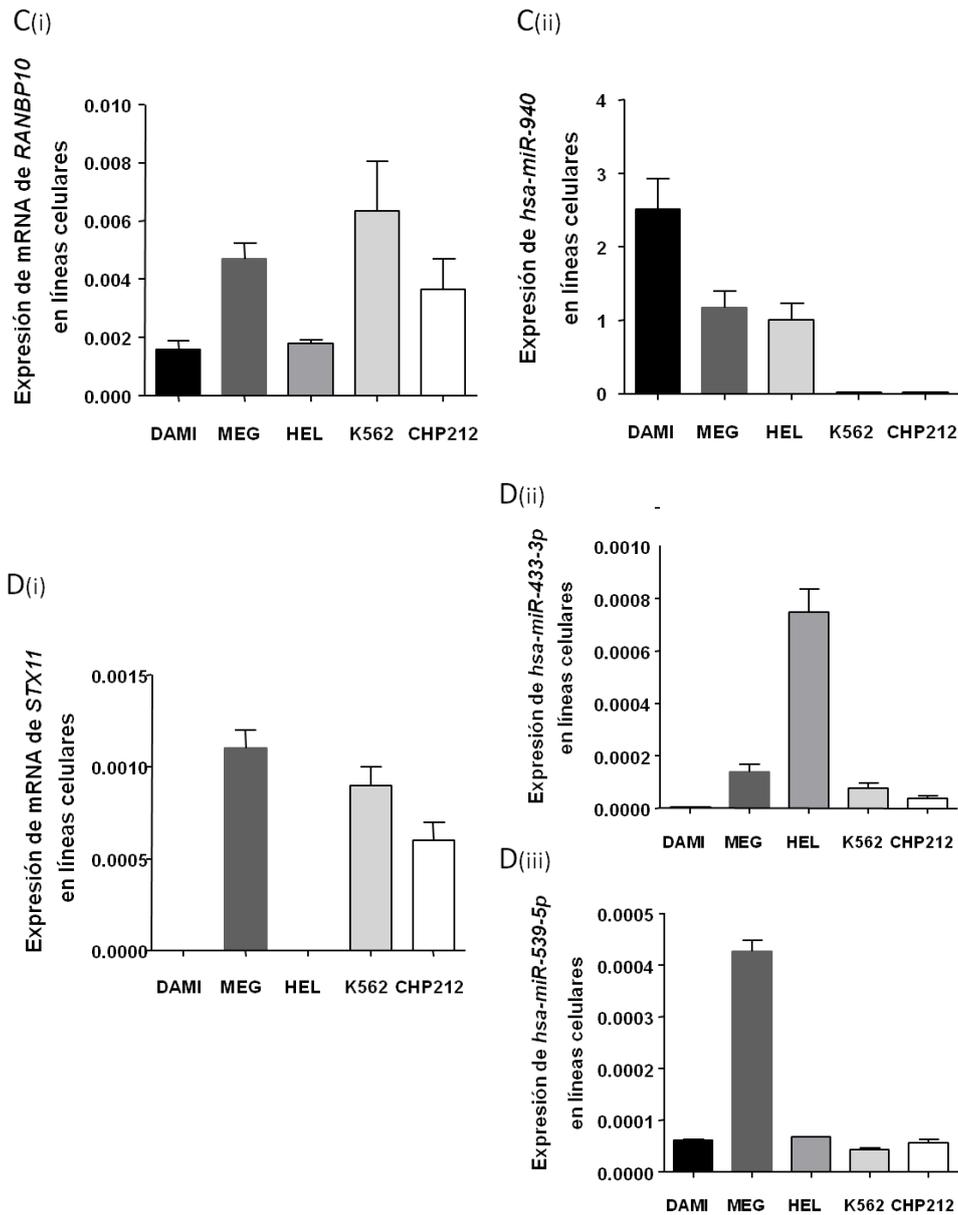


**Figura 5 | Validación de niveles de expresión mostrados por cada pareja miRNA-mRNA en los arrays de miRNA y expresión génica.** Niveles de expresión de **(A<sub>(i)</sub>)** mRNA de *ADRA2A* (Nmin= 15 muestras/grupo) y **(A<sub>(ii)</sub>)** *hsa-miR-376c-3p* (Nmin= 10) y **(A<sub>(iii)</sub>)** *hsa-miR-431-5p* (Nmin= 10), **(B<sub>(i)</sub>)** *GNAZ* (Nmin= 16) y **(B<sub>(ii)</sub>)** de *hsa-miR-127-5p* (Nmin= 11) y **(B<sub>(iii)</sub>)** *hsa-miR-203a* (Nmin= 10), **(C<sub>(i)</sub>)** *RANBP10* (Nmin= 18) y **(C<sub>(ii)</sub>)** de *hsa-miR-940* (Nmin= 12) y **(D<sub>(i)</sub>)** de mRNA de *STX11* (Nmin= 18) y **(D<sub>(ii)</sub>)** de *hsa-miR-433-3p* (Nmin= 11) y **(D<sub>(iii)</sub>)** *hsa-miR-539-5p* (Nmin= 12) en muestras de plaquetas de adulto y neonato evaluados por qRT-PCR que demuestran correlación negativa en la expresión de cada pareja por grupo de edad en todos los casos salvo para el *hsa-miR-203a* donde no encontramos diferencias significativas. Los valores representan la expresión media relativa  $\pm$  DE (como un porcentaje respecto del grupo de adultos control, tomado éste como el 100%) de cada mRNA o miRNA normalizado respecto al correspondiente gen control. (\*\*  $p < 0,01$  y \*  $p < 0,05$ ).

**3.4. Los estudios in vitro no apuntan a una regulación de los genes de interés por parte de ninguno de los miRNA estudiados**

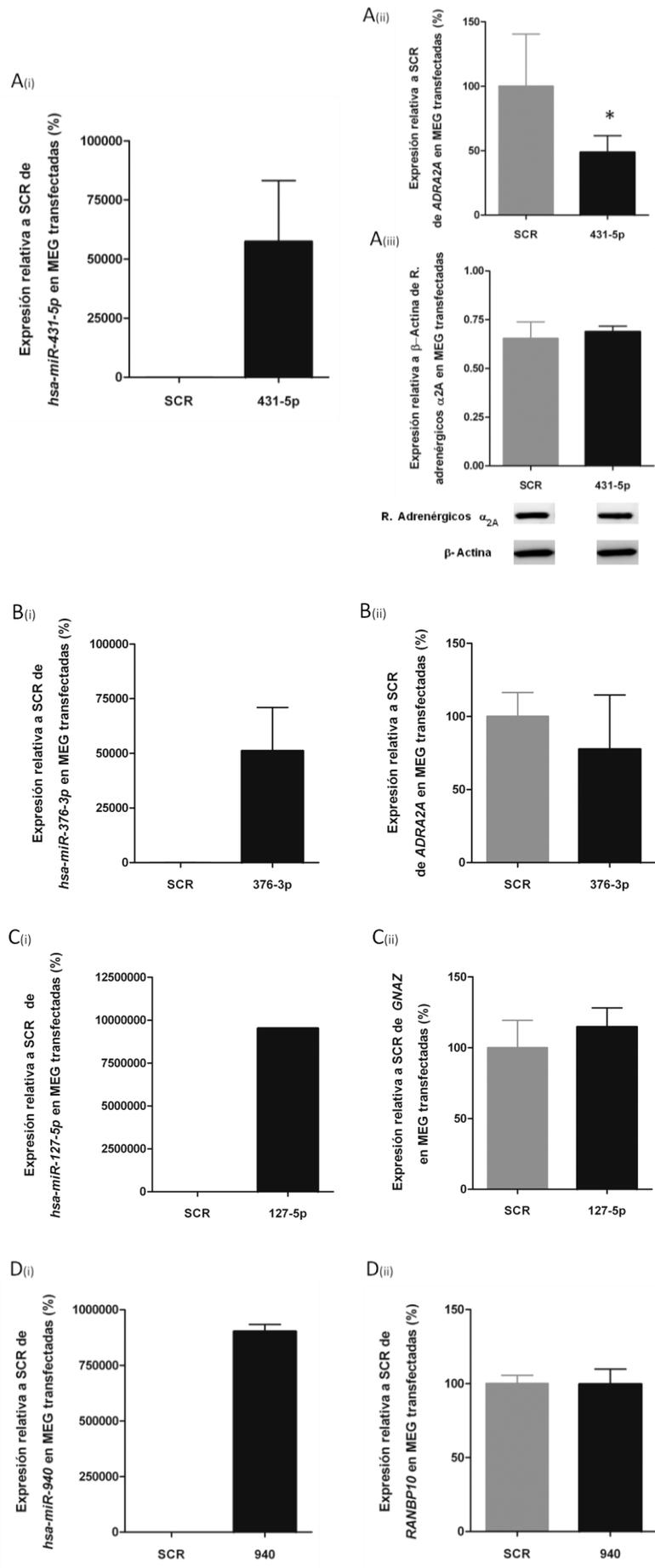
El primer paso necesario para los experimentos de transfección es la selección de la línea celular de trabajo. Para ello se evaluaron los niveles de las parejas miRNA-mRNA en varias líneas celulares de origen megacariocítico (DAMI y MEG-01), eritroide (HEL92.1.7), linfoide (K562) y neuronal (CHP212) (Figuras 6A-D). En general todos los genes de interés presentaban niveles medios de expresión en MEG-01 y niveles relativamente bajos de los miRNA a estudiar en esa misma línea celular, por lo que se seleccionó esta línea celular para los experimentos de transfección.

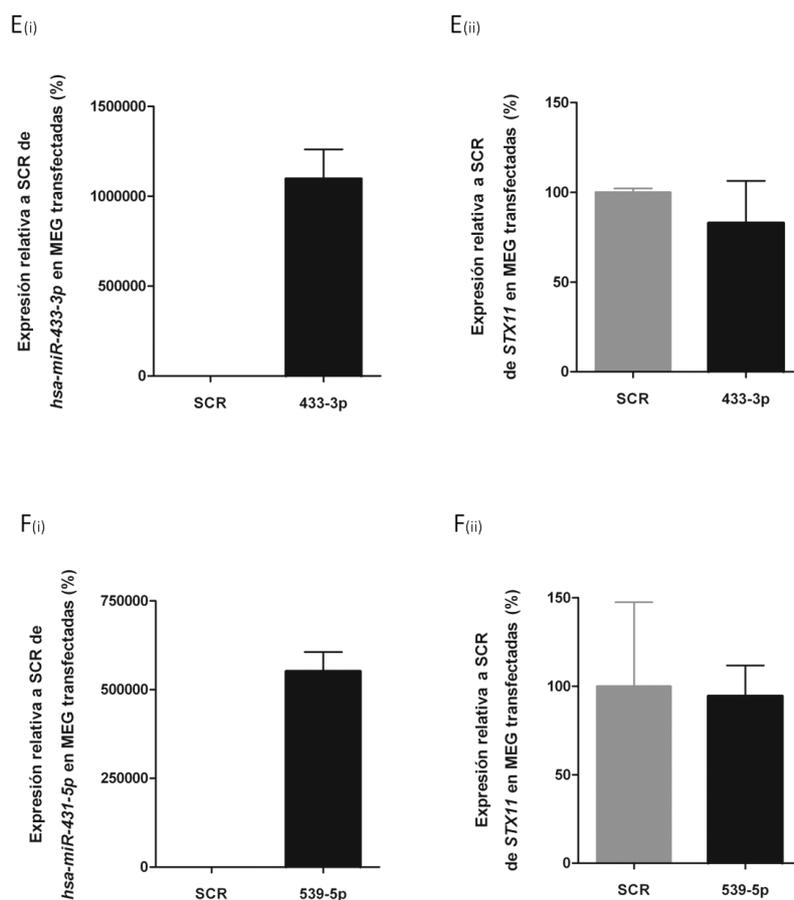




**Figura 6 | Evaluación de la expresión de los pares miRNA-mRNA mediante qRT-PCR en distintas líneas celulares.** Niveles de expresión de **(A<sub>(i)</sub>)** mRNA de *ADRA2A*, y **(A<sub>(ii)</sub>)** de *hsa-miR-376c-3p* y **(A<sub>(iii)</sub>)** *hsa-miR-431-5p*, **(B<sub>(i)</sub>)** mRNA de *GNAZ* y **(B<sub>(ii)</sub>)** de *hsa-miR-127-5p*, **(C<sub>(i)</sub>)** mRNA de *RANBP10* y **(C<sub>(ii)</sub>)** de *hsa-miR-940* y **(D<sub>(i)</sub>)** mRNA de *STX11* y **(D<sub>(ii)</sub>)** de *hsa-miR-433-3p* y **(D<sub>(iii)</sub>)** *hsa-miR-539-5p* en líneas celulares. Los resultados se representan como media ± DE (normalizados respecto al gen control) de tres replicados de cada muestra.

Las transfecciones en la línea MEG-01 con los diferentes miRNA mimics fue exitosa en todos los ensayos realizados, como demuestra el incremento en los niveles de expresión del correspondiente miRNA evaluados por qRT-PCR (Figuras 7A<sub>(i)</sub>-F<sub>(i)</sub>).





**Figura 7 | Efecto de la transfección con miRNA en la expresión de mRNA en células MEG-01.** Evaluación mediante qRT-PCR de los niveles de hsa-miR-431-5p (**A<sub>(ii)</sub>**) y de mRNA de *ADRA2A* (**A<sub>(iii)</sub>**) y, mediante western blot, de los niveles proteicos de receptores adrenérgicos (**A<sub>(iii)</sub>**) en células MEG-01 transfectadas con hsa-miR-431-5p. Se muestra también imagen representativa de western blot. Evaluación de la expresión de hsa-miR-376-3p (**B<sub>(ii)</sub>**) y mRNA de *ADRA2A* (**B<sub>(iii)</sub>**) en células MEG transfectadas con hsa-miR-376-3p. Evaluación de la expresión hsa-miR-127-5p (**C<sub>(ii)</sub>**) y *GNAZ* (**C<sub>(iii)</sub>**) en células MEG transfectadas con hsa-miR-127-5p. Evaluación de los niveles de hsa-miR-940 (**D<sub>(ii)</sub>**) y *RANBP10* (**D<sub>(iii)</sub>**) en células MEG transfectadas con hsa-miR-940. (**E<sub>(i)</sub>** y **F<sub>(i)</sub>**) Evaluación de niveles de hsa-miR-433-3p y hsa-miR-539-5p, y de los niveles de mRNA de *STX11* en células MEG transfectadas con hsa-miR-431-3p y hsa-miR-539-5p (**E<sub>(ii)</sub>** y **F<sub>(ii)</sub>**). Los resultados de qRT-PCR se representan como expresión media relativa al grupo de adultos (tomado como el 100%) ± DE de cada mRNA o miRNA normalizado respecto al correspondiente gen control de tres replicados de tres experimentos independientes. Los resultados de western blot se representan como Media ± DE (normalizados respecto al gen control) de tres replicados de tres experimentos independientes. \* p<0,05.

Los resultados mostraron una reducción significativa de los niveles de mensajero endógeno sólo para el caso de la pareja hsa-miR-431-5p: *ADRA2A*. La reducción significativa

del 42,1% en la expresión de mRNA de *ADRA2A* en las células MEG transfectadas con hsa-miR-431-5p respecto a las transfectadas con el SCR (Figura 7A<sub>(ii)</sub>), no se acompañó, sin embargo, de una disminución en sus niveles proteicos (Figura 7A<sub>(iii)</sub>). No se encontró inhibición al transfectar MEG-01 con los otros miRNA estudiados, para ninguno de los genes diana evaluados (Figura 7B<sub>(ii)</sub> -F<sub>(ii)</sub>).

#### 4. Discusión

Teniendo en cuenta que las plaquetas viven alrededor de unos 10 días y que la vida media de una proteína celular ronda las 46 horas<sup>205</sup>, es razonable asumir que la plaqueta debe ser capaz de mantener su transcriptoma para preservar su proteoma. Además, existen numerosas evidencias de que la plaqueta es capaz de alterar de forma activa su expresión génica dependiendo del microambiente al que está expuesta<sup>34,37,206,207</sup>. La ausencia de núcleo y por tanto la incapacidad para realizar transcripción obliga a la plaqueta a emplear mecanismos post-transcripcionales por medio de los cuales regular su expresión génica, lo cual está relacionado con altos niveles de miRNA, además de mRNA con características específicas como son extremos 3'UTR más largos que los observados en otras células<sup>45,61,193 38</sup>.

Se sabe que los miRNA son capaces de regular la función plaquetaria por medio del control de la expresión génica<sup>61,63,170,194</sup> y que la variación en los niveles de miRNA o en la eficacia de la interacción miRNA-mRNA, como por ejemplo por la aparición de polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polimorphism o SNP) en el extremo 3'UTR del mRNA o en la secuencia del miRNA maduro, podría tener un efecto en el desarrollo de alteraciones hemostáticas<sup>51,208</sup>.

Con el objetivo de investigar si las variaciones en la reactividad plaquetaria entre neonatos y adultos están, en parte, mediadas por los miRNA, seleccionamos una serie de parejas miRNA-mRNA escogidas mediante búsqueda dirigida de miRNA con niveles diferentes de expresión entre neonatos y adultos y que potencialmente pudiesen regular la expresión de 4 genes con papel relevante en función plaquetaria.

Nuestros datos, en cuanto al array de expresión de miRNA, indican un porcentaje de detección de miRNA maduros similar al encontrado en otros arrays en la literatura (entre el 30 y el 40% con respecto al total de sondas ensayadas) lo que demuestra la solidez de la técnica. Además, los 25 miRNA más expresados en nuestras muestras de plaquetas de adulto coincidían con los más expresados en la literatura<sup>61,63,189</sup>, dando así validez a los resultados observados. Mostramos, por primera vez, diferencias en el patrón de expresión de miRNA plaquetarios a lo largo del desarrollo, ya que el 34,3% de los miRNA detectados estaban diferencialmente expresados, con un Fold Change < -2 o > 2, entre plaquetas de neonato y de adulto.

Al procesar estos datos con un software de análisis encontramos que estos miRNA estaban mayoritariamente involucrados en rutas vinculadas a:

(1) Metabolismo proteico que, como ya se vio en el *Capítulo I*, son las rutas que más diferencialmente expresadas están a nivel de transcriptoma de mRNA entre plaquetas de neonato y de adulto.

(2) Respuesta inmune. Recientemente se ha evidenciado el papel crítico de las plaquetas en la respuesta inmune e inflamación<sup>72</sup>, de hecho, los resultados del *Capítulo I* de la presente Tesis muestran que entre los genes más expresados, tanto en plaquetas de neonato como en las de adulto, se encontraban varios genes relacionados con respuesta inmune. El haber encontrado enriquecimiento en miRNA implicados en la regulación de rutas de respuesta inmune podría

estar relacionado con la alta propensión que muestran los neonatos trombocitopénicos a sufrir cuadros infecciosos e inflamatorios como la sepsis o la enterocolitis necrotizante<sup>154</sup>.

(3) Activación y Agregación plaquetarias, procesos en los que las plaquetas neonatales se muestran hipofuncionales respecto a las plaquetas de adulto<sup>87</sup>.

(4) Desarrollo y Sinapsis Neuronal. Las plaquetas y neuronas comparten una maquinaria molecular compleja de secreción que incluye la biogénesis de gránulos, su transporte y la fusión de éstos con la membrana aceptora<sup>209</sup>. Además se cree que el reparto de proteínas y mRNA durante la formación de la proplaqueta ocurre de forma similar al transporte de mRNA a través de axones y dendritas en la neurona<sup>40</sup>.

(5) Desarrollo del Megacariocito y Producción Plaquetaria. Entre los miRNA aquí implicados aparecen reguladores negativos y positivos de la megacariopoyesis como son let-7, miR-10a, miR-27a, miR-34a y miR-223<sup>77,210</sup>.

Los genes cuya posible regulación por miRNA queríamos estudiar se escogieron en base a que se sabían relacionados con rutas defectuosas en la plaqueta neonatal y/o a su relevancia en funcionalidad plaquetaria. Así, *ADRA2A* y *GNAZ* están implicados en la señalización del agonista epinefrina, deficiente en plaqueta neonatal<sup>172</sup>. El primero codifica al receptor de epinefrina y el segundo, a la proteína G encargada de la internalización de esa señal al interior plaquetario. *RANBP10* es una proteína citosólica de unión a tubulina- $\beta$ 1 que modula la formación de microtúbulos de megacariocitos y plaquetas. Las plaquetas de ratones *RANBP10*<sup>-/-</sup> son más esféricas, lo que sugiere que esta proteína ayudaría a mantener la integridad de la banda marginal y a prevenir la anisocitosis plaquetaria<sup>66</sup>. Finalmente *STX11* codifica a syntaxina 11, una SNARE imprescindible para que ocurra la exocitosis gránular plaquetaria, proceso que está alterado en plaquetas neonatales<sup>123</sup>.

Tras la aplicación de una serie de filtros de selección, los programas de predicción *in silico* para los 4 genes escogidos señalaron 7 miRNA como potenciales reguladores de su expresión. Los experimentos *in vitro*, sin embargo, no demostraron control de ninguno de los genes seleccionados por parte de los miRNA predichos *in silico*.

En los últimos años, se han puesto de manifiesto las limitaciones en los sistemas de predicción *in silico* de los miRNA y sus potenciales mRNA diana. Así, el rango de falsos positivos en los programas de predicción varía entre un 24-70% en la literatura<sup>211,212</sup>, y a la inversa, con los estudios *in silico* muchas dianas verdaderas pueden perderse<sup>29</sup>. Una predicción eficaz de pares miRNA-mRNA sigue constituyendo un reto debido a la gran complejidad en las interacciones de los miRNA con sus mRNA dianas en sistemas animales<sup>213</sup> y a que muchos miRNA pueden actuar juntos o de forma individual sobre el mRNA diana produciendo, de esta manera, efectos aditivos o sinérgicos sobre la producción de proteínas<sup>214</sup>. Lo cierto es que aun hay muchos elementos desconocidos en lo que se refiere a la interacción miRNA-mRNA y avanzar en su conocimiento sin duda ayudará a elaborar predicciones más fiables. La aplicación de nuevos métodos de detección de interacciones canónicas y no canónicas desconocidas permitirá el diseño de mejores modelos predictivos<sup>67</sup>.

El caso hsa-miR-431-5p: *ADRA2A* merece una mención aparte puesto que fuimos capaces de observar diferencias significativas a nivel de mensajero, lo que orientaba a una posible regulación de la expresión de *ADRA2A* por el hsa-miR-431-5p, pero que finalmente no se tradujeron en diferencias a nivel de los receptores adrenérgicos en las MEG-01 transfectadas.

En general el efecto de un miRNA sobre su gen diana suele ser modesto y es frecuente que sólo se perciba claramente cuando hay trabajo sinérgico de varios miRNA<sup>211,215</sup>. La transfección es una técnica variable, delicada y compleja, lo que unido al hecho de que el

western blot es una técnica con alta variabilidad puede hacer que no seamos capaces de apreciar variaciones sutiles en los niveles proteicos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los niveles proteicos vienen determinados por más factores aparte de la regulación por miRNA, como son los *ratios* de transcripción, traducción y degradación proteica y que por lo tanto predecir el efecto de un miRNA sobre un mRNA es complejo<sup>216</sup>. Finalmente, los experimentos de transfección se llevaron a cabo en líneas celulares inmortalizadas debido a que el uso de megacariocitos de cultivo primario es complejo. Estas células inmortalizadas son células tumorales que pueden mostrar una fisiología distinta a la de las células de cultivo primario, pudiendo ser capaces de producir moléculas tales como RNA circular (circRNA) que podrían alterar la interacción miRNA:mRNA<sup>217</sup>. Aunque el empleo directo de plaquetas en los experimentos de transfección con miRNA hubiera sido deseable, la transfección de plaquetas constituye un tema controvertido que a fecha de hoy aun acarrea muchas limitaciones técnicas<sup>68</sup>.

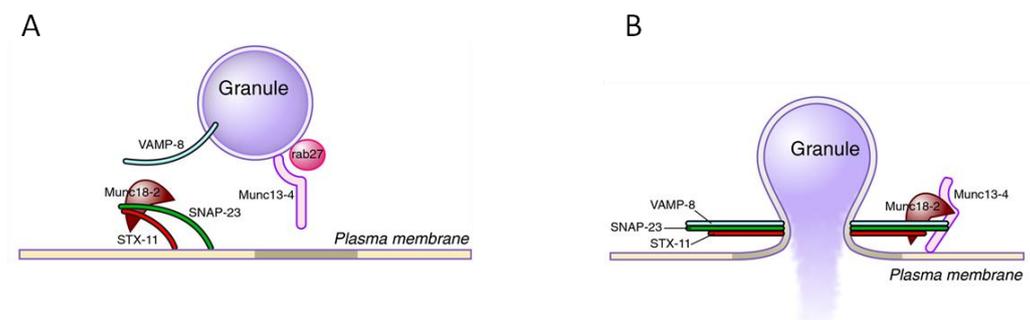
En conclusión, los mecanismos moleculares que controlan la reactividad plaquetaria están pobremente caracterizados. Aunque en los últimos años, varios grupos sugieren un papel relevante del miRNA en la reactividad plaquetaria, se necesitan más estudios para determinar el papel específico del miRNA en las diferencias de reactividad plaquetaria encontradas durante el desarrollo humano.

**Capítulo III: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS  
IMPLICADAS EN SECRECIÓN Y  
SPREADING PLAQUETARIO EN  
NEONATOS Y ADULTOS: MAQUINARIA  
SNARE Y TUBULINA- $\beta$ 1**



## 1. Introducción

Tras la lesión vascular, las plaquetas liberan factores solubles que facilitan la adhesión entre ellas y la formación del trombo. Estos factores son secretados por gránulos intracelulares después de su fusión con la membrana plasmática de las plaquetas<sup>218,219</sup>. La exocitosis granular es mediada por proteínas SNARE (*soluble NSF-attachment protein receptors*), cuyas interacciones se rigen por reguladores específicos, como por ejemplo, las proteínas de la familia Sec/Munc18 (SM) o las de la familia UNC13 (MUNC13D). Las SNARE plaquetarias están presentes en las membranas de los gránulos (*vesicle* o *v-SNARE*) y en la membrana plasmática (*target* o *t-SNARE*). El ensamblaje de una *v-SNARE* (*Vesicle-associated membrane proteins* o VAMP) de los gránulos con dos *t-SNARE*, SNAP y sintaxina (Stx), de la membrana plasmática, conduce a la formación de un complejo fusogénico trimérico<sup>218,219</sup> (Figura 1).



**Figura 1 | Modelo de exocitosis plaquetaria.** Cuando las plaquetas se activan tiene lugar una reorganización del citoesqueleto, centralización de gránulos y fusión de los gránulos con la membrana plasmática para formar un poro de fusión que permite la liberación al espacio extracelular del contenido del gránulo (B). Para que ocurra la fusión de membranas es necesaria la formación de un complejo fusogénico constituido por el ensamblaje de 1 proteína *v-SNARE* o VAMP de localización granular (en azul) y 2 proteínas *t-SNARE*, una de la familia de las sintaxinas (en rojo) y otra de la familia de las SNAPS (en verde), ubicadas en la membrana plasmática. Reproducida y modificada de Heijnen, JTH 2015<sup>220</sup> con permiso.

Entre todas las *v-SNARE* (VAMP2, VAMP3, VAMP8 y VAMP7) y *t-SNARE* (SNAP23, SNAP29, Stx2, Stx4, Stx7, y Stx11) presentes en las plaquetas, solamente VAMP8 y Stx11

parecen tener un papel crítico para la exocitosis<sup>221,222</sup>. Las plaquetas de ratones *VAMP8*<sup>-/-</sup> muestran una alteración de la secreción inducida por agonistas en los tres tipos de gránulos secretores<sup>223</sup>. Las mutaciones en *STX11* y en su regulador de la familia Sec/Munc (*MUNC18B*) originan dos subtipos de linfocitosis hemofagocítica familiar (FHL), FLH5 y FLH4, respectivamente. Estos síndromes se caracterizan, entre otros factores, por mostrar graves defectos de secreción de los gránulos  $\alpha$  y  $\delta$  plaquetarios<sup>222,224</sup>. Además, confirmando su importancia, se ha encontrado sobreexpresión de VAMP8 en plaquetas humanas hiperreactivas<sup>170</sup>. El papel de SNAP23, el miembro dominante de la familia SNAP, en la formación del complejo fusogénico es menos claro<sup>219,225</sup>.

La exocitosis no sólo facilita la activación plaquetaria, sino que además también es requerida para el *spreading* plaquetario. De este modo, las plaquetas de pacientes con síndrome de plaqueta gris, carentes de gránulos  $\alpha$ , y las de ratones Un13d<sup>Jincx</sup>, carentes de Munc13-4 (un regulador SNARE), no se adhieren ni extienden con normalidad<sup>226</sup>.

Las plaquetas de neonatos tanto a término como a pretérmino muestran alteraciones en la liberación del contenido granular<sup>108,123,227</sup>, a pesar de la ausencia de diferencias obvias en el número o contenido de sus gránulos<sup>124,125,127,227</sup>. Los mecanismos moleculares que subyacen a esta exocitosis defectuosa son poco conocidos.

En este estudio, se examinó la expresión de los miembros principales de la maquinaria SNARE en plaquetas neonatales en comparación con las de adulto. También se evaluó el *spreading* y la capacidad de adhesión intrínseca de las plaquetas neonatales, bajo la hipótesis de que la secreción es necesaria para que esto ocurra con normalidad<sup>226</sup>.

En nuestro conocimiento este estudio es el primero en identificar reducciones acusadas en los niveles de proteínas clave del complejo SNARE en plaquetas neonatales, que

probablemente contribuyan al desarrollo de los defectos de secreción granular, adhesión y *spreading* observados en plaquetas neonatales.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Obtención de muestras y extracción de mRNA**

Se recolectaron muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos nacidos a término tras embarazos y partos no complicados y sangre de adultos sanos, de acuerdo con los criterios de exclusión previamente mencionados (*Capítulo I, apartado 2.1.*), a través de agujas de calibre 21-G en tubos de citrato sódico al 3,2% (Vacutainer System®; Diagnostica Stago Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido). Las muestras se centrifugaron a 140xg durante 15 min para obtener el PRP del que posteriormente se aislaron plaquetas ultrapuras y de ellas RNA total y lisados proteicos plaquetarios tal y como ya se describió en el *Capítulo I, apartados 2.2. y 2.3.*

### **2.2. Ensayos de citometría de flujo**

La evaluación de la expresión del marcador de activación P-selectina (CD62) fue realizada en una plataforma FACScalibur (Dickinson, Plymouth, Reino Unido) empleando PRP diluido 1:10 en PBS. Los anticuerpos monoclonales (Becton Dickinson) utilizados fueron: integrina  $\beta 3$  marcada con isotiocianato de fluoresceína (CD61\*FITC) y CD62 marcada con ficoeritrina (CD62\*PE). Para cada muestra, se adquirieron hasta 10.000 eventos y se ajustó el ángulo de dispersión de luz con la ganancia para incluir a la población plaquetaria. A continuación, se analizó la fluorescencia de las plaquetas marcadas (software CellQuest, Becton Dickinson) para obtener tanto el porcentaje de células positivas como la intensidad de fluorescencia media (IFM). La expresión de CD62 antes y después de la estimulación a dosis

creciente de TRAP (0-50  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) se evaluó en muestras de neonatos y adultos (N $\geq$ 6 muestras/grupo).

### **2.3. Análisis de expresión génica**

El RNA total plaquetario fue extraído con TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) como se ha descrito previamente. La reacción de retrotranscripción se realizó con 150ng de RNA total de cada muestra de acuerdo con las instrucciones del fabricante (SuperScript III First-Strand Synthesis, Thermo Fisher Scientific). La expresión génica se midió mediante qRT-PCR en un sistema LC480 Real Time PCR (Roche Applied Science, Barcelona, España) mediante sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) para *STX11* (Hs00186823\_m1), *VAMP8* (Hs01105380\_m1), *SNAP23* (Hs00187075\_m1), *MUNC18B* (Hs00199557\_m1) y *TUBB* (Hs007428828\_s) excepto para *TUBB2A*, que fue evaluada como ya ha sido descrito anteriormente<sup>178</sup> y para *TUBB1*, donde se emplearon los primers F: CAACGAAGCCTACGGTAGGAA y R: TGTCCATCGTCCCAGGTTCT. Los datos obtenidos se analizaron usando el método de ciclo umbral comparativo (método  $2^{-\Delta Ct}$ ) con *ACTB* ( $\beta$ -actina) como control endógeno de referencia para la cuantificación y la normalización. Los datos se expresaron como cambios en relación a los valores medios del grupo de adultos, tomado como el 100%.

### **2.4. Inmunotransferencia**

Las suspensiones de plaquetas ultrapuras se lisaron en PBS frío suplementado con un 1% de Triton X-100 y un 1% de inhibidores de proteasas y fosfatasas (P8340 y P5726, Sigma-Aldrich) en hielo durante 15 min. Los lisados se centrifugaron a 12.000xg durante 20 min a 4°C y los sobrenadantes se recogieron para el análisis de la concentración de proteína usando el ensayo de determinación proteica del BCA de Pierce (Sigma-Aldrich). Las proteínas plaquetarias fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE, transferidas a membranas de

PVDF (GE Healthcare, Barcelona, España) e incubadas con diferentes anticuerpos policlonales contra las proteínas de interés: Stx11 (110113; Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), VAMP8 (104302; Synaptic Systems), SNAP23 (ab4114; Abcam, Cambridge, UK), Munc18b (sc-14563; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), tubulina- $\beta$ 1 (SAB1408037; Sigma-Aldrich),  $\beta$ -actina (A2228; Sigma-Aldrich) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, ab128915; Abcam). A continuación se empleó el anticuerpo secundario apropiado en cada caso marcado con peroxidasa (GE Healthcare). La detección por quimioluminiscencia se llevó a cabo utilizando el kit ECL Western Blot Detection Primer (GE Healthcare) y el equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). El análisis densitométrico se realizó empleando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y los datos se expresaron como cambios en relación a las proteínas  $\beta$ -actina o GAPDH, empleadas como control interno.

## **2.5. Aislamiento de exosomas**

Tras acidificar la sangre por adición de un 10% de ACD a pH 4.5 (97mM de Citrato Sódico, 111mM de Glucosa y 78mM de Ácido Cítrico), se centrifugó a 2500xg durante 15min y se extrajo el plasma pobre en plaquetas (PPP). Añadimos prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ , 18220, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) a una concentración final de  $1\mu\text{M}$  y se centrifugó de nuevo a 2500xg durante 15min recuperando el sobrenadante del que se aislaron los exosomas por medio del uso del kit *Total Exosome Isolation kit with Proteinase K treatment* (Thermo Fisher Scientific). Primero las muestras se sometieron a centrifugación a 2000xg durante 20min a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante y se volvió a centrifugar, esta vez a 10000xg durante 20min a temperatura ambiente, recuperando de nuevo el sobrenadante que se incubó durante 10min a temperatura ambiente tras adición de PBS en una proporción 1:2 y Proteínasa K en una proporción 1:20. Esta enzima es una serín proteasa de amplio espectro capaz de degradar posibles restos de proteínas plasmáticas que hayan podido quedar ligados a las membranas de los exosomas, lo que garantiza que en pasos posteriores se cuantifiquen

únicamente proteínas de origen exosómico. A continuación se añadió *Exosome Precipitation Reagent* en una proporción 1:3,3 y se incubó a 4°C durante 30min y transcurrido este tiempo se centrifugó a 10000xg durante 30min. El pellet de exosomas resultante se resuspendió en 100µL de agua pura libre de proteasas y se tomó una alícuota de 1µL para medir, tras lisar con SDS al 1% en PBS 1X. Finalmente determinamos la concentración proteica mediante el método del BCA de Pierce.

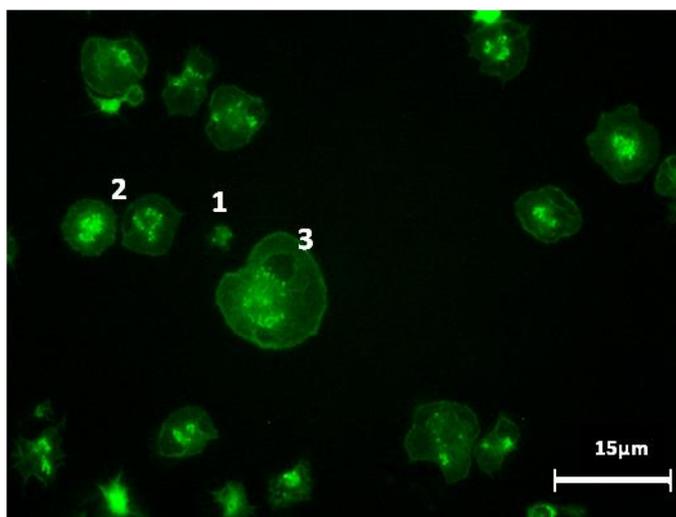
## **2.6. Microscopía electrónica de transmisión de exosomas**

Se depositaron 5µL de suspensión de exosomas sobre una rejilla de Formvar-carbon (Aname, Madrid, España) durante 5 min a 22°C. Seguidamente se retiró el exceso de muestra por capilaridad y la rejilla se lavó depositándola sobre una gota de agua. Finalmente, el contraste se realizó con acetato de uranilo al 2% y se observó la muestra a través de un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1011 (JEOL USA Inc., MA, EE). Las micrografías electrónicas adquiridas a 100kV y 100.000 aumentos se analizaron mediante el software MIP4 Advanced (MIP4 Advanced System; Microm España, Barcelona) que permite determinar el diámetro de las partículas observadas.

## **2.7. Ensayos de microscopía de fluorescencia**

Los estudios de microscopía de inmunofluorescencia se realizaron en plaquetas lavadas con tampón Tyrode como ya se ha descrito<sup>178</sup> (N=6 muestras/grupo). Para los ensayos de cinética a tiempo fijo, las plaquetas lavadas ( $20 \times 10^9$  platelets / L) fueron incubadas en cubres recubiertos con poli-L-lisina (PLL) (P9155, Sigma-Aldrich) a 37 ° C. A las plaquetas se les permitió adherirse y propagarse durante 0, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 min. Después de la fijación con formaldehído al 4%, las plaquetas se lavaron con PBS, se permeabilizaron y se bloquearon con 4% de albúmina de suero bovino (BSA) / 0,1% Triton X-100 en PBS durante 1h a temperatura ambiente y a continuación se incubaron con isotiocianato de fluoresceína-

faloidina (P5282, Sigma-Aldrich) en 0,5% de BSA/0,1% Triton X-100 en tampón PBS. Las plaquetas así fijadas e incubadas se visualizaron a temperatura ambiente en un microscopio Leica 6000B (Leica Microsystems, Madrid, España) usando su software asociado y con una lente de 63X y una magnificación de 1.6X en todos los casos. Los siguientes parámetros fueron evaluados utilizando el software ImageJ: (1) Porcentaje de área ocupada por fluorescencia (AOF%) con respecto a la superficie total; (2) Área plaquetaria media (APM) o tamaño medio de la plaqueta fijada (da una idea del grado de extensión de la plaqueta); (3) El número y (4) el fenotipo de las plaquetas adheridas [Porcentaje de plaquetas No Extendidas ( $0-15\mu\text{m}^2$ ), Parcialmente Extendidas ( $15-40\mu\text{m}^2$ ) y Totalmente Extendidas ( $> 40\mu\text{m}^2$ )] (Figura 2).



**Figura 2 | Imagen representativa de los tres fenotipos diferentes de plaquetas adheridas.** La evaluación se realizó mediante microscopía de fluorescencia de plaquetas lavadas adheridas a PLL. Los fenotipos de plaquetas adheridas se clasificaron como: **(1)** Plaqueta no extendida (área de adhesión  $<15\mu\text{m}^2$ ), **(2)** Plaqueta parcialmente extendida (área de adhesión entre 15 y  $40\mu\text{m}^2$ ) y **(3)** Plaqueta totalmente extendida, (área de adhesión  $> 40\mu\text{m}^2$ ).

Para los estudios de inmunofluorescencia de tubulina- $\beta 1$ , se depositaron plaquetas de neonato y adulto procedentes de PRP en cubres recubiertos de PLL, se centrifugaron ( $1000\times g$ , 1 min), y luego se fijaron con formaldehído al 4%. Las células fijadas se permeabilizaron y se bloquearon con BSA al 4% / 0,1% Triton X-100 en PBS (90 min, temperatura ambiente). Todas las incubaciones posteriores se realizaron con 0,5% de BSA / 0,1% Triton X-100 en PBS. Las

células se incubaron con anticuerpos anti-tubulina- $\beta$ 1 (SAB1408037, Sigma-Aldrich) a 1: 100 durante 90 min a 22°C, seguido de un anticuerpo secundario Alexa Fluor 546 apropiado (Thermo Fisher Scientific). La fluorescencia se analizó en un microscopio Leica 6000B (Leica Microsystems).

### **2.8. Genotipado *TUBB1* Q43P**

El polimorfismo Q43P en el gen de la *TUBB1* se detectó usando primers específicos (TUBB1-F: 5'-GAGGAACACGGGATCGACT y TUBB1-R: 5'-TCGGGGCACATATTTCTAC). Tras la amplificación del gen de la tubulina- $\beta$ 1, los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *PvuII* (Promega, Madrid, España), y los fragmentos se separaron en un gel de acrilamida al 5%. El producto de PCR sin digerir tenía un tamaño de 111 pb (individuos PP), mientras que la escisión genera dos fragmentos de restricción (54 y 57 pb) (individuos QQ).

### **2.9. Ensayos de microscopía electrónica**

Para examinar la morfología de plaquetas de neonatos y adulto (n = 3 muestras/grupo) en reposo y en condiciones activadas se utilizó microscopía electrónica. Para lograr el estado activado, las plaquetas aisladas de PRP se preincubaron con TRAP 10 $\mu$ M durante 15 min a temperatura ambiente. Las plaquetas, en reposo y activadas, se fijaron en glutaraldehído al 1,25% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PE) durante 60 min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se lavaron, se post-fijaron en tetróxido de osmio al 1% (Sigma Aldrich) durante 2 horas a 4 ° C y luego fueron tratadas con acetato de uranilo 2% veronal durante 2 horas a 4 ° C. Después de la fijación las muestras se deshidrataron utilizando para ello alcoholes graduados (30, 50, 70, 90 y 100%, 10 min cada uno) y óxido de propileno y, seguidamente fueron embebidas en Epon (Taab Laboratories, Reading, UK). Se prepararon secciones de las muestras embebidas con un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert, Viena, Austria) y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Merck, Darmstadt, Alemania).

Las secciones de plaquetas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips/FEITecnai12 (FEI; Hillsboro, OR) conectado a una cámara digital Megaview III, a 80 kV. y con una magnificación de 9700X. Para el análisis morfométrico se analizaron un mínimo de 75 secciones de plaquetas seleccionadas aleatoriamente para cada uno de los sujetos recién nacidos y se comparó con los resultados obtenidos para los adultos control. El área plaquetaria, el diámetro máximo de las plaquetas y el número de gránulos total ( $\alpha$  y  $\delta$ ) se midieron utilizando el software Leica QWin Pro v3 (Leica Microsystems).

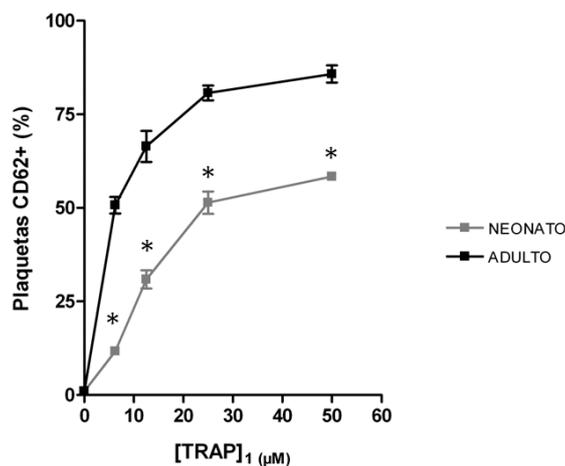
### **2.10. Análisis estadístico**

Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio del programa SPSS Statistics (IBM, versión 21.0. Armonk, NY) utilizando la prueba de Mann-Whitney o la prueba de la t de Student de dos colas, según el caso. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos.

## **3. Resultados**

### **3.1. Los componentes del complejo SNARE y sus reguladores están infraexpresados en plaquetas neonatales**

Las plaquetas secretan el contenido de sus gránulos en respuesta a la activación por agonistas fisiológicos, como por ejemplo la trombina. De acuerdo con datos previos<sup>85,108</sup> nuestros resultados muestran que, en comparación con las plaquetas de adulto, las neonatales expresan niveles significativamente más bajos de CD62, que refleja la secreción de gránulos  $\alpha$ , en respuesta a TRAP en todas las dosis probadas (5-50 mM) ( $p < 0,01$ ) (Figura 3). Se han encontrado deficiencias similares en la liberación de gránulos densos en plaquetas de neonatos<sup>108,123,227</sup>.



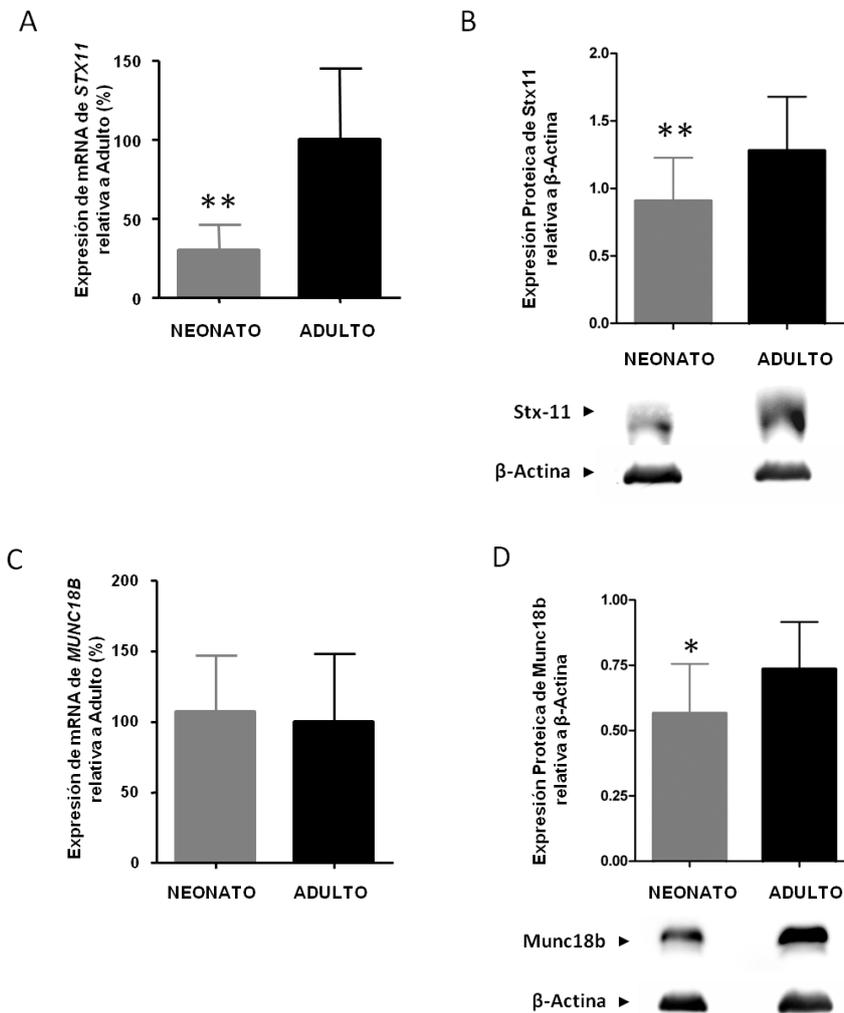
**Figura 3| Expresión del marcador de activación CD62.** Expresión relativa de CD62 en plaquetas de adulto (AD) vs. plaquetas de sangre de cordón umbilical (SCU) después de la estimulación con dosis crecientes de TRAP medida por citometría de flujo ( $p < 0,01$ ). Se representa el porcentaje medio  $\pm$  DE de plaquetas que expresan CD62. N=6 / grupo.

Para determinar cómo pueden afectar los componentes del complejo SNARE y sus reguladores a este proceso, se evaluaron los niveles de expresión de mRNA de *VAMP8*, *SNAP23* y *STX11*, en las plaquetas de neonato vs. adulto, ya que estos genes parecen ser los componentes más importantes del complejo SNARE.

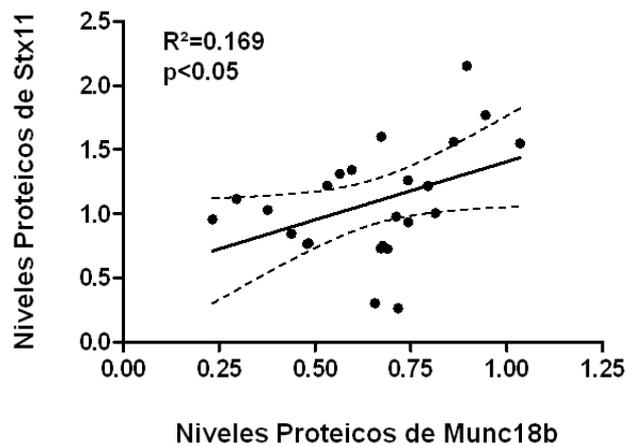
Si bien no se encontraron diferencias en el nivel de mRNA de *VAMP8* o *SNAP23* (datos no mostrados), las plaquetas neonatales mostraron una reducción de 3,3 veces en el nivel de mRNA de *STX11* en comparación con las plaquetas de adulto ( $p < 0,01$ , Figura 4A). En concordancia, el análisis de inmunotransferencia mostró una disminución del 29% en los niveles proteicos de Stx11 en las plaquetas neonatales con respecto a las de adulto ( $p < 0,01$ , Figura 4B).

Dado que los niveles de expresión de Stx11, están regulados por Munc18b, su chaperona específica, seguidamente se evaluó la expresión de esta proteína. No se encontraron diferencias en los niveles de mRNA de *MUNC18B* (Figura 4C), pero, como ya se observó para la expresión de la proteína Stx11, la cantidad de proteína Munc18b se redujo aproximadamente un 25% ( $p < 0,05$ , Figura 4D) en las plaquetas neonatales. De hecho,

encontramos una correlación significativa positiva entre los niveles de ambas proteínas (Figura 5), lo que confirma que dichas proteínas son parcialmente codependientes.



**Figura 4| Expresión de Stx11 y Munc18b en plaquetas de neonatos y adultos. (A) y (C)** Cuantificación de los niveles de mRNA de *STX11* y *MUNC18B* medidos mediante qRT-PCR. N=18 y 15 muestras/grupo para (A) y (C), respectivamente. Los valores representan la expresión media relativa  $\pm$  DE (como un porcentaje respecto del grupo de adultos control, tomado éste como el 100%) de cada mRNA normalizado respecto a *ACTB*. **(B) y (D)** Cuantificación de los niveles de proteína Stx11 y Munc18b medidos por inmunotransferencia, analizados por densitometría mediante el software ImageJ y normalizados respecto a  $\beta$ -actina. Las imágenes de western blot que se muestran aquí son representativas de un mínimo de 16 y 12 muestras/grupo para (B) y (D) respectivamente. Los valores representan la expresión media absoluta  $\pm$  DE de cada proteína normalizada respecto a  $\beta$ -actina (\* $p$ <0,05 y \*\* $p$ <0,01).



**Figura 5|** Correlación de niveles de proteína Stx11 y Munc18b en plaquetas de neonatos y adultos. Gráfico de dispersión que ilustra la correlación de Pearson positiva y significativa ( $p < 0,05$ ) entre los datos de proteína de Stx11 (eje Y) y de Munc18b (eje X) correspondientes a un total de 24 muestras de adultos y neonatos.

### ***3.2. Los exosomas de plasma neonatal poseen menor contenido proteico y son de menor tamaño que los de plasma de adulto***

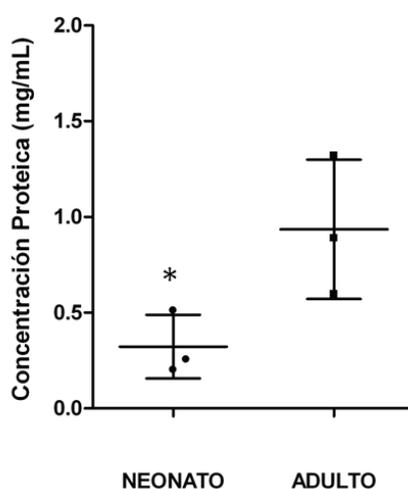
Las vesículas extracelulares, en su mayoría de origen plaquetario, engloban a los cuerpos apoptóticos, las microvesículas y los exosomas, que se diferencian entre sí no sólo por su tamaño (cuerpos apoptóticos: 1-5 $\mu$ m, microvesículas: 0,1-1 $\mu$ m, exosomas: 30-240nm) o por poseer marcadores específicos, sino también por su biogénesis. Las microvesículas y los cuerpos apoptóticos se generan por gemación de la membrana plasmática, mientras que los exosomas provienen de los cuerpos multivesiculares (MVB) por medio de la ruta endocítica<sup>228,229</sup>. Este proceso es complejo, no del todo comprendido, e involucra maquinarias diversas.

Se ha demostrado que las proteínas RAB (RAB11, RAB27 and RAB35) tienen un papel en el transporte de MVB hasta la membrana plasmática y se cree que, muy probablemente, las proteínas SNARE, con papel crucial en la exocitosis de células secretoras como macrófagos, mastocitos, melanocitos, neuronas o plaquetas, sean también responsables de la fusión de membranas que permite la liberación de exosomas<sup>89,230,231</sup>. Un hecho que apoya esta

conclusión es el haber encontrado varias de las proteínas implicadas en la formación del complejo fusogénico, además de proteínas relacionadas con la adhesión y activación plaquetaria y con la activación de la respuesta inmune, al estudiar el contenido proteico de exosomas de plaquetas almacenadas en bancos de sangre<sup>232</sup>.

Las diferencias encontradas en los niveles de algunas de las proteínas SNARE plaquetarias a lo largo del desarrollo nos indujo a plantear la hipótesis de que dichas diferencias entre neonatos y adultos podrían tener efectos sobre la formación de exosomas, bien en su contenido proteico o en su tamaño

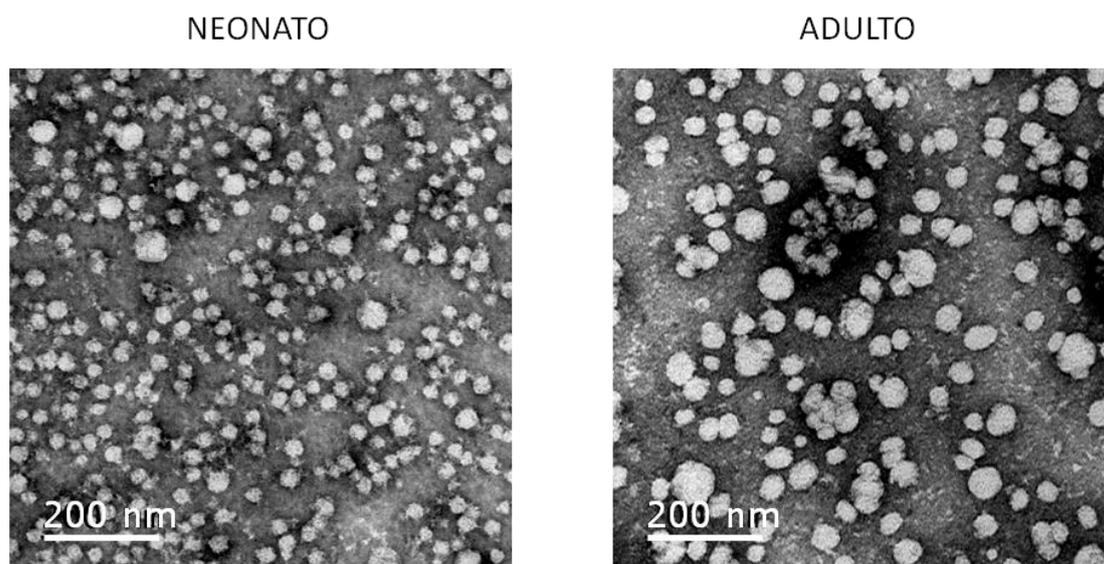
La primera aproximación consistió en evaluar el contenido proteico global de las muestras de exosomas de neonato y adulto. Los resultados de BCA para las suspensiones de exosomas revelaron que los de adulto contienen un 66% más proteína que los de neonato, siendo la diferencia significativa (Figura 6).



**Figura 6| Representación de los valores de concentración de proteína.** La concentración fue determinada por el método del BCA de Pierce en muestras de exosomas de plasma de 3 neonatos y 3 adultos. Se representan los valores correspondientes a cada muestra junto con los valores de media±DE para cada grupo (\*p<0.05).

En segundo lugar evaluamos el tamaño de las suspensiones de exosomas de adulto y neonato. Las imágenes tomadas mediante MET de muestras de exosomas de plasma neonatal

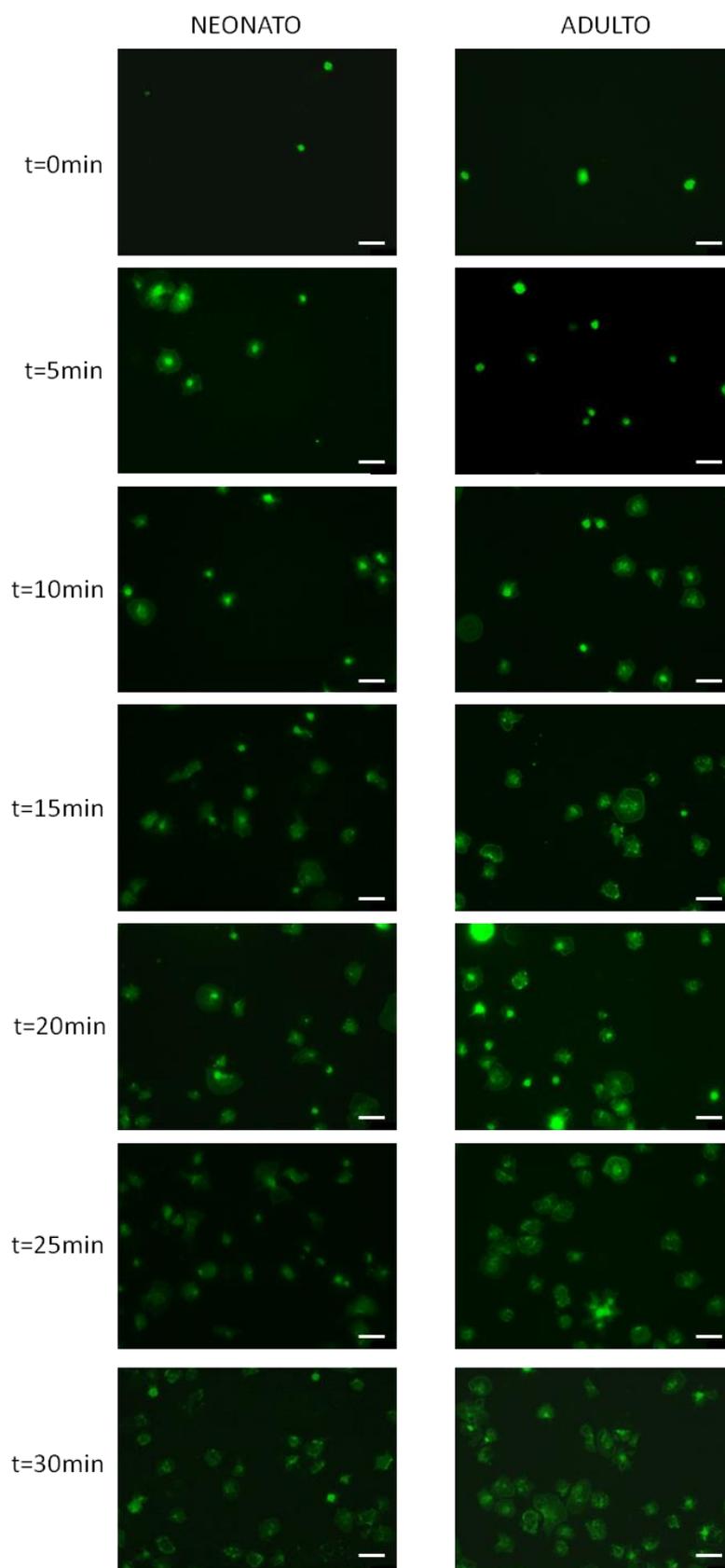
y plasma de adulto mostraban un tamaño claramente menor en el caso de los exosomas de neonato (Figura 7). Así, mientras que el porcentaje de exosomas que alcanza un tamaño mayor o igual a 50 nm es del 7,5% en plasma neonatal, dicho porcentaje está en torno al 25% en el plasma procedente de muestras de adulto.



**Figura 7 | Imagen representativa de exosomas de plasma de neonatos y adultos.** Las imágenes fueron realizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (N=3/grupo). La adquisición se llevó a cabo a 100kV y 100.000 aumentos y analizadas mediante el software MIP4 Advanced.

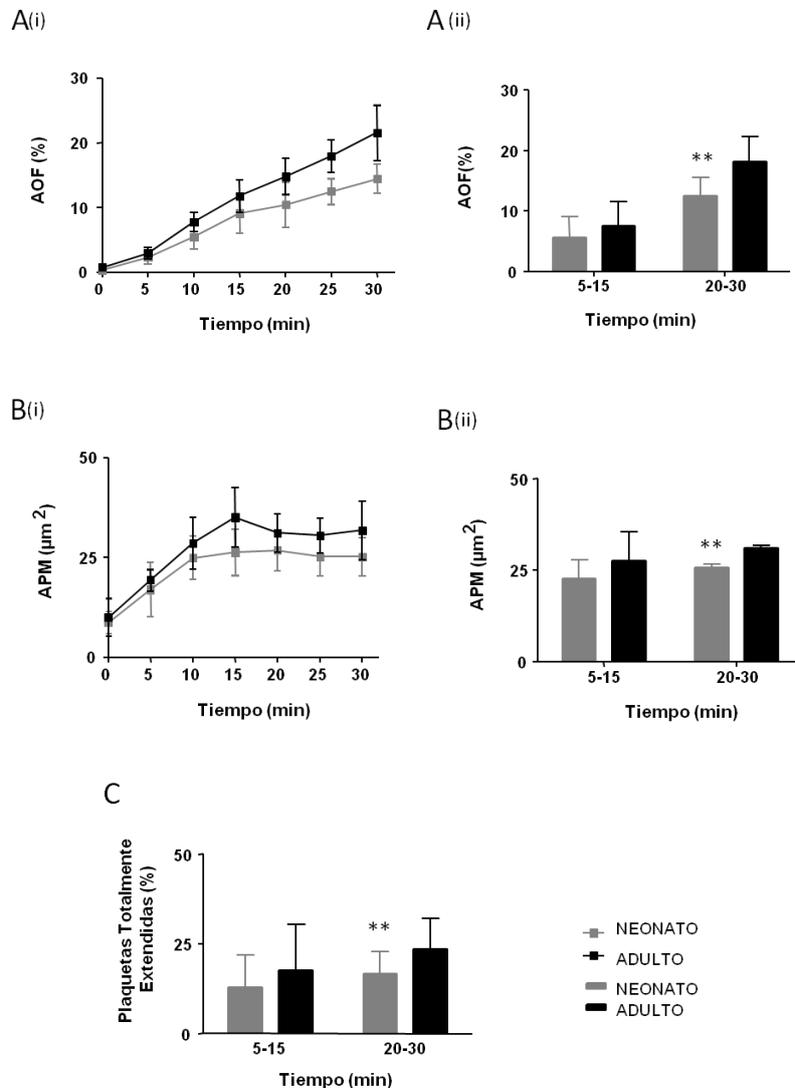
### ***3.3. La adhesión estática y el spreading están reducidos en plaquetas neonatales***

Con el fin de examinar si la alteración de la secreción que muestran las plaquetas neonatales se asociaba a un defecto en sus propiedades adhesivas y de *spreading*, se evaluó la cinética de adhesión de suspensiones de plaquetas lavadas provenientes de cordón umbilical y de adultos sembradas en cubres recubiertos de PLL. En el momento inicial de la siembra (0 min), los parámetros Área Ocupada por Fluorescencia (AOF) y Área Plaquetaria Media (APM) fueron similares en las plaquetas de neonato y adulto (Figura 8).



**Figura 8 | Cinética de adhesión plaquetaria.** Imagen representativa de la evolución del ensayo cinético de adhesión plaquetaria con el tiempo. Las barras blancas de escala representan 7,5 $\mu$ m.

Con el transcurso del tiempo, y en todos los tiempos examinados a partir de entonces (de 5 a 30 min), ambas variables se redujeron en neonatos en comparación con los adultos (Figuras 9A<sub>(i)</sub> y 9B<sub>(i)</sub>).



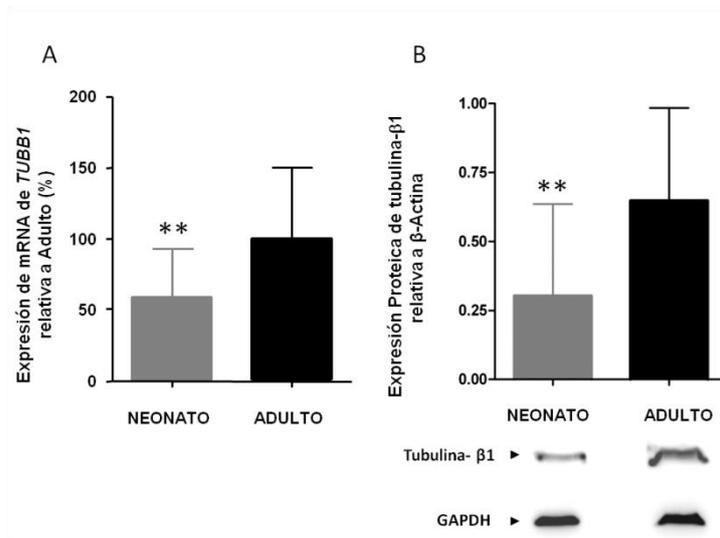
**Figura 9] Cuantificación de la adhesión y el *spreading* plaquetario con el tiempo. (A<sub>(i)</sub>)** Incremento con el tiempo del porcentaje de área ocupada por fluorescencia (% AOF, definida como el porcentaje de área fluorescente con respecto a la superficie total). **(A<sub>(ii)</sub>)** Porcentaje de área ocupada por fluorescencia medida por intervalos de tiempo. **(B<sub>(i)</sub>)** Área Plaquetaria Media (APM) o área media cubierta por plaquetas con el tiempo (una medida del tamaño medio de la plaqueta fijada). **(B<sub>(ii)</sub>)** Área plaquetaria media medida por intervalos de tiempo. **(C)** Fenotipo de plaquetas totalmente extendidas con el tiempo. Las columnas y barras de error representan las medias  $\pm$ DE de 6 muestras para cada tiempo. (\*\* p<0,01).

Las diferencias llegaron a ser significativas durante el período de 20 a 30 min (Figura 9A<sub>(ii)</sub> y 9B<sub>(ii)</sub>). Además, en este intervalo, el número de plaquetas totalmente extendidas fue significativamente menor en el grupo neonatal (Figura 9C). Por el contrario, las plaquetas neonatales mostraron en comparación con los adultos un mayor porcentaje de plaquetas no extendidas en el intervalo de 15 a 30 min ( $p < 0,05$ ). Para todos los tiempos evaluados, el número de plaquetas adheridas a PLL fue ligeramente inferior en neonatos que en adultos (datos no mostrados), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

### **3.4. Las plaquetas de neonato muestran expresión reducida de tubulina- $\beta$ 1**

Los componentes del citoesqueleto determinan los cambios en la morfología de plaquetas que se producen durante la adhesión, agregación y liberación de los contenidos granulares como parte del proceso de activación<sup>233</sup>. En base a esto, nos preguntábamos si el deterioro en la capacidad de adhesión y en las propiedades de extensión de las plaquetas neonatales podría deberse, además de a una maquinaria defectuosa de exocitosis, a diferencias en otras proteínas plaquetarias con papel crítico en la activación, la adhesión y la agregación, como es la tubulina- $\beta$ 1<sup>234</sup>.

La tubulina- $\beta$ 1 es el constituyente principal de la banda marginal de proplaquetas y plaquetas. Esta isoforma de la tubulina constituye hasta un 90% de la tubulina- $\beta$  total de estas células. Para investigar si la expresión de tubulina- $\beta$ 1 está regulada por el desarrollo, exploramos las posibles diferencias en el mRNA de tubulina- $\beta$ 1 (*TUBB1*) y los niveles de expresión de la correspondiente proteína entre neonatos y adultos. Los datos de qRT-PCR mostraron que las plaquetas neonatales presentaban una reducción de *TUBB1* en neonatos en comparación con adultos del 41%. Los estudios de western blot confirmaron esta reducción (Figura 10A y 10B).

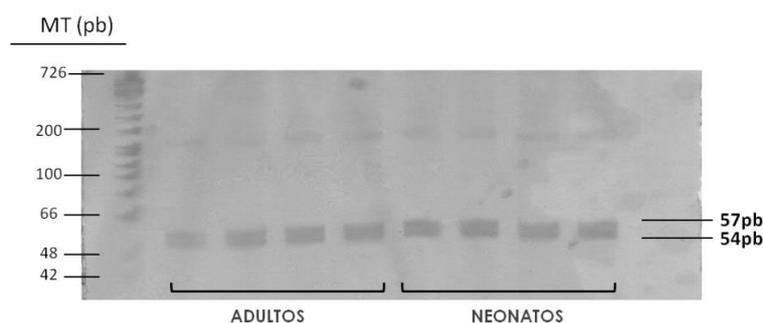


**Figura 10| Expresión en plaquetas neonatales y adultas de tubulina-β1.**

**(A)** Cuantificación de los niveles de mRNA de *TUBB1* medidos mediante qRT-PCR (N= 21 muestras/grupo). Los valores representan la expresión media relativa ± DE (como un porcentaje respecto del grupo de adultos control, tomado éste como el 100%) del mRNA de *TUBB1*

normalizada respecto a *ACTB* **(B)** Cuantificación de los niveles de proteína tubulina-β1 medidos por western blot y analizados por ImageJ (N= 15 muestras/grupo). Se muestran imágenes representativas. Los valores representan la expresión media absoluta ± DE de la proteína tubulina-β1 normalizada respecto a GAPDH. (\*\* p<0,01).

*TUBB1* Q43P es un polimorfismo presente en alrededor del 10% de la población general (5.2% en la población española) que se asocia con una disminución de la expresión de tubulina-β1 y de la reactividad plaquetaria<sup>178,233</sup>. Para probar si las diferencias que encontramos en *TUBB1* y en los niveles de proteína entre las plaquetas de neonatos y adultos eran consecuencia del efecto Q43P, genotipamos todos los sujetos participantes en el estudio confirmando que ninguno de ellos era portador del polimorfismo *TUBB1* Q43P (Figura 11).



**Figura 11| Detección de polimorfismo Q43P en muestras de neonato y de adulto.** El cDNA de *TUBB1* se amplificó por PCR, se digirió con la enzima de restricción

*PvuII*, y los fragmentos resultantes se sometieron a electroforesis en PAGE al 5%. *PvuII* reconoce y corta la secuencia *wild type* CTG<sup>^</sup>CAG en el gen de *TUBB1* amplificado, lo que genera dos fragmentos (de 54 y 57 pb). Los amplicones que contienen el polimorfismo Q43P carecen de esta secuencia y por lo tanto no sufren el corte, dejando el amplicón con su tamaño completo (111pb). Se muestra una imagen representativa conteniendo 4 de los 10 adultos estudiados y 4 de 10 neonatos.

### 3.5. Efecto de la expresión reducida de tubulina- $\beta$ 1 en la morfología de las plaquetas neonatales

Posteriormente, y mediante estudios de inmunofluorescencia, exploramos el potencial efecto que la menor expresión de tubulina- $\beta$ 1 podía tener en el anillo de microtúbulos de las plaquetas neonatales. Como se muestra en la Figura 12, las plaquetas neonatales muestran un anillo de tubulina nítido y brillante, similar a los observados en las plaquetas de adulto, lo que sugiere que los niveles disminuidos de tubulina- $\beta$ 1 no tienen efecto en la banda marginal de las plaquetas.

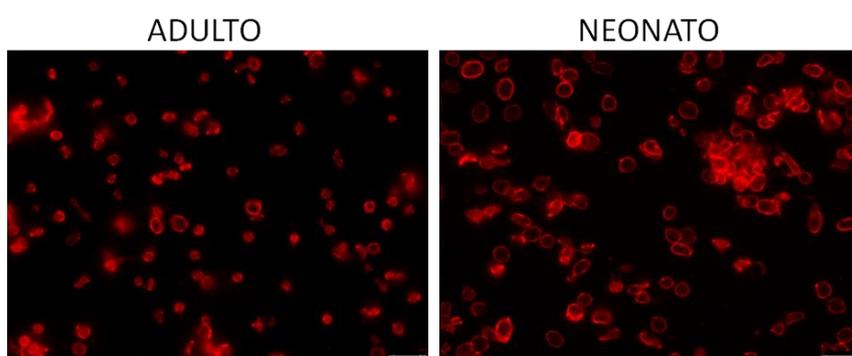


Figura 12| Localización de tubulina- $\beta$ 1 en plaquetas neonatales y de adulto. Microscopía de la banda marginal plaquetaria en adultos y

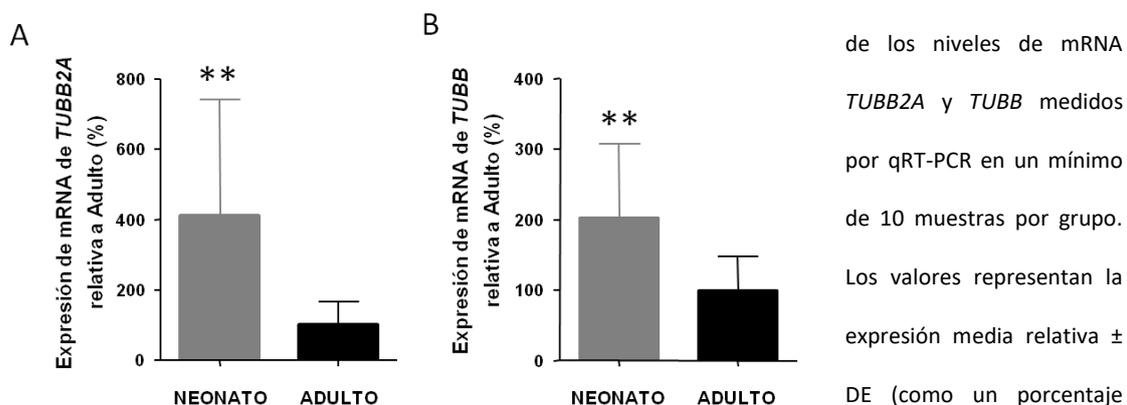
neonatos mediante el uso de inmunofluorescencia indirecta de tubulina- $\beta$ 1 en plaquetas adheridas. La disminución de los niveles de tubulina- $\beta$ 1 en las plaquetas neonatales no afectó al anillo de microtúbulos, que se visualiza tan claramente como en las plaquetas de adultos. Las barras blancas de escala representan 7,5  $\mu$ m.

Estos resultados están en consonancia con los observados en las plaquetas de los homocigotos portadores del polimorfismo TUBB1 Q43P (sujetos PP) la mayoría de las cuales, a pesar de los bajos niveles de mRNA de *TUBB1* (alrededor de un 50% menos que los de individuos no portadores), presentan una banda marginal normal y morfología discoide<sup>178</sup>. Sin embargo, en estos individuos (PP), un número no despreciable de plaquetas es incapaz de mostrar un anillo de microtúbulos claramente definido, sino más bien desdibujado por el citosol<sup>178</sup>.

Ya que las plaquetas neonatales presentan una reducción de la expresión de tubulina- $\beta$ 1 similar a la de los individuos PP, pero todas ellas mostraron una banda marginal normal en

los ensayos de inmunofluorescencia (Figura 12), nos planteamos la hipótesis de que quizás la disminución en la expresión de tubulina- $\beta$ 1 en plaquetas de neonato se compensaba por la sobreexpresión de otras isoformas de tubulina- $\beta$ . Para demostrar esta hipótesis, se evaluaron los niveles de expresión de mRNA de las otras tubulinas presentes en las plaquetas humanas. Los datos de qRT-PCR para *TUBB2A* y *TUBB* revelaron la sobreexpresión de ambas isoformas en plaquetas neonatales en comparación con las plaquetas de adulto (Figuras 13A y 13B).

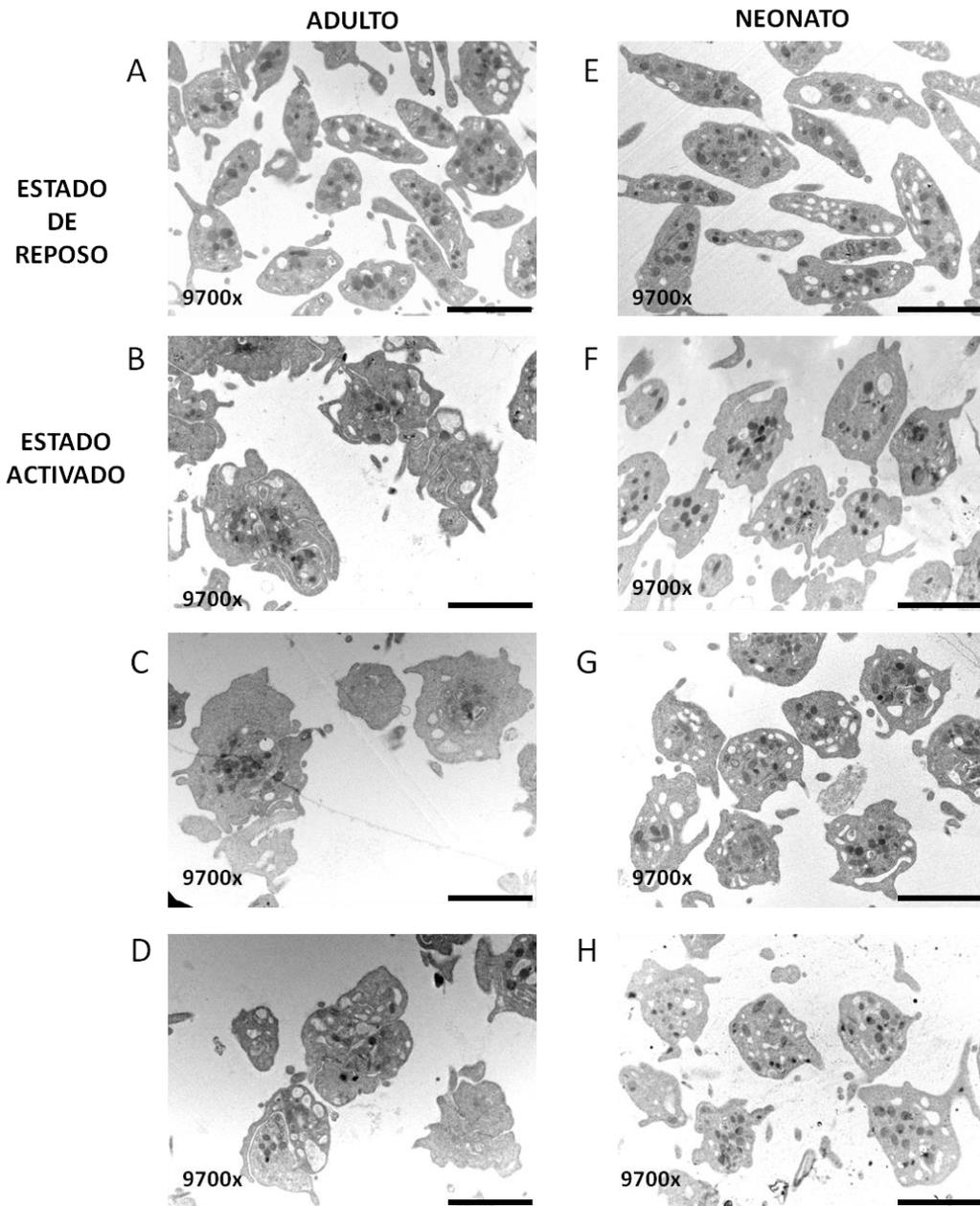
**Figura 13 | Expresión en plaquetas neonatales y adultas de otras isoformas de la tubulina. (A) y (B) Cuantificación**



respecto del grupo de adultos control, tomado éste como el 100%) de cada mRNA normalizado respecto a *ACTB*. (\*\*  $p < 0,01$ ).

### **3.6. El análisis de ultraestructura refleja la exocitosis defectuosa de las plaquetas neonatales**

La activación plaquetaria conduce a reorganización del citoesqueleto, centralización de gránulos, fusión de membranas y liberación de la carga granular. Si los niveles de tubulina- $\beta$ 1 y de las SNAREs *Stx11* y *Munc18b* se encuentran reducidos en las plaquetas neonatales, se podría esperar que estas células mostraran defectos en el reordenamiento del citoesqueleto y/o en el proceso de fusión de membranas. Para abordar esta cuestión, plaquetas de adulto y neonato (3 muestras/grupo), tanto en reposo como estimuladas con TRAP fueron evaluadas por microscopía electrónica. La Figura 14 muestra una serie de micrografías electrónicas (cada una de una muestra independiente) elegida para ilustrar los cambios morfológicos producidos como consecuencia de la activación de ambos grupos (neonatos y adultos).



**Figura 14| Imágenes representativas de la ultraestructura de plaquetas de neonato y adulto.** Las imágenes fueron obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de plaquetas de neonato y adulto en estados basal y activado (después de la incubación con TRAP a dosis fija). Las barras negras de escala representan 2  $\mu\text{m}$ . El área plaquetaria, el diámetro máximo y el número de gránulos totales ( $\alpha$  y  $\delta$ ) fueron cuantificados en un mínimo de 75 secciones para cada condición [plaquetas en reposo (imágenes A y E) y activadas (B-D y F-H)] y estado del desarrollo [neonato (panel izquierdo) frente a adulto (panel derecho)]

De acuerdo con datos previos, en el estado basal las plaquetas neonatales mostraron una típica forma discoide, sin diferencias morfológicas o ultraestructurales obvias con respecto

a las de adulto<sup>127,227</sup> (Figuras 14A y 14E). Tras la estimulación con TRAP tienen lugar alteraciones dramáticas en la morfología de las plaquetas de adulto, apareciendo formación de pseudópodos, una marcada tendencia a la formación de agregados y desgranulación evidente (Figuras 14B-D). Por el contrario, las plaquetas neonatales sufrieron variaciones mínimas, mostrando solamente una forma más esférica, sin signos claros de activación, y una menor tendencia a la aglutinación que las plaquetas de adulto, lo que concuerda con su tendencia a la hiporreactividad. Es importante destacar que las plaquetas neonatales activadas mostraron la presencia de abundantes gránulos (Figuras 14F-H). De hecho, las plaquetas neonatales estimuladas mostraron gránulos claramente visibles y aparentemente incapaces de fusionarse. Estas observaciones nos impulsaron a realizar análisis morfométricos.

### ***3.7. Estudios morfométricos en plaquetas neonatales en reposo y activadas***

Se realizó, para cada condición (reposo y activadas) y para cada estado de desarrollo (neonatos vs. adultos), un examen cuantitativo de un mínimo de 75 secciones de plaquetas con magnificación 9700X. Los resultados, resumidos en la Tabla 1, muestran que en condiciones de quiescencia, las plaquetas neonatales y adultas no presentaron diferencias en ninguno de los parámetros estudiados.

**Tabla 1 | Análisis comparativo de plaquetas de neonato y adulto obtenidas por microscopía electrónica.**

|  | Estado Quiescente  |                     | Estado Estimulado  |                               |
|--|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------|
|  | Adulto             | Neonato             | Adulto             | Neonato                       |
| Número de plaquetas analizadas /muestra              | 100                | 100                 | 75                 | 75                            |
| Área Plaquetaria, $\mu\text{m}^2$                    | 2,77 $\pm$ 0,72    | 2,75 $\pm$ 0,22     | 2,45 $\pm$ 0,25    | 2,79 $\pm$ 0,24               |
| Diámetro Máximo, $\mu\text{m}$                       | 2,59 $\pm$ 0,41    | 2,89 $\pm$ 0,22     | 1,46 $\pm$ 0,26 †  | 2,54 $\pm$ 0,12 <sup>#f</sup> |
| Número de Gránulos por Plaqueta                      | 8,07 $\pm$ 1,60    | 7,07 $\pm$ 0,82     | 3,25 $\pm$ 1,09 †  | 6,76 $\pm$ 0,91 <sup>#</sup>  |
| Número Total de Gránulos en las Plaquetas Analizadas | 713,67 $\pm$ 96,01 | 658,67 $\pm$ 108,69 | 244,67 $\pm$ 92,05 | 465,33 $\pm$ 59,37            |
| Número de Gránulos por $\mu\text{m}^2$               | 2,92 $\pm$ 0,29    | 2,62 $\pm$ 0,52     | 1,40 $\pm$ 0,63 †  | 2,34 $\pm$ 0,07 <sup>#</sup>  |

<sup>#</sup>p $\leq$ 0,05 entre plaquetas neonatales y de adulto en estado estimulado.

†p $\leq$ 0,05 entre plaquetas de adulto en estado quiescente y estimulado.

<sup>f</sup>p $\leq$ 0.05 entre plaquetas de neonato en estado quiescente y estimulado.

Las comparaciones entre estado quiescente y estimulado tanto en adulto como en neonato no son aplicables al parámetro Número Total de Gránulos en las Plaquetas Analizadas.

El Test de Mann Whitney fue empleado en todos los análisis.

Los datos representados corresponden a media $\pm$ DE.

Mientras que las plaquetas neonatales mostraron sólo un cambio mínimo en su diámetro máximo tras estimulación ( $2,89 \pm 0,22$  vs.  $2,54 \pm 0,12$ ) y ningún cambio en el número de gránulos por  $\mu\text{m}^2$  ( $2,62 \pm 0,52$  vs.  $2,34 \pm 0,07$ ) o por plaqueta ( $7,07 \pm 0,82$  vs.  $6,76 \pm 0,91$ ), las de adultos mostraron una clara reorganización del citoesqueleto con una reducción del 56% en su diámetro máximo, así como disminuciones del 48 y 40% en el número de gránulos por  $\mu\text{m}^2$  y plaqueta, respectivamente (Tabla 1).

#### 4. Discusión

Durante el desarrollo, el sistema hemostático se regula tanto a nivel de la hemostasia primaria como de la secundaria. Sin embargo, mientras que los cambios en la hemostasia secundaria están bien caracterizados, las diferencias en la hemostasia primaria en fetos y recién nacidos están todavía por determinar<sup>20</sup>.

En comparación con las plaquetas de adulto, las plaquetas neonatales son globalmente hipofuncionales, con una reducida reactividad en respuesta a agonistas y una secreción defectuosas<sup>85,108,235</sup>. Dado que no existen diferencias obvias ni en los gránulos ni en su contenido entre plaquetas neonatales y de adulto<sup>124,125,127,227</sup>, hasta ahora, la reducción en la secreción inducida por agonistas que presentan las plaquetas neonatales ha sido atribuida a vías de transducción de señal inmaduras<sup>128</sup>. A día de hoy la limitada evidencia disponible también apunta a un deterioro de la movilización de calcio en plaquetas neonatales<sup>122</sup>.

Además de todas estas evidencias, nuestro estudio demuestra que determinadas proteínas del complejo SNARE, que dirige la fusión de membranas necesaria para la secreción de gránulos plaquetarios, tienen expresión disminuida en las plaquetas de los recién nacidos a término. Entre los principales componentes del complejo SNARE trimérico en plaquetas

(VAMP8, SNAP23 y Stx11), encontramos que tanto los niveles de expresión del mRNA de *STX11* como los de la correspondiente proteína están disminuidos en neonatos con respecto a adultos. Estudios previos han sugerido que la isoforma más abundante de una familia de proteínas de secreción dada posiblemente sea la más relevante funcionalmente hablando<sup>221,222,224,225</sup>. Stx11 es la más abundante de las isoformas de las sintaxinas presentes en plaquetas<sup>222,224</sup>, siendo además aproximadamente entre 3 y 8 veces más abundante que SNAP23 y VAMP8, respectivamente<sup>222,224</sup>. Además, la supresión de Stx11 en plaquetas de pacientes con linfocitosis hemofagocítica familiar 4 (FHL4) es suficiente para disminuir la secreción de gránulos  $\alpha$  y  $\delta$  plaquetarios. Tomados en conjunto, todos estos datos apoyan el papel funcional crítico de Stx11 en la secreción de plaquetas.

También hemos demostrado una disminución significativa en los niveles de expresión proteica de Munc18b, el regulador de STX11, en las plaquetas de los recién nacidos en comparación con los adultos. Estudios anteriores ya habían mostrado que los niveles de Stx11 y Munc18b son parcialmente codependientes<sup>224</sup>. Así, las plaquetas de los pacientes con defectos en *MUNC18B* mostraron tanto una disminución en Munc18b y Stx11, como una exocitosis notablemente defectuosa, mientras que otras sintaxinas no se vieron afectadas<sup>224,236</sup>. Además, experimentos de inmunoprecipitación demostraron, de manera concluyente, que estas 2 proteínas (Stx11 y Munc18b) interactúan formando un complejo<sup>224</sup>. En concordancia con esos datos, encontramos una asociación significativa entre los niveles de expresión de ambas proteínas (Figura 5).

Nuestros resultados de microscopía electrónica mostraron que las plaquetas neonatales en condiciones de reposo no presentaban, en comparación con las de adulto diferencias claras en su morfología. Sin embargo, tras estimular con un agonista tiene lugar una desgranulación notable en plaquetas de adulto, mientras que en las plaquetas neonatales se observa una retención de gránulos claramente visible sin evidencia de fusión granular. Tal

fenotipo es consistente con los defectos de secreción descritos en pacientes con FHL4 y FHL5, deficientes en Stx11<sup>222</sup> y Munc18b<sup>224</sup>, respectivamente, los cuales presentan una ultraestructura y un contenido granular semejante al de plaquetas normales en condiciones de quiescencia pero no muestran fusión de gránulos tras estimulación.

Dado que las proteínas SNARE parecen estar implicadas en la biogénesis de los exosomas de plasma<sup>230,231</sup>, los cuales tienen un origen mayoritariamente plaquetario<sup>60</sup>, y dado que encontramos diferencias significativas en la expresión de algunas proteínas clave del complejo SNARE entre las plaquetas de neonato y de adulto, nuestro siguiente paso fue evaluar potenciales diferencias en los exosomas de plasma entre estas dos poblaciones.

Nuestros hallazgos mostraron que el contenido proteico de los exosomas de adulto es casi 3 veces superior al de los exosomas neonatales. En consonancia, los exosomas de neonato, evaluados por MET, eran más pequeños que los procedentes de plasma de adulto. La relevancia funcional de estos hallazgos está aún por definir. Los exosomas ejercen distintas funciones, las cuales son intrínsecamente dependientes de su origen. Concretamente los exosomas de origen plaquetario tendrían un potencial papel en agregación plaquetaria<sup>237</sup> y en estimular la respuesta inmune<sup>59</sup>. Michelson y col. demostraron que la actividad procoagulante de las micropartículas derivadas de plaquetas procedentes de neonatos pretérmino es menor que la de adultos y neonatos a término<sup>238,239</sup>, postulando que ello podría contribuir a la mayor propensión de los pretérmino a sufrir HIV. Más allá de su efecto hemostático, las plaquetas tienen un papel en inflamación y respuesta inmune. Los neonatos trombocitopénicos son transfundidos frecuentemente con plaquetas (resuspendidas en plasma) procedentes de donantes adultos. El efecto no hemostático que estas transfusiones de plaquetas pueda tener en neonatos con patología específica y diferente a la de adultos o niños más mayores (enterocolitis necrotizante, retinopatía de la prematuridad, etc.) está aún por dilucidar<sup>154</sup>. Sin embargo, el estudio y caracterización de exosomas de plasma a lo largo del desarrollo, de los

mecanismos que rigen su biogénesis y de las posibles diferencias de comportamiento que muestren con respecto a los exosomas de adulto puede ser relevante en medicina a la hora de desarrollar tratamientos adecuados para el manejo de neonatos en distintos contextos clínicos y necesita ser considerado en futuros estudios.

Para abordar la cuestión de cómo la secreción alterada de las plaquetas neonatales puede influenciar su capacidad de *spreading* se comparó, en condiciones estáticas, la cinética de adherencia de las suspensiones de plaquetas lavadas de cordón umbilical y adultos. Se encontró que, en comparación con las plaquetas de adultos, las plaquetas neonatales mostraban un retraso significativo en la adhesión y *spreading* que no se podían explicar por las diferencias en el volumen medio plaquetario, el cual es similar en plaquetas de neonatos y adultos<sup>83</sup>. Nuestros resultados están en consonancia con observaciones previas que indican que las plaquetas neonatales, independientemente del medio de la sangre en el que se resuspendan (sangre trombocitopénica de neonato vs. adulto), muestran tiempos de oclusión en PFA-100 más largos que las plaquetas de adulto<sup>164</sup>, lo que apoya el concepto de una capacidad adhesiva intrínsecamente defectuosa de las plaquetas de neonato.

Al contrario de los datos presentados aquí, estudios antiguos<sup>145</sup> y también estudios muy recientes<sup>240</sup> que evaluaban las propiedades plaquetarias de adhesión han demostrado una adherencia similar<sup>240</sup>, o incluso mayor<sup>145</sup> en plaquetas de neonatos a término en comparación con las plaquetas de adultos. No obstante, hay que señalar que estos estudios se realizaron en sangre total, y que el plasma neonatal presenta mayores niveles de FvW con actividad adhesiva incrementada<sup>27,28</sup>. En nuestro conocimiento, el único estudio previo que ha evaluado la adhesión de plaquetas neonatales lavadas (a cubres recubiertos con colágeno bajo condiciones estáticas) no mostró diferencias en la adhesividad en comparación con las de adulto<sup>120</sup>. La diferente metodología utilizada en ambos ensayos de adhesión, en particular el uso de PLL en lugar de colágeno, podría explicar esta discrepancia<sup>120</sup>.

Además de una maquinaria defectuosa de exocitosis (niveles reducidos de Stx11 y Munc18b), el deterioro en las propiedades de adhesión y *spreading* de las plaquetas neonatales, también puede ser favorecido por las diferencias en la expresión de tubulina- $\beta$ 1 a lo largo del desarrollo<sup>234</sup>. La tubulina- $\beta$ 1, la forma mayoritaria de tubulina en los microtúbulos de plaquetas y megacariocitos, junto con la actina del citoesqueleto, son responsables de la formación de plaquetas, el cambio de forma, el *spreading*, y el tráfico de gránulos intracelular<sup>233</sup>. Los menores niveles encontrados de tubulina- $\beta$ 1 en plaquetas neonatales podrían reflejar los menores niveles de ploidía de los megacariocitos de neonato respecto a los de adulto, dada la sobreexpresión de *TUBB1* durante la poliploidización de megacariocitos<sup>241</sup>

Es importante resaltar que los niveles de tubulina- $\beta$ 1 que se encuentran en las plaquetas neonatales se parecen a los observados en las plaquetas de los portadores<sup>178</sup> homocigotos PP del polimorfismo *TUBB1* Q43P. Los neonatos, como los portadores de polimorfismo *TUBB1* Q43P, muestran niveles disminuidos de tubulina- $\beta$ 1 y problemas de adhesión a colágeno, de secreción de adenosina trifosfato (ATP), e hiporrespuesta a bajas concentraciones de agonistas<sup>233</sup>, fenotipo que es similar al de plaquetas neonatales. Al igual que ocurre con las plaquetas neonatales, tanto las plaquetas de los portadores homocigotos PP como las de los ratones knockout heterocigotos para tubulina- $\beta$ 1, muestran una morfología discoide normal (Figura 6A) a pesar de presentar una reducción del 50% en los niveles de tubulina- $\beta$ 1<sup>234</sup>. En general, nuestros datos apoyan los resultados de estudios anteriores<sup>233,234</sup> que indican que la mitad de la cantidad normal de tubulina- $\beta$ 1 puede ser suficiente para permitir la característica forma discoide de las plaquetas<sup>242</sup>.

Sin embargo, aunque la mayoría de las plaquetas de sujetos PP y QP sólo presentan alteraciones morfológicas leves, un número limitado de éstas presentaban una banda marginal difusa en los estudios de inmunofluorescencia<sup>178</sup>. La ausencia de anormalidades en nuestras muestras neonatales podría deberse a la sobreexpresión de otras dos isoformas de la tubulina,

*TUBB2A* y *TUBB*, que compensarían parcialmente la infraexpresión de la tubulina- $\beta$ 1. A pesar de esta compensación fisiológica, estas isoformas alternativas se ensamblan mucho menos eficientemente en los microtúbulos de las plaquetas<sup>234</sup>, lo que explicaría por qué tras la estimulación, las plaquetas neonatales mostraron, con respecto a las de adulto, sólo cambios ultraestructurales leves en su forma y diámetro máximo. Estos resultados concuerdan con los que demuestran una sobreexpresión de otras isoformas de tubulina- $\beta$  ( $\beta$ 2 y  $\beta$ 5) en ratones que carecen de tubulina- $\beta$ 1<sup>234</sup>. Estas otras isoformas son incapaces de compensar completamente la ausencia de tubulina- $\beta$ 1, y como consecuencia de ello, estos ratones producen un menor número de plaquetas que los *wild type*<sup>234</sup>. Resulta llamativo que los megacariocitos neonatales también formen menos proplaquetas y plaquetas (por célula) que los megacariocitos adultos<sup>90,243</sup> a pesar de los niveles similares de madurez del citoplasma<sup>91</sup>. El hallazgo de una infraexpresión de tubulina en plaquetas neonatales proporciona una explicación a esta diferencia del desarrollo. De hecho, de acuerdo con los datos de un array de expresión génica proporcionados por la Dra Sola-Visner (Division of Newborn Medicine, Children's Hospital, Boston) (comunicación personal), también existe infraexpresión de *TUBB1* y sobreexpresión de *TUBB2A* en megacariocitos derivados de células CD34+ procedentes de cordón umbilical con respecto a megacariocitos derivados de sangre periférica de adultos (datos no mostrados). Si la infraexpresión de tubulina- $\beta$ 1 contribuye a un mayor riesgo de hemorragia intracerebral, tal y como se propone a partir de los datos de estudios en varones portadores del polimorfismo Q43P<sup>244</sup>, o si es uno de los factores que predisponen a la trombocitopenia en recién nacidos enfermos, son cuestiones que necesitan mayor investigación.

En resumen, hemos demostrado una expresión reducida de *Stx11*, *Munc18b*, y tubulina- $\beta$ 1 en las plaquetas neonatales, hallazgos que apoyan la idea de que estas proteínas están reguladas a lo largo del desarrollo y que justifican en parte las diferencias encontradas en adhesión y *spreading* plaquetario y en tamaño y contenido proteico de exosomas derivados

de plaquetas. Nuestras observaciones proporcionan nuevos hallazgos sobre las diferencias en secreción, adhesión, y reactividad durante el desarrollo.

***Capítulo IV: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS  
IMPLICADAS EN TRANSDUCCIÓN DE  
SEÑAL PLAQUETARIA EN NEONATOS Y  
ADULTOS: PROTEÍNAS G***



## 1. Introducción

Todos los agonistas plaquetarios, salvo colágeno, inducen activación uniéndose a receptores específicos acoplados a proteínas G (GPCR). La duración de la señalización por GPCR está sujeta a la internalización del receptor, a la desensibilización del mismo y también a la inactivación de proteínas G acelerada por proteínas de la familia de los reguladores de la señalización de proteínas G (RGS).

Las proteínas G están compuestas por una subunidad  $\alpha$ , que es la subunidad que determina las propiedades del heterotrímero, una  $\beta$  y una  $\gamma$ . Estos complejos heterotriméricos son capaces de funcionar como interruptores moleculares que usan GDP para controlar su ciclo de señalización. Así, la formación de un complejo entre el agonista y su correspondiente receptor asociado a proteína G promueve en este un cambio conformacional que se transmite a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G permitiendo que ésta intercambie el GDP, que lleva unido en estado basal, por GTP (Figura 1). Se produce entonces la disociación del heterotrímero en un monómero (GTP- $\alpha$ ) y un dímero ( $G\beta\gamma$ ) los cuales son capaces de iniciar una respuesta en la célula a través de la modulación de la función de efectores (enzimas, canales, etc.). La hidrólisis espontánea de GTP a GDP, que conduciría al re-ensamblaje del complejo  $G\alpha\beta\gamma$  y de vuelta al estado basal, puede ser estimulada por proteínas RGS<sup>245</sup>.

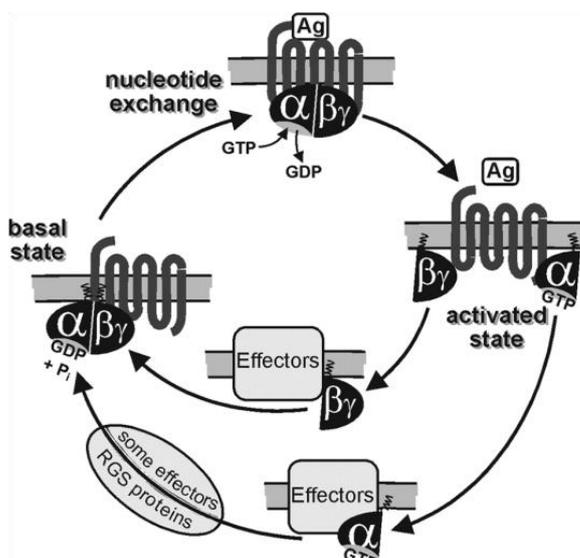


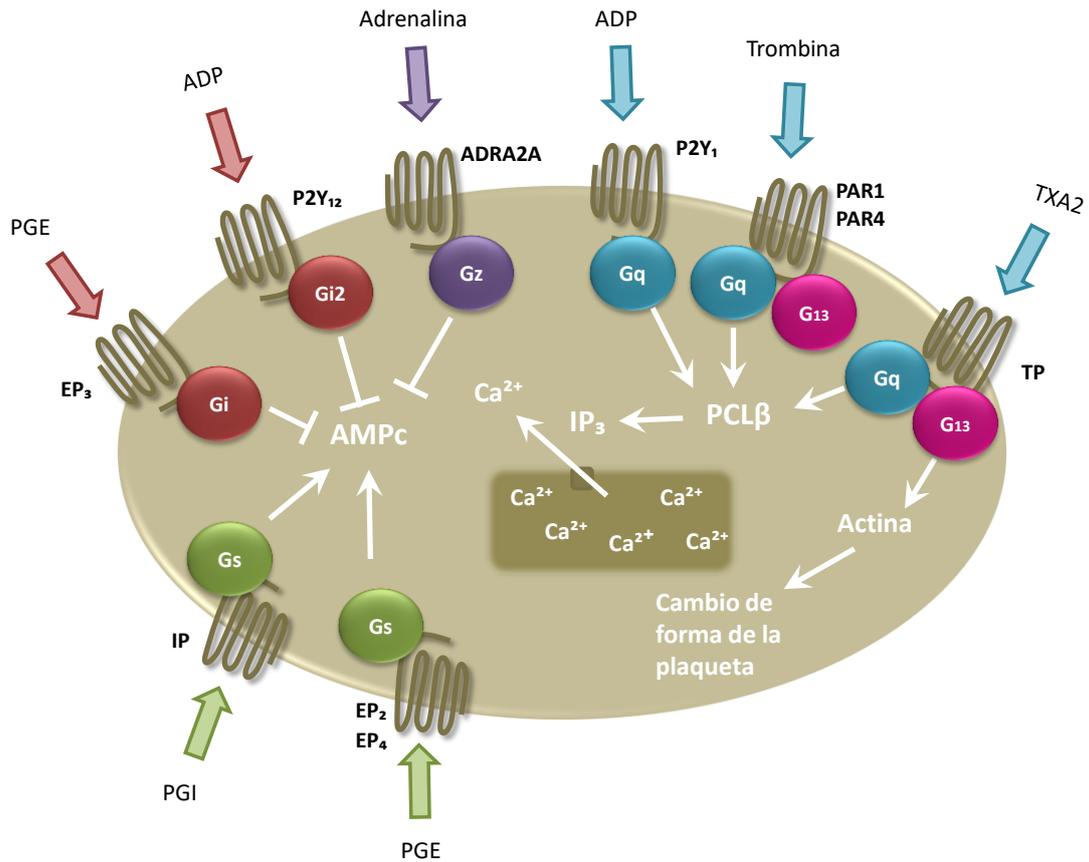
Figura 1| Ciclo funcional de las proteínas G. Reproducido de Wettschureck Physiol Rev. 2005<sup>245</sup> con permiso.

En plaquetas, las proteínas  $G\alpha_{13}$  son intermediarias de la transducción de señal para los receptores de tromboxano A2 (TxA<sub>2</sub>) y trombina,  $G\alpha_q$  para los receptores de TxA<sub>2</sub>, trombina y ADP (P2Y<sub>1</sub>);  $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_z$  para los de ADP (P2Y<sub>12</sub>) y epinefrina, respectivamente; y  $G\alpha_s$  para los receptores de PGI<sub>2</sub> (Figura 2). La importancia de la función de las proteínas G se pone de manifiesto cuando se examinan modelos murinos en los que se ha suprimido alguno de los genes de proteínas G. Así, la ablación de *GNAI2* y *GNAZ* ( $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_z$ ) genera agregación reducida en respuesta a ADP y epinefrina, respectivamente<sup>75,246-248</sup>, y el ratón  $G\alpha_q^{-/-}$  muestra tendencia a la hemorragia y ausencia de agregación<sup>249</sup>.

Respecto a sus reguladores, las plaquetas humanas expresan mayoritariamente RGS10 y 18<sup>250</sup>, siendo RGS10 ampliamente expresada en varios tipos celulares<sup>251-253</sup> mientras que RGS18 se expresa principalmente en línea hematopoyética<sup>254-257</sup>. La reactividad plaquetaria se incrementa en ratones que carecen de RGS18<sup>258</sup> así como en ratones que expresan una variante de  $G\alpha_{i2}$  incapaz de unirse a las proteínas RGS<sup>259</sup>, lo que evidencia la relevancia biológica de estos reguladores de la actividad plaquetaria.

Como ya se ha comentado, desde hace décadas se sabe que las plaquetas neonatales son hiporreactivas a la mayoría de agonistas plaquetarios (ADP, trombina, TxA<sub>2</sub>, epinefrina, colágeno, etc.), sin embargo los mecanismos moleculares implicados no se conocen del todo. El estudio de los receptores de membrana de los agonistas plaquetarios ha mostrado, en plaquetas neonatales, menores niveles de expresión sólo para los receptores de epinefrina (receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$ <sup>101</sup> y de trombina (PAR 1 y PAR 4)<sup>121</sup> quedando por aclarar los mecanismos que subyacen a la hiporreactividad plaquetaria neonatal de otros agonistas fisiológicos.

Nuestra hipótesis es que la hiporreactividad de las plaquetas neonatales podría estar mediada, al menos parcialmente, con diferencias en la expresión y/o funcionalidad de proteínas G que transducen la señal de los dichos agonistas.



**Figura 2] Rutas de transducción de señal durante la activación plaquetaria con diversos agonistas asociados a GPCR.** En términos generales, la activación plaquetaria que inicia el agonista comienza con la activación de la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) de la membrana plasmática produciendo el segundo mensajero inositol-1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) necesario para aumentar la concentración citosólica de Ca<sup>2+</sup>, lo que conduce a la activación de integrinas plaquetarias. La identidad de la isoforma de la PLC que se activa es algo que depende del agonista, así trombina, ADP (P2Y<sub>1</sub>) y TxA<sub>2</sub> activan a la PLCβ empleando a la proteína G<sub>q</sub> como molécula intermediaria transductora de señal. Por su parte, la activación de los receptores adrenérgicos y de ADP (P2Y<sub>12</sub>) inhibiría la síntesis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) por parte de la adenilato ciclasa, lo que también conduciría a activación plaquetaria. La prostaciclina (PGI), a través de sus receptores IP, estimula la síntesis de AMPc por la adenilato ciclasa, lo que mantendría a la plaqueta en estado quiescente<sup>260</sup>. Finalmente, la prostaglandina E, dependiendo de la concentración a la que actúe y el receptor con el que interaccione (EP<sub>2</sub>, 3 o 4), puede tener un efecto activador o inhibitor sobre la plaqueta<sup>261</sup>.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Cuantificación de niveles de proteínas G mediante qRT-PCR y western blot

La recolección de sangre de cordón umbilical de neonatos y sangre periférica de adultos, así como su procesamiento posterior hasta la obtención de plaquetas ultrapuras se describió en detalle en los *Capítulos I (apartado 2.3) y III (apartado 2.4.)*.

La expresión génica de las proteínas G y el correspondiente regulador de su actividad (*RGS18*) fue cuantificada por qRT-PCR mediante sondas Taqman (*GNAS* Hs00255603\_m1, *GNAQ* Hs00387073\_m1, *GNAI2* Hs01064686\_m1, *GNAZ* Hs00157731\_m1, *GNA13* Hs01116111\_m1 y *RGS18* Hs00329468; Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y normalizada respecto a *ACTB* empleando el método de  $2^{-(\Delta Ct)}$  como ya se ha descrito previamente<sup>262</sup>. Los datos se expresaron como media  $\pm$  DE de un mínimo de 10 muestras/grupo, normalizadas respecto al grupo de los adultos, tomado como el 100%.

La expresión proteica fue determinada por western blot de los lisados proteicos de plaquetas ultrapuras mediante electroforesis, transferencia e incubación empleando la siguiente batería de anticuerpos: anti-G $\alpha_s$  (sc-823, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), anti-G $\alpha_q$  (371730, Calbiochem® EMD Millipore, San Diego, CA), anti-G $\alpha_{i2}$  (sc7276, Santa Cruz Biotechnologies), anti-G $\alpha_z$  (sc388, Santa Cruz Biotechnologies), anti-RGS18 (LS-C785, LifeSpan BioSciences, Washington, WA) GAPDH (ab128915; Abcam, Madrid, España). El análisis densitométrico se realizó empleando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los datos se expresaron como media  $\pm$  DE de un mínimo de 12 muestras/grupo, normalizadas respecto a GAPDH (como control interno).

## **2.2. Ensayos de activación de $G\alpha_s$**

Se recolectaron muestras de sangre de cordón umbilical y sangre periférica de adultos (N=5/grupo) en las condiciones y con la metodología descritas previamente. La sangre se centrifugó a 140xg durante 10 min se recogieron los 2/3 superiores del PRP que se centrifugaron de nuevo, esta vez a 100xg durante 5 min, para eliminar la posible contaminación leucocitaria y se extrajo el sobrenadante, cuya concentración se ajustó a 230.000 plaquetas/ $\mu$ L con PPP de las propias muestras. A continuación se añadió ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) hasta una concentración final de 5mM y se prepararon 2 alícuotas de igual volumen, a una de las cuales se le adicionó PBS (estado basal de  $G\alpha_s$ ) y a la otra prostaglandina E1 a una concentración final de 100nM ( $PGE_1$ , 5515, Sigma-Aldrich, Madrid, España) (estado activado de  $G\alpha_s$ ). Ambas se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron a 1000xg 5 min y se rescató el pellet plaquetario, que se lisó con un buffer casero conteniendo 50mM de Tris-HCl a pH 7.4, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100 y 1% de coctel inhibidor de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich). Finalmente, los lisados se centrifugaron a 12.000xg, 10 min a 4°C se recuperó el sobrenadante del que se tomó una alícuota para medir la concentración proteica mediante el método del BCA de Pierce (Sigma-Aldrich) y el resto se congeló a -80°C hasta su uso. Una vez determinadas las concentraciones de proteína de los lisados plaquetarios basales y activados para todas las muestras de adulto y neonato, se ajustaron sus volúmenes para tener en todos ellos una cantidad de proteína total de 1,5mg. Los niveles de proteína  $G\alpha_s$  activa unida a GTP se determinaron mediante inmunoprecipitación y western blot empleando, según instrucciones del fabricante, el kit " *$G\alpha_s$  Activation Assay*" (80801, NewEast Biosciences, PE). Las muestras fueron incubadas a 4°C, con agitación suave y durante 1h con un anticuerpo monoclonal anti-proteína  $G\alpha_s$  activada y bolitas de agarosa recubiertas de proteína A-G. Mediante centrifugación a 12.000xg durante 10s se precipitaron las bolitas de agarosa unidas al anticuerpo anti- $G\alpha_s$  activada, que a su vez llevaba unida proteína  $G\alpha_s$  activa, se desechó el

sobrenadante y se lavó con un buffer suministrado por el kit para eliminar proteínas inespecíficas. El pellet de proteína resultante se resuspendió en 20µL de buffer SDS-Laemmli 2X conteniendo ditioneitol (DTT) en una proporción 1:20 y se hirvió a 100°C durante 5 min para separar las proteínas de las bolitas de agarosa y desnaturalizarlas. A continuación se centrifugó a 12.000xg durante 10s y las proteínas del sobrenadante resultante se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 10%, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con el anticuerpo anti-Gα<sub>s</sub> suministrado por el kit. La señal correspondiente a la proteína Gα<sub>s</sub> activa fue detectada por quimioluminiscencia en un equipo ImageQuant LAS4000mini (Exon Biotec, GE Healthcare®). El análisis densitométrico se realizó empleando el software ImageJ. Los datos se expresaron como cambios respecto al valor basal (inactivado). Las barras representan la media ± DE de un mínimo de 5 muestras/grupo.

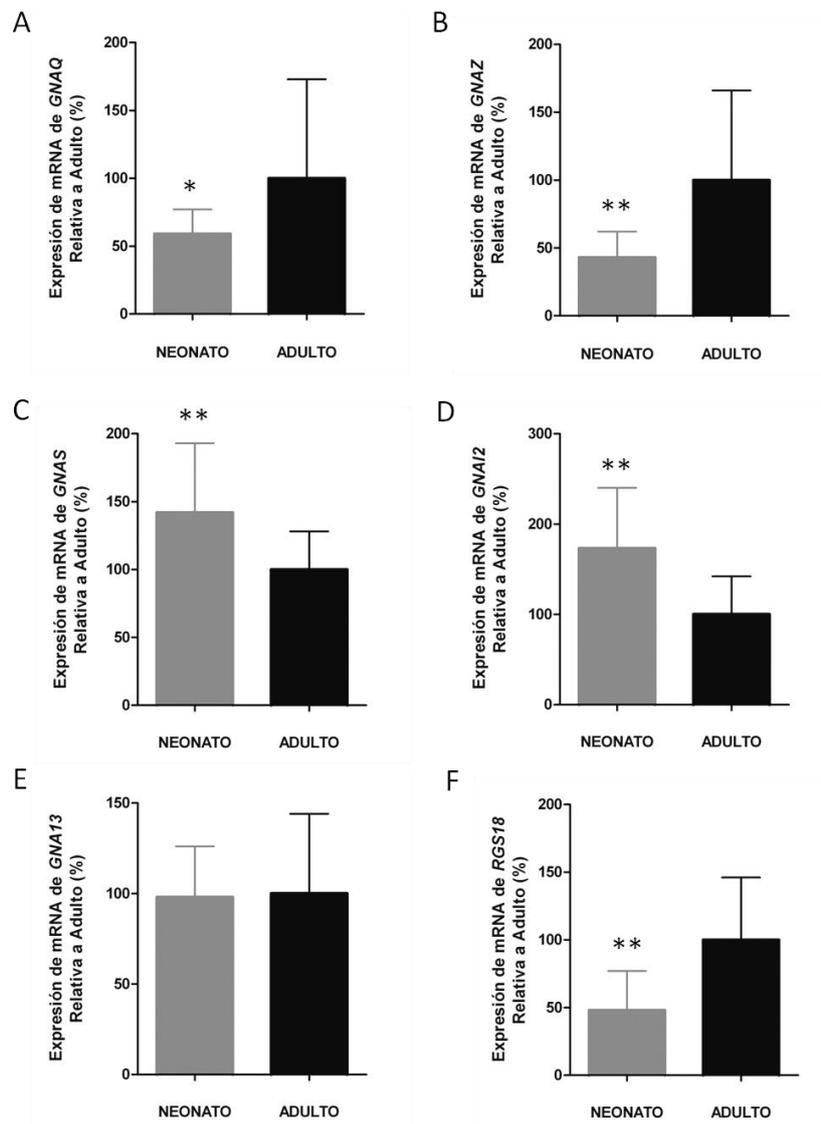
### **2.3. Análisis estadístico**

Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio del programa SPSS Statistics (IBM, versión 21.0. Armonk, NY) utilizando la prueba de Mann-Whitney o la prueba de la t de Student de dos colas, según el caso. Los valores de p<0,05 se consideraron significativos.

## **3. Resultados**

### **3.1. Las plaquetas de neonato y adulto presentan diferencias en los niveles de proteínas G**

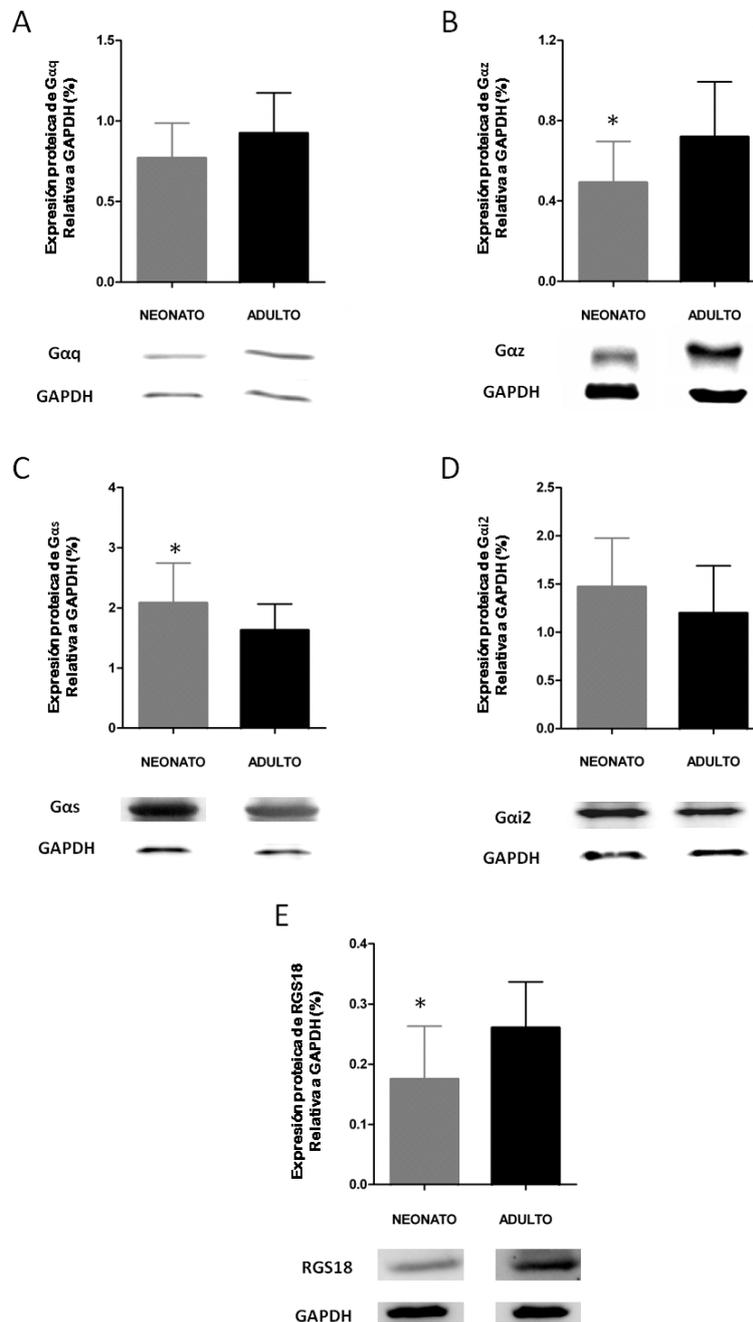
Respecto a las plaquetas de adulto, las plaquetas neonatales mostraron niveles inferiores de *GNAQ* (40%, p<0,05) (Figura 3A) y *GNAZ*, (60%, p<0,01) (Figura 3B), superiores para *GNAS* (40%, p<0,01) y *GNAI2* (70%, p<0,01) (Figuras 3C y D) y ninguna diferencia en el caso de *GNA13* (Figura 3E).



**Figura 3 | Expresión génica de proteínas G en plaquetas de neonato y adulto.** Cuantificación realizada mediante qRT-PCR. **(A)** Expresión de mRNA de *GNAQ*. N=15 muestras/grupo. **(B)** *GNAZ*, N=16 muestras/grupo. **(C)** *GNAS*, N=15 muestras/grupo. **(D)** *GNAI2*, N=15 muestras/grupo. **(E)** *GNA13*, N=16 muestras/grupo. **(F)** *RGS18*, N=10 muestras/grupo. Para cada mRNA, normalizado respecto a *ACTB*, se representa Media  $\pm$  DE como un porcentaje respecto del grupo de adultos control, tomado como el 100%. (\*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ ).

Los niveles de expresión de mRNA encontrados significativamente diferentes entre plaquetas neonatales y de adulto, fueron posteriormente validados mediante estudios de inmunotransferencia. En concordancia con los resultados de expresión génica, las plaquetas neonatales expresaron menos  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_z$  (20 y 30%, respectivamente) (Figuras 4A y B) y más

$G\alpha_s$  y  $G\alpha_{i2}$  (30 y 25%, respectivamente) (Figuras 4C y D) que las del adulto, siendo las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para  $G\alpha_2$  y  $G\alpha_s$ .

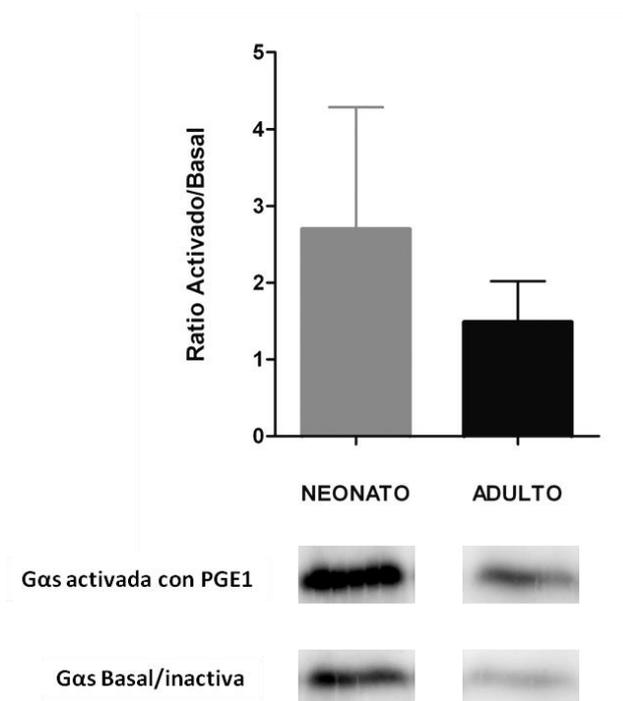


**Figura 4 | Expresión proteica de proteínas G en plaquetas de neonato y adulto.** Cuantificación realizada mediante western-blot. El análisis densitométrico se realizó mediante el software ImageJ. Se muestra una imagen representativa para cada caso. **(A)** Expresión de niveles proteicos de  $G\alpha_q$ , N=14 muestras/grupo. **(B)**  $G\alpha_z$ , N=11 muestras/grupo. **(C)**  $G\alpha_s$ , N=14 muestras/grupo. **(D)**  $G\alpha_{i2}$ , N=12 muestras/grupo. **(E)** RGS18, N=12 muestras/grupo. Se representa Media  $\pm$  DE de cada grupo para cada proteína normalizada respecto a GAPDH (\* $p < 0,05$ ).

Respecto a RGS18, regulador de la actividad de  $G\alpha_q$ , las plaquetas de neonato exhibían un 52% menos mRNA de *RGS18* y un 33% menos proteína, siendo la diferencia significativa en ambos casos ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) (Figuras 3F y 4E respectivamente).

### 3.2. Las plaquetas de neonato parecen mostrar un mayor grado de activación de $G\alpha_s$

En línea con los mayores niveles de expresión de  $G\alpha_s$  encontrados en plaquetas neonatales, los experimentos de activación de  $G\alpha_s$  demostraron que las plaquetas de neonato mostraban una tendencia hacia una mayor capacidad para activar  $G\alpha_s$  que las plaquetas de adulto. Así, respecto a las plaquetas de adulto encontramos que las plaquetas de neonato presentaron alrededor de un 45% más de forma activada de esta proteína (Adulto:  $1,49 \pm 0,6$ ; Neonato:  $2,7 \pm 1,5$ ) siendo la diferencia no significativa (Figura 5).



**Figura 5] Expresión de niveles de proteína  $G\alpha_s$  activada en plaquetas de neonato y adulto.** Cuantificación realizada mediante western blot y análisis densitométrico mediante el software ImageJ. Se representa media  $\pm$  DE (N=5 muestras/grupo) de la expresión de proteína  $G\alpha_s$  activada tras estimular con  $PGE_1$  respecto a la obtenida al incubar con PBS en neonatos y adultos.

## 4. Discusión

En un intento de profundizar en el estudio de los mecanismos responsables de la hiporreactividad plaquetaria neonatal, en este capítulo nos centramos en evaluar la activación plaquetaria mediada por receptores acoplados a proteínas G.

En nuestro conocimiento, sólo un estudio ha evaluado los niveles de proteínas G, concretamente de  $G\alpha_q$ , en plaquetas encontrando una infraexpresión no significativa de esta proteína en plaquetas de neonato a término. Los autores de este estudio atribuyen la respuesta defectuosa a  $TxA_2$  en plaquetas de neonato principalmente a una actividad GTPasa disminuida de  $G\alpha_q$ <sup>128</sup>, lo que genera una deficiencia a lo largo de toda la vía. Nuestros datos de qRT-PCR y western blot apoyan estos hallazgos ya que demuestran una menor expresión de  $G\alpha_q$  en plaquetas de neonato, significativa sólo en el caso de la expresión génica, diferencia que quizá esté originada por el hecho de que la qRT-PCR es una técnica más sensible que el western blot. Esta infraexpresión podría contribuir a la respuesta deficiente que los neonatos muestran a  $TxA_2$ , ADP o trombina.

En relación a la hiporrespuesta de las plaquetas neonatales a epinefrina, hasta la fecha, ésta se había justificado por los menores niveles de expresión de su receptor ( $ADRA2A$ )<sup>101</sup>. Nuestros hallazgos de menores niveles de expresión de  $G\alpha_z$  establecen, por primera vez, un nuevo mecanismo regulador que contribuye a explicar la pobre respuesta de las plaquetas neonatales a epinefrina, la cual es sustancialmente menor que la de otros agonistas plaquetarios.

Respecto a RGS18, proteína reguladora de la señalización vía proteínas G, la encontramos significativamente infraexpresada en plaquetas de neonato con respecto a adulto, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico. RGS18 es un regulador de las funciones de  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{i2}$  capaz de desconectar su señalización por medio del estímulo de su actividad

GTPasa, lo que acelera la hidrólisis de GTP y la vuelta de la proteína G al estado basal no activado<sup>263</sup>. En lo referente a  $G\alpha_q$  la infraexpresión de RGS18 en plaquetas neonatales podría ser un mecanismo regulador que compensa, aunque no completamente, la desregulación de la vía del  $TxA_2$  consecuencia de la menor actividad GTPasa de  $G\alpha_q$ <sup>128</sup>.

Por otro lado, la infraexpresión de RGS18 en plaquetas neonatales, junto con los mayores niveles de expresión de *GNAI2* encontrados en el grupo de edad neonatal probablemente contribuyan a una mayor activación de la vía controlada por  $G\alpha_{i2}$ , hecho apoyado por ensayos en ratones que muestran que aquellos que carecen de RGS18 o que son portadores de una variante de  $G\alpha_{i2}$ , en la que la sustitución G184S bloquea la unión RGS/ $G\alpha_{i2}$ , presentan una mayor actividad plaquetaria<sup>258,259</sup>. La señalización a través de  $G\alpha_{i2}$  inhibe la síntesis de AMPc que es un potente inhibidor de la actividad plaquetaria<sup>264</sup>. En contraste,  $G\alpha_s$  que también estaba más expresada en plaquetas de neonato y que además, como indicaban los ensayos de funcionalidad, también parecía mostrar en neonatos una mayor capacidad para activarse, estimula la síntesis de AMPc<sup>265,266</sup>. Como inciso señalar que a pesar de mostrar una tendencia a una mayor capacidad de activación las diferencias con respecto a las muestras de adulto no llegaban a alcanzar la significación estadística, lo que probablemente se deba al bajo número de muestras empleadas. El aumento simultáneo encontrado en los niveles de ambas proteínas,  $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_s$ , podría constituir un mecanismo mutuamente compensatorio que evitase tanto una inhibición como una activación plaquetaria exacerbadas.

En resumen, la señalización vía proteínas G y GPCR está estrictamente regulada por medio de varios procesos como son la internalización y desensibilización de receptores y la desconexión por medio de proteínas reguladoras. La existencia de múltiples mecanismos, algunos redundantes y otros compensatorios, implica que la activación plaquetaria puede ser estrechamente controlada incluso desde las etapas más tempranas. Nuestros resultados muestran, por primera vez, que las plaquetas neonatales presentan, respecto a las de adulto,

diferencias en la expresión de proteínas G y de uno de los reguladores de su función (RGS18). Estas variaciones podrían contribuir a explicar las diferencias en la reactividad plaquetaria entre neonatos y adultos.

# ***CONCLUSIONES***

---



En conjunto, los resultados obtenidos en los diferentes capítulos de esta Tesis avalan, en general, la hipótesis planteada al inicio de la misma: que la hiporreactividad de las plaquetas neonatales respecto a las de adulto se fundamenta en diferencias en la expresión de proteínas esenciales en la fisiología plaquetaria.

De forma más concreta, las conclusiones específicas derivadas de cada capítulo son las siguientes:

*Capítulo I:* Los resultados obtenidos en nuestro array de expresión plaquetario de neonatos vs. adultos muestran diferencias de expresión de ciertos genes estrechamente vinculados con la reactividad plaquetaria, lo que podría justificar al menos en parte las diferencias en funcionalidad observadas entre estos dos grupos de edad. También se aprecian grandes diferencias en rutas de expresión involucradas principalmente en la maduración de pre-mRNA y síntesis y degradación de proteínas, lo que podría indicar un metabolismo proteico exacerbado en las plaquetas neonatales. . Más allá de las diferencias a lo largo del desarrollo, el estudio ontogénico del transcriptoma plaquetario, orienta hacia un papel revelante de las plaquetas no sólo en hemostasia, sino también, en inmunidad e inflamación.

*Capítulo II:* A pesar de que los datos derivados de nuestro array de miRNA mostraban diferencias sustanciales de expresión en varios de ellos entre plaquetas de neonatos y adultos no fuimos capaces de demostrar una regulación de los genes estudiados por parte de ninguno de los miRNA evaluados posiblemente debido en parte a falsos positivos de los algoritmos empleados y/o a la variabilidad de las técnicas experimentales empleadas.

*Capítulo III:* Nuestros resultados muestran, por primera vez, que las plaquetas neonatales presentan infraexpresión del complejo Stx11-Munc18b (componente crítico de la maquinaria SNARE) y de la tubulina- $\beta$ 1. Estas deficiencias podrían justificar los defectos encontrados en la

fusión granular, secreción, adhesión y *spreading* plaquetario en neonatos, así como, posiblemente, el menor contenido proteico y tamaño de los exosomas plasmáticos neonatales.

*Capítulo IV:* Las plaquetas neonatales, en comparación con las de adulto, presentan diferencias en la expresión de proteínas G, especialmente  $G\alpha_z$  y  $G\alpha_s$ , y posiblemente también de su funcionalidad, las cuales se acompañan de cambios en la expresión de uno de sus reguladores (RGS18), alteraciones que podrían contribuir a explicar las variaciones en la reactividad plaquetaria a lo largo del desarrollo.

# ***REFERENCIAS***

---



1. Kuhle S, Male C, Mitchell L. Developmental hemostasis: pro- and anticoagulant systems during childhood. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29(4):329-338.
2. Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol.* 2006;133(3):251-258.
3. Mazzarello P, Calligaro AL, Calligaro A. Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(10):776-781.
4. Wright JH. The origin and nature of the blood plates. *The Boston Medical and Surgical Journal.* 1906;154(23):643-645.
5. Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(12):2319-2325.
6. Trier DA, Gank KD, Kupferwasser D, et al. Platelet antistaphylococcal responses occur through P2X1 and P2Y12 receptor-induced activation and kinocidin release. *Infect Immun.* 2008;76(12):5706-5713.
7. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Front Biosci.* 2008;13:3532-3548.
8. Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.* 2008;111(3):1227-1233.
9. Collier BS. Historical perspective and future directions in platelet research. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:374-395.
10. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):123-134.
11. Cohen JA, Leeksa CH. Determination of the life span of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphonate. *J Clin Invest.* 1956;35(9):964-969.
12. Peters AM, Lavender JP. Platelet kinetics with indium-111 platelets: comparison with chromium-51 platelets. *Semin Thromb Hemost.* 1983;9(2):100-114.
13. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res.* 1999;95(1):1-18.
14. Maynard DM, Heijnen HF, Gahl WA, Gunay-Aygun M. The alpha-granule proteome: novel proteins in normal and ghost granules in gray platelet syndrome. *J Thromb Haemost.* 2010;8(8):1786-1796.
15. Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med.* 1979;30:119-134.
16. White JG, Michelson A. Platelet structure. Platelets: Michelson, AD; 2012.
17. Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, Grove EL, Choudry FA. The causal role of megakaryocyte-platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol.* 2012;9(11):658-670.
18. Wei AH, Schoenwaelder SM, Andrews RK, Jackson SP. New insights into the haemostatic function of platelets. *Br J Haematol.* 2009;147(4):415-430.
19. Aslan JE, McCarty OJ. Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost.* 2013;11(1):35-46.
20. Haley KM, Recht M, McCarty OJ. Neonatal platelets: mediators of primary hemostasis in the developing hemostatic system. *Pediatr Res.* 2014;76(3):230-237.
21. Allen RD, Zacharski LR, Widirstky ST, Rosenstein R, Zaitlin LM, Burgess DR. Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. *J Cell Biol.* 1979;83(1):126-142.
22. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(6):446-454.
23. Hartwig J. The platelet cytoskeleton. Platelets: Michelson, AD; 2012.
24. Kahr WH. Granules and thrombus formation. *Blood.* 2009;114(5):932-933.

25. Ren Q, Ye S, Whiteheart SW. The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(5):537-541.
26. Golebiewska EM, Poole AW. Secrets of platelet exocytosis - what do we really know about platelet secretion mechanisms? *Br J Haematol*. 2013.
27. Warshaw AL, Laster L, Shulman NR. The stimulation by thrombin of glucose oxidation in human platelets. *J Clin Invest*. 1966;45(12):1923-1934.
28. Booyse F, Rafelson ME, Jr. In vitro incorporation of amino-acids into the contractile protein of human blood platelets. *Nature*. 1967;215(5098):283-284.
29. Booyse FM, Rafelson ME, Jr. Stable messenger RNA in the synthesis of contractile protein in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1967;145(1):188-190.
30. Booyse FM, Rafelson ME, Jr. Studies on human platelets. I. synthesis of platelet protein in a cell-free system. *Biochim Biophys Acta*. 1968;166(3):689-697.
31. Steiner M. Platelet protein synthesis studied in a cell-free system. *Experientia*. 1970;26(7):786-789.
32. Rosenwald IB, Pechet L, Han A, et al. Expression of translation initiation factors eIF-4E and eIF-2alpha and a potential physiologic role of continuous protein synthesis in human platelets. *Thromb Haemost*. 2001;85(1):142-151.
33. Thon JN, Devine DV. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets. *Transfusion*. 2007;47(12):2260-2270.
34. Weyrich AS, Dixon DA, Pabla R, et al. Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(10):5556-5561.
35. Pabla R, Weyrich AS, Dixon DA, et al. Integrin-dependent control of translation: engagement of integrin alphaIIb beta3 regulates synthesis of proteins in activated human platelets. *J Cell Biol*. 1999;144(1):175-184.
36. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med*. 2006;203(11):2433-2440.
37. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005;122(3):379-391.
38. Dittrich M, Birschmann I, Pfrang J, et al. Analysis of SAGE data in human platelets: features of the transcriptome in anucleate cell. *Thromb Haemost*. 2006;95(4):643-651.
39. Macaulay IC, Carr P, Gusnanto A, Ouwehand WH, Fitzgerald D, Watkins NA. Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3370-3377.
40. Cecchetti L, Tolley ND, Michetti N, Bury L, Weyrich AS, Gesele P. Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: a mechanism for regulating synthetic events. *Blood*. 2011;118(7):1903-1911.
41. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:351-379.
42. Hangauer MJ, Vaughn IW, McManus MT. Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genet*. 2013;9(6):e1003569.
43. Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*. 2014;157(1):77-94.
44. Bray PF, McKenzie SE, Edelstein LC, et al. The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. *BMC Genomics*. 2013;14:1.
45. Teruel-Montoya R, Kong X, Abraham S, et al. MicroRNA expression differences in human hematopoietic cell lineages enable regulated transgene expression. *PLoS One*. 2014;9(7):e102259.
46. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003;9(3):277-279.
47. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233.

48. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-4060.
49. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18(24):3016-3027.
50. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-3016.
51. Teruel-Montoya R, Rosendaal FR, Martinez C. MicroRNAs in hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2015;13(2):170-181.
52. Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*. 2002;12(17):1484-1495.
53. Maniatakis E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*. 2005;19(24):2979-2990.
54. Lee I, Ajay SS, Yook JI, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res*. 2009;19(7):1175-1183.
55. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-1581.
56. Qin W, Shi Y, Zhao B, et al. miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One*. 2010;5(2):e9429.
57. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-840.
58. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*. 2011;12(2):99-110.
59. Aatonen MT, Ohman T, Nyman TA, Laitinen S, Gronholm M, Siljander PR. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3.
60. Yellon DM, Davidson SM. Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection? *Circ Res*. 2014;114(2):325-332.
61. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(9):961-966.
62. Lu TP, Lee CY, Tsai MH, et al. miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. *PLoS One*. 2012;7(8):e42390.
63. Nagalla S, Shaw C, Kong X, et al. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood*. 2011;117(19):5189-5197.
64. Gatsiou A, Boeckel JN, Randriamboavonjy V, Stellos K. MicroRNAs in platelet biogenesis and function: implications in vascular homeostasis and inflammation. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(5):524-531.
65. Rex S, Freedman JE. Inhibition of platelet function by the endothelium. *Platelets*. 2007;2.
66. Kunert S, Meyer I, Fleischhauer S, et al. The microtubule modulator RanBP10 plays a critical role in regulation of platelet discoid shape and degranulation. *Blood*. 2009;114(27):5532-5540.
67. Kim D, Sung YM, Park J, et al. General rules for functional microRNA targeting. *Nat Genet*. 2016.
68. Hong W, Kondkar AA, Nagalla S, et al. Transfection of human platelets with short interfering RNA. *Clin Transl Sci*. 2011;4(3):180-182.
69. Kendzioriski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, Gould MN. On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(12):4252-4257.
70. Zhang C, Thornton MA, Kowalska MA, et al. Localization of distal regulatory domains in the megakaryocyte-specific platelet basic protein/platelet factor 4 gene locus. *Blood*. 2001;98(3):610-617.

71. Kowalska MA, Rauova L, Poncz M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res*. 2010;125(4):292-296.
72. Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost*. 2015;114(3):449-458.
73. Kapur R, Zufferey A, Boilard E, Semple JW. Nouvelle cuisine: platelets served with inflammation. *J Immunol*. 2015;194(12):5579-5587.
74. Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front Immunol*. 2015;6:98.
75. Yang J, Wu J, Kowalska MA, et al. Loss of signaling through the G protein, G<sub>z</sub>, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(18):9984-9989.
76. Jones CI, Bray S, Garner SF, et al. A functional genomics approach reveals novel quantitative trait loci associated with platelet signaling pathways. *Blood*. 2009;114(7):1405-1416.
77. Dahiya N, Sarachana T, Vu L, et al. Platelet MicroRNAs: An Overview. *Transfus Med Rev*. 2015;29(4):215-219.
78. Pahal GS, Jauniaux E, Kinnon C, Thrasher AJ, Rodeck CH. Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(4):1029-1034.
79. Forestier F, Daffos F, Galacteros F, Bardakjian J, Rainaut M, Beuzard Y. Hematological values of 163 normal fetuses between 18 and 30 weeks of gestation. *Pediatr Res*. 1986;20(4):342-346.
80. Van den Hof MC, Nicolaidis KH. Platelet count in normal, small, and anemic fetuses. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;162(3):735-739.
81. Forestier F, Daffos F, Catherine N, Renard M, Andreux JP. Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood*. 1991;77(11):2360-2363.
82. Hohlfeld P, Forestier F, Kaplan C, Tissot JD, Daffos F. Fetal thrombocytopenia: a retrospective survey of 5,194 fetal blood samplings. *Blood*. 1994;84(6):1851-1856.
83. Wiedmeier SE, Henry E, Sola-Visner MC, Christensen RD. Platelet reference ranges for neonates, defined using data from over 47,000 patients in a multihospital healthcare system. *J Perinatol*. 2009;29(2):130-136.
84. Jeremiah Z, Oburu J, Ruggeri M. Pattern and prevalence of neonatal thrombocytopenia in Port Harcourt Nigeria. *Pathology and laboratory medicine international*. 2010;2:27-31.
85. Sola-Visner M. Platelets in the neonatal period: developmental differences in platelet production, function, and hemostasis and the potential impact of therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:506-511.
86. Del Vecchio A, Motta M, Radicioni M, Christensen RD. A consistent approach to platelet transfusion in the NICU. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25(Suppl 5):93-96.
87. Israels S. Platelet Function in the Newborn. Platelets: Michelson, AD; 2012.
88. Liu ZJ, Sola-Visner M. Neonatal and adult megakaryopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(5):330-337.
89. Fader CM, Sanchez DG, Mestre MB, Colombo MI. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(12):1901-1916.
90. Bluteau O, Langlois T, Rivera-Munoz P, et al. Developmental changes in human megakaryopoiesis. *J Thromb Haemost*. 2013;11(9):1730-1741.
91. Liu ZJ, Italiano J, Jr., Ferrer-Marin F, et al. Developmental differences in megakaryocytogenesis are associated with up-regulated TPO signaling through mTOR and elevated GATA-1 levels in neonatal megakaryocytes. *Blood*. 2011;117(15):4106-4117.
92. Li Z, Godinho FJ, Klusmann JH, Garriga-Canut M, Yu C, Orkin SH. Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nat Genet*. 2005;37(6):613-619.

93. Klusmann JH, Godinho FJ, Heitmann K, et al. Developmental stage-specific interplay of GATA1 and IGF signaling in fetal megakaryopoiesis and leukemogenesis. *Genes Dev.* 2010;24(15):1659-1672.
94. Hu Z, Slayton WB, Rimsza LM, Bailey M, Sallmon H, Sola-Visner MC. Differences between newborn and adult mice in their response to immune thrombocytopenia. *Neonatology.* 2010;98(1):100-108.
95. Sola MC, Calhoun DA, Hutson AD, Christensen RD. Plasma thrombopoietin concentrations in thrombocytopenic and non-thrombocytopenic patients in a neonatal intensive care unit. *Br J Haematol.* 1999;104(1):90-92.
96. Hegyi E, Nakazawa M, Debili N, et al. Developmental changes in human megakaryocyte ploidy. *Exp Hematol.* 1991;19(2):87-94.
97. Murray NA, Roberts IA. Circulating megakaryocytes and their progenitors in early thrombocytopenia in preterm neonates. *Pediatr Res.* 1996;40(1):112-119.
98. Ghevaert C. Megakaryopoiesis through the ages: from the twinkle in the eye to the fully grown adult. *J Thromb Haemost.* 2013;11(9):1727-1729.
99. Israels SJ, Daniels M, McMillan EM. Deficient collagen-induced activation in the newborn platelet. *Pediatr Res.* 1990;27(4 Pt 1):337-343.
100. Ts'ao CH, Green D, Schultz K. Function and ultrastructure of platelets of neonates: enhanced ristocetin aggregation of neonatal platelets. *Br J Haematol.* 1976;32(2):225-233.
101. Corby DG, O'Barr TP. Decreased alpha-adrenergic receptors in newborn platelets: cause of abnormal response to epinephrine. *Dev Pharmacol Ther.* 1981;2(4):215-225.
102. Mull MM, Hathaway WE. Altered platelet function in newborns. *Pediatr Res.* 1970;4(3):229-237.
103. Corby DG, Zuck TF. Newborn platelet dysfunction: a storage pool and release defect. *Thromb Haemost.* 1976;36(1):200-207.
104. Corby DG, O'Barr TP. Neonatal platelet function: a membrane-related phenomenon? *Haemostasis.* 1981;10(4):177-185.
105. Israels SJ, Odaibo FS, Robertson C, McMillan EM, McNicol A. Deficient thromboxane synthesis and response in platelets from premature infants. *Pediatr Res.* 1997;41(2):218-223.
106. Harrison P, Lordkipanidzé M. Clinical Tests of Platelet Function. Platelets: Michelson, AD; 2012.
107. Sitaru AG, Holzhauer S, Speer CP, et al. Neonatal platelets from cord blood and peripheral blood. *Platelets.* 2005;16(3-4):203-210.
108. Rajasekhar D, Kestin AS, Bednarek FJ, Ellis PA, Barnard MR, Michelson AD. Neonatal platelets are less reactive than adult platelets to physiological agonists in whole blood. *Thromb Haemost.* 1994;72(6):957-963.
109. Grosshaupt B, Muntean W, Sedlmayr P. Hyporeactivity of neonatal platelets is not caused by preactivation during birth. *Eur J Pediatr.* 1997;156(12):944-948.
110. Rajasekhar D, Barnard MR, Bednarek FJ, Michelson AD. Platelet hyporeactivity in very low birth weight neonates. *Thromb Haemost.* 1997;77(5):1002-1007.
111. Simak J, Holada K, Janota J, Stranak Z. Surface expression of major membrane glycoproteins on resting and TRAP-activated neonatal platelets. *Pediatr Res.* 1999;46(4):445-449.
112. Pietrucha T, Wojciechowski T, Greger J, et al. Differentiated reactivity of whole blood neonatal platelets to various agonists. *Platelets.* 2001;12(2):99-107.
113. Hezard N, Potron G, Schlegel N, Amory C, Leroux B, Nguyen P. Unexpected persistence of platelet hyporeactivity beyond the neonatal period: a flow cytometric study in neonates, infants and older children. *Thromb Haemost.* 2003;90(1):116-123.
114. Schmugge M, Rand ML, Bang KW, et al. The relationship of von Willebrand factor binding to activated platelets from healthy neonates and adults. *Pediatr Res.* 2003;54(4):474-479.

115. Bednarek FJ, Bean S, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD. The platelet hyporeactivity of extremely low birth weight neonates is age-dependent. *ThrombRes.* 2009;124(1):42-45.
116. Irken G, Mutafoglu Uysal K, Olgun N, et al. Platelet activation during the early neonatal period. *Biol Neonate.* 1998;73(3):166-171.
117. Keh D, Kurer I, Dudenhausen JW, Woltmann W, Falke KJ, Gerlach H. Response of neonatal platelets to nitric oxide in vitro. *Intensive Care Med.* 2001;27(1):283-286.
118. Gatti L, Guarneri D, Caccamo ML, Gianotti GA, Marini A. Platelet activation in newborns detected by flow-cytometry. *Biol Neonate.* 1996;70(6):322-327.
119. Haiden N, Cardona F, Schwindt J, et al. Changes in thrombopoiesis and platelet reactivity in extremely low birth weight infants undergoing erythropoietin therapy for treatment of anaemia of prematurity. *Thromb Haemost.* 2005;93(1):118-123.
120. Israels SJ, Daniels M, McMillan EM. Deficient collagen-induced activation in the newborn platelet. *Pediatr Res.* 1990;27(4 Pt 1):337-343.
121. Schlagenhaut A, Schweintzger S, Birner-Gruenberger R, Leschnik B, Muntean W. Newborn platelets: lower levels of protease-activated receptors cause hypoaggregability to thrombin. *Platelets.* 2010;21(8):641-647.
122. Gelman B, Setty BN, Chen D, Amin-Hanjani S, Stuart MJ. Impaired mobilization of intracellular calcium in neonatal platelets. *Pediatr Res.* 1996;39(4 Pt 1):692-696.
123. Mankin P, Maragos J, Akhand M, Saving KL. Impaired platelet--dense granule release in neonates. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2000;22(2):143-147.
124. Urban D, Pluthero FG, Christensen H, et al. Decreased numbers of dense granules in fetal and neonatal platelets. *Haematologica.* 2016.
125. Saving KL, Jennings DE, Aldag JC, Caughey RC. Platelet ultrastructure of high-risk premature infants. *Thromb Res.* 1994;73(6):371-384.
126. Saving K, Aldag J, Jennings D, Caughey B, Regan M, Powers W. Electron microscopic characterization of neonatal platelet ultrastructure: effects of sampling techniques. *Thromb Res.* 1991;61(1):65-80.
127. Suarez CR, Gonzalez J, Menendez C, Fareed J, Fresco R, Walenga J. Neonatal and maternal platelets: activation at time of birth. *Am J Hematol.* 1988;29(1):18-21.
128. Israels SJ, Cheang T, Roberston C, McMillan-Ward EM, McNicol A. Impaired signal transduction in neonatal platelets. *Pediatr Res.* 1999;45(5 Pt 1):687-691.
129. Bednarek FJ, Bean S, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD. The platelet hyporeactivity of extremely low birth weight neonates is age-dependent. *Thromb Res.* 2009;124(1):42-45.
130. Ichinose F, Uezono S, Muto R, et al. Platelet hyporeactivity in young infants during cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg.* 1999;88(2):258-262.
131. Andrew M, Castle V, Mitchell L, Paes B. Modified bleeding time in the infant. *Am J Hematol.* 1989;30(3):190-191.
132. Andrew M, Paes B, Bowker J, Vegh P. Evaluation of an automated bleeding time device in the newborn. *Am J Hematol.* 1990;35(4):275-277.
133. Harrison P, Keeling D. Clinical tests of platelet function. Platelets: Michelson, AD; 2007.
134. Carcao MD, Blanchette VS, Dean JA, et al. The Platelet Function Analyzer (PFA-100): a novel in-vitro system for evaluation of primary haemostasis in children. *Br J Haematol.* 1998;101(1):70-73.
135. Israels SJ, Cheang T, McMillan-Ward EM, Cheang M. Evaluation of primary hemostasis in neonates with a new in vitro platelet function analyzer. *J Pediatr.* 2001;138(1):116-119.
136. Roschitz B, Sudi K, Kostenberger M, Muntean W. Shorter PFA-100 closure times in neonates than in adults: role of red cells, white cells, platelets and von Willebrand factor. *Acta Paediatr.* 2001;90(6):664-670.

137. Boudewijns M, Raes M, Peeters V, et al. Evaluation of platelet function on cord blood in 80 healthy term neonates using the Platelet Function Analyser (PFA-100); shorter in vitro bleeding times in neonates than adults. *Eur J Pediatr*. 2003;162(3):212-213.
138. Gerrard JM, Docherty JC, Israels SJ, et al. A reassessment of the bleeding time: association of age, hematocrit, platelet function, von Willebrand factor, and bleeding time thromboxane B2 with the length of the bleeding time. *Clin Invest Med*. 1989;12(3):165-171.
139. Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood*. 1987;70(1):165-172.
140. Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood*. 1988;72(5):1651-1657.
141. Katz JA, Moake JL, McPherson PD, et al. Relationship between human development and disappearance of unusually large von Willebrand factor multimers from plasma. *Blood*. 1989;73(7):1851-1858.
142. Weinstein MJ, Blanchard R, Moake JL, Vosburgh E, Moise K. Fetal and neonatal von Willebrand factor (vWF) is unusually large and similar to the vWF in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 1989;72(1):68-72.
143. Levy-Shraga Y, Maayan-Metzger A, Lubetsky A, et al. Platelet function of newborns as tested by cone and plate(let) analyzer correlates with gestational Age. *Acta Haematol*. 2006;115(3-4):152-156.
144. Shenkman B, Einav Y, Salomon O, Varon D, Savion N. Testing agonist-induced platelet aggregation by the Impact-R [Cone and plate(let) analyzer (CPA)]. *Platelets*. 2008;19(6):440-446.
145. Shenkman B, Linder N, Savion N, et al. Increased neonatal platelet deposition on subendothelium under flow conditions: the role of plasma von Willebrand factor. *Pediatr Res*. 1999;45(2):270-275.
146. Del Vecchio A, Latini G, Henry E, Christensen RD. Template bleeding times of 240 neonates born at 24 to 41 weeks gestation. *J Perinatol*. 2008;28(6):427-431.
147. Saxonhouse MA, Garner R, Mammel L, et al. Closure times measured by the platelet function analyzer PFA-100 are longer in neonatal blood compared to cord blood samples. *Neonatology*. 2010;97(3):242-249.
148. Linder N, Shenkman B, Levin E, et al. Deposition of whole blood platelets on extracellular matrix under flow conditions in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2002;86(2):F127-130.
149. Cowman J, Quinn N, Geoghegan S, et al. Dynamic platelet function on von Willebrand factor is different in preterm neonates and full-term neonates: changes in neonatal platelet function. *J Thromb Haemost*. 2016;14(10):2027-2035.
150. Miller BE, Bailey JM, Mancuso TJ, et al. Functional maturity of the coagulation system in children: an evaluation using thrombelastography. *Anesth Analg*. 1997;84(4):745-748.
151. Kettner SC, Pollak A, Zimpfer M, et al. Heparinase-modified thrombelastography in term and preterm neonates. *Anesth Analg*. 2004;98(6):1650-1652, table of contents.
152. Cvirn G, Gallistl S, Kutschera J, et al. Clot strength: a comparison between cord and adult blood by means of thrombelastometry. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30(3):210-213.
153. Strauss T, Levy-Shraga Y, Ravid B, et al. Clot formation of neonates tested by thromboelastography correlates with gestational age. *Thromb Haemost*. 2010;103(2):344-350.
154. Sola-Visner M, Bercovitz RS. Neonatal Platelet Transfusions and Future Areas of Research. *Transfus Med Rev*. 2016;30(4):183-188.
155. Andrew M, Vegh P, Caco C, et al. A randomized, controlled trial of platelet transfusions in thrombocytopenic premature infants. *J Pediatr*. 1993;123(2):285-291.
156. Stanworth SJ, Clarke P, Watts T, et al. Prospective, observational study of outcomes in neonates with severe thrombocytopenia. *Pediatrics*. 2009;124(5):e826-834.
157. Sparger KA, Assmann SF, Granger S, et al. Platelet Transfusion Practices Among Very-Low-Birth-Weight Infants. *JAMA Pediatr*. 2016;170(7):687-694.

158. Ballabh P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease. *Pediatr Res*. 2010;67(1):1-8.
159. Del Vecchio A, Sola MC, Theriaque DW, et al. Platelet transfusions in the neonatal intensive care unit: factors predicting which patients will require multiple transfusions. *Transfusion*. 2001;41(6):803-808.
160. Christensen RD, Henry E, Wiedmeier SE, et al. Thrombocytopenia among extremely low birth weight neonates: data from a multihospital healthcare system. *J Perinatol*. 2006;26(6):348-353.
161. Cremer M, Sola-Visner M, Roll S, et al. Platelet transfusions in neonates: practices in the United States vary significantly from those in Austria, Germany, and Switzerland. *Transfusion*. 2011;51(12):2634-2641.
162. Dohner ML, Wiedmeier SE, Stoddard RA, et al. Very high users of platelet transfusions in the neonatal intensive care unit. *Transfusion*. 2009;49(5):869-872.
163. Silliman CC, Ambruso DR, Boshkov LK. Transfusion-related acute lung injury. *Blood*. 2005;105(6):2266-2273.
164. Ferrer-Marin F, Chavda C, Lampa M, Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Sola-Visner M. Effects of in vitro adult platelet transfusions on neonatal hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(5):1020-1028.
165. Christensen RD. Platelet transfusion in the neonatal intensive care unit: benefits, risks, alternatives. *Neonatology*. 2011;100(3):311-318.
166. Baer VL, Lambert DK, Henry E, Snow GL, Sola-Visner MC, Christensen RD. Do platelet transfusions in the NICU adversely affect survival? Analysis of 1600 thrombocytopenic neonates in a multihospital healthcare system. *J Perinatol*. 2007;27(12):790-796.
167. Christensen RD. Advances and controversies in neonatal ICU platelet transfusion practice. *Adv Pediatr*. 2008;55:255-269.
168. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):s17-24.
169. Goodall AH, Burns P, Salles I, et al. Transcription profiling in human platelets reveals LRRFIP1 as a novel protein regulating platelet function. *Blood*. 2010;116(22):4646-4656.
170. Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, et al. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):369-378.
171. Klimchenko O, Di Stefano A, Georger B, et al. Monocytic cells derived from human embryonic stem cells and fetal liver share common differentiation pathways and homeostatic functions. *Blood*. 2011;117(11):3065-3075.
172. Corby DG, O'Barr TP. Decreased alpha-adrenergic receptors in newborn platelets: cause of abnormal response to epinephrine. *Dev Pharmacol Ther*. 1981;2(4):215-225.
173. Ferrer-Marin F, Liu ZJ, Gutti R, Sola-Visner M. Neonatal thrombocytopenia and megakaryocytopoiesis. *Semin Hematol*. 2010;47(3):281-288.
174. Rajasekhar D, Barnard MR, Bednarek FJ, Michelson AD. Platelet hyporeactivity in very low birth weight neonates. *Thromb Haemost*. 1997;77(5):1002-1007.
175. Liu ZJ, Hoffmeister KM, Hu Z, et al. Expansion of the neonatal platelet mass is achieved via an extension of platelet lifespan. *Blood*. 2014;123(22):3381-3389.
176. Schedel A, Rolf N. Genome-wide platelet RNA profiling in clinical samples. *DNA and RNA Profiling in Human Blood: Methods and Protocols*. 2009:273-283.
177. Nagalla S, Shaw C, Kong X, et al. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood*. 2011;117(19):5189-5197.
178. Navarro-Nunez L, Teruel R, Anton AI, et al. Rare homozygous status of P43 beta1-tubulin polymorphism causes alterations in platelet ultrastructure. *Thromb Haemost*. 2011;105(5):855-863.

179. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-264.
180. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14863-14868.
181. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc*. 2013;8(8):1551-1566.
182. Gnatenko DV, Cupit LD, Huang EC, Dhundale A, Perrotta PL, Bahou WF. Platelets express steroidogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Distinct profiles predict the essential thrombocytopenic phenotype. *Thromb Haemost*. 2005;94(2):412-421.
183. Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, Weissmann D, Perrotta PL, Bahou WF. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood*. 2003;101(6):2285-2293.
184. McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, et al. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(2):133-144.
185. Goh SH, Josleyn M, Lee YT, et al. The human reticulocyte transcriptome. *Physiol Genomics*. 2007;30(2):172-178.
186. Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, et al. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood*. 2011;118(14):e101-111.
187. Schubert P, Devine DV. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang*. 2010;99(2):112-122.
188. Weitzman JB, Fiette L, Matsuo K, Yaniv M. JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell*. 2000;6(5):1109-1119.
189. Osman A, Falker K. Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes. *Platelets*. 2011;22(6):433-441.
190. Edelstein LC, Bray PF. MicroRNAs in platelet production and activation. *Blood*. 2011;117(20):5289-5296.
191. Edelstein LC, Bray PF. Small RNAs as potential platelet therapeutics. *Handb Exp Pharmacol*. 2012(210):435-445.
192. Edelstein LC, McKenzie SE, Shaw C, Holinstat MA, Kunapuli SP, Bray PF. MicroRNAs in platelet production and activation. *J Thromb Haemost*. 2013;11 Suppl 1:340-350.
193. Londin E, Loher P, Telonis AG, et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(10):E1106-1115.
194. Edelstein LC, Simon LM, Montoya RT, et al. Racial differences in human platelet PAR4 reactivity reflect expression of PCTP and miR-376c. *Nat Med*. 2013;19(12):1609-1616.
195. Xu X, Gnatenko DV, Ju J, et al. Systematic analysis of microRNA fingerprints in thrombocytopenic platelets using integrated platforms. *Blood*. 2012;120(17):3575-3585.
196. Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica*. 2008;93(7):1009-1016.
197. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015;4.
198. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*. 2003;5(1):R1.
199. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D146-152.
200. Krek A, Grun D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;37(5):495-500.
201. Ryan BC, Werner TS, Howard PL, Chow RL. ImiRP: a computational approach to microRNA target site mutation. *BMC Bioinformatics*. 2016;17:190.
202. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*. 2006;126(6):1203-1217.

203. Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*. 2004;10(10):1507-1517.
204. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D149-153.
205. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):227-232.
206. Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood*. 2004;104(13):3943-3948.
207. Evangelista V, Manarini S, Di Santo A, et al. De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin. *Circ Res*. 2006;98(5):593-595.
208. Shi R, Ge L, Zhou X, et al. Decreased platelet miR-223 expression is associated with high on-clopidogrel platelet reactivity. *Thromb Res*. 2013;131(6):508-513.
209. Goubau C, Buysse GM, Di Michele M, Van Geet C, Freson K. Regulated granule trafficking in platelets and neurons: a common molecular machinery. *Eur J Paediatr Neurol*. 2013;17(2):117-125.
210. Li X, Zhang J, Gao L, et al. MiR-181 mediates cell differentiation by interrupting the Lin28 and let-7 feedback circuit. *Cell Death Differ*. 2012;19(3):378-386.
211. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008;455(7209):64-71.
212. Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):6845-6853.
213. Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med*. 2011;11(2):93-109.
214. Wu S, Huang S, Ding J, et al. Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*. 2010;29(15):2302-2308.
215. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455(7209):58-63.
216. Whichard ZL, Motter AE, Stein PJ, Corey SJ. Slowly produced microRNAs control protein levels. *J Biol Chem*. 2011;286(6):4742-4748.
217. Caiment F, Gaj S, Claessen S, Kleinjans J. High-throughput data integration of RNA-miRNA-circRNA reveals novel insights into mechanisms of benzo[a]pyrene-induced carcinogenicity. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(5):2525-2534.
218. Marks MS. SNARing platelet granule secretion. *Blood*. 2012;120(12):2355-2357.
219. Golebiewska EM, Poole AW. Secrets of platelet exocytosis - what do we really know about platelet secretion mechanisms? *Br J Haematol*. 2014((2)):204-216.
220. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost*. 2015;13(12):2141-2151.
221. Ren Q, Barber HK, Crawford GL, et al. Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction. *Mol Biol Cell*. 2007;18(1):24-33.
222. Ye S, Karim ZA, Al HR, Pessin JE, Filipovich AH, Whiteheart SW. Syntaxin-11, but not syntaxin-2 or syntaxin-4, is required for platelet secretion. *Blood*. 2012;120(12):2484-2492.
223. Graham GJ, Ren Q, Dilks JR, Blair P, Whiteheart SW, Flaumenhaft R. Endobrevin/VAMP-8-dependent dense granule release mediates thrombus formation in vivo. *Blood*. 2009;114(5):1083-1090.
224. Al Hawas R, Ren Q, Ye S, Karim ZA, Filipovich AH, Whiteheart SW. Munc18b/STXBP2 is required for platelet secretion. *Blood*. 2012;120(12):2493-2500.
225. Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. *Blood*. 2000;95(3):921-929.

226. Peters CG, Michelson AD, Flaumenhaft R. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of alpha-granules expressing VAMP-7. *Blood*. 2012;120(1):199-206.
227. Ts'ao C, Green D, Schultz K. Function and ultrastructure of platelets of neonates: enhanced ristocetin aggregation of neonatal platelets. *Br J Haematol*. 1976;32:225-233.
228. Crescitelli R, Lasser C, Szabo TG, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.
229. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-289.
230. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):195-208.
231. El Andaloussi S, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):347-357.
232. Pienimaeki-Roemer A, Kuhlmann K, Bottcher A, et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion*. 2015;55(3):507-521.
233. Freson K, De Vos R, Wittevrongel C, et al. The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure. *Blood*. 2005;106(7):2356-2362.
234. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Jr., Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol*. 2001;11(8):579-586.
235. Ferrer-Marin F, Stanworth S, Josephson C, Sola-Visner M. Distinct differences in platelet production and function between neonates and adults: implications for platelet transfusion practice. *Transfusion*. 2013;53(11):2814-2821.
236. Sandrock K, Nakamura L, Vraetz T, Beutel K, Ehl S, Zieger B. Platelet secretion defect in patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5). *Blood*. 2010;116(26):6148-6150.
237. Srikanthan S, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Exosome poly-ubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions. *J Thromb Haemost*. 2014;12(11):1906-1917.
238. Wasiluk A, Mantur M, Szczepanski M, Matowicka-Karna J, Kemonia H, Warda J. Platelet-derived microparticles and platelet count in preterm newborns. *Fetal Diagn Ther*. 2008;23(2):149-152.
239. Michelson AD, Rajasekhar D, Bednarek FJ, Barnard MR. Platelet and platelet-derived microparticle surface factor V/Va binding in whole blood: differences between neonates and adults. *Thromb Haemost*. 2000;84(4):689-694.
240. Baker-Groberg SM, Lattimore S, Recht M, McCarty OJ, Haley KM. Assessment of neonatal platelet adhesion, activation, and aggregation. *J Thromb Haemost*. 2016;14(4):815-827.
241. Raslova H, Kauffmann A, Sekkai D, et al. Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood*. 2007;109(8):3225-3234.
242. Italiano JE, Jr., Bergmeier W, Tiwari S, et al. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood*. 2003;101(12):4789-4796.
243. Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, et al. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood*. 2002;99(3):888-897.
244. Navarro-Nunez L, Lozano ML, Rivera J, et al. The association of the beta1-tubulin Q43P polymorphism with intracerebral hemorrhage in men. *Haematologica*. 2007;92(4):513-518.
245. Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*. 2005;85(4):1159-1204.

246. Yang J, Wu J, Jiang H, et al. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46035-46042.
247. Jantzen HM, Milstone DS, Gousset L, Conley PB, Mortensen RM. Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2). *J Clin Invest*. 2001;108(3):477-483.
248. Kelleher KL, Matthaei KI, Hendry IA. Targeted disruption of the mouse Gz-alpha gene: a role for Gz in platelet function? *Thromb Haemost*. 2001;85(3):529-532.
249. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature*. 1997;389(6647):183-186.
250. Ma P, Cierniewska A, Signarvic R, et al. A newly identified complex of spinophilin and the tyrosine phosphatase, SHP-1, modulates platelet activation by regulating G protein-dependent signaling. *Blood*. 2012;119(8):1935-1945.
251. Yang S, Li YP. RGS10-null mutation impairs osteoclast differentiation resulting from the loss of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillation regulation. *Genes Dev*. 2007;21(14):1803-1816.
252. Lee JK, McCoy MK, Harms AS, Ruhn KA, Gold SJ, Tansey MG. Regulator of G-protein signaling 10 promotes dopaminergic neuron survival via regulation of the microglial inflammatory response. *J Neurosci*. 2008;28(34):8517-8528.
253. Lee JK, Chung J, McAlpine FE, Tansey MG. Regulator of G-protein signaling-10 negatively regulates NF-kappaB in microglia and neuroprotects dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. *J Neurosci*. 2011;31(33):11879-11888.
254. Hunt TW, Fields TA, Casey PJ, Peralta EG. RGS10 is a selective activator of G alpha i GTPase activity. *Nature*. 1996;383(6596):175-177.
255. Nagata Y, Oda M, Nakata H, Shozaki Y, Kozasa T, Todokoro K. A novel regulator of G-protein signaling bearing GAP activity for Galphai and Galphaq in megakaryocytes. *Blood*. 2001;97(10):3051-3060.
256. Park IK, Klug CA, Li K, et al. Molecular cloning and characterization of a novel regulator of G-protein signaling from mouse hematopoietic stem cells. *J Biol Chem*. 2001;276(2):915-923.
257. Gold SJ, Ni YG, Dohlman HG, Nestler EJ. Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J Neurosci*. 1997;17(20):8024-8037.
258. Delesque-Touchard N, Pendaries C, Volle-Challier C, et al. Regulator of G-protein signaling 18 controls both platelet generation and function. *PLoS One*. 2014;9(11):e113215.
259. Signarvic RS, Cierniewska A, Stalker TJ, et al. RGS/Gi2alpha interactions modulate platelet accumulation and thrombus formation at sites of vascular injury. *Blood*. 2010;116(26):6092-6100.
260. Brass L. Signal transduction during platelet plug formation. Platelets: Michelson, AD; 2012.
261. Schlagenhauf A, Haidl H, Leschnik B, Leis HJ, Heinemann A, Muntean W. Prostaglandin E2 levels and platelet function are different in cord blood compared to adults. *Thromb Haemost*. 2015;113(1):97-106.
262. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
263. Gagnon AW, Murray DL, Leadley RJ. Cloning and characterization of a novel regulator of G protein signalling in human platelets. *Cell Signal*. 2002;14(7):595-606.
264. Mills DC. ADP receptors on platelets. *Thromb Haemost*. 1996;76(6):835-856.
265. Gorman RR, Bunting S, Miller OV. Modulation of human platelet adenylyl cyclase by prostacyclin (PGX). *Prostaglandins*. 1977;13(3):377-388.
266. Tateson JE, Moncada S, Vane JR. Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins*. 1977;13(3):389-397.

# ***ANEXO I***

---



Tabla Suplementaria 1| 50 genes más expresados en nuestro array y en los arrays de Gnatenko 2003<sup>183</sup> y 2005<sup>182</sup> y de McRedmond 2004<sup>184</sup>. Los genes coincidentes aparecen en negrita.

| Array A-B     |       | Gnatenko 2003 |       | Gnatenko 2005 |       | McRedmond 2004 |       |
|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|----------------|-------|
| Gen (Símbolo) | Orden | Gen (Símbolo) | Orden | Gen (Símbolo) | Orden | Gen (Símbolo)  | Orden |
| SH3KBP1       | 1     | <b>TMSB4X</b> | 1     | <b>B2M</b>    | 1     | CLU            | 1     |
| ATP13A5       | 2     | <b>NRGN</b>   | 2     | H3F3A         | 2     | FTHP1          | 2     |
| <b>PPBP</b>   | 3     | <b>HBB</b>    | 3     | <b>PPBP</b>   | 3     | <b>B2M</b>     | 3     |
| LOC100131754  | 4     | CLU           | 4     | <b>PF4</b>    | 4     | <b>NRGN</b>    | 4     |
| <b>HBB</b>    | 5     | FTHP1         | 5     | <b>NRGN</b>   | 5     | <b>TMSB4X</b>  | 5     |
| DCAF6         | 6     | <b>OAZ1</b>   | 6     | <b>ACTB</b>   | 6     | <b>OAZ1</b>    | 6     |
| <b>TMSB4X</b> | 7     | GNAS1         | 7     | PTPRO         | 7     | <b>TAGLN2</b>  | 7     |
| <b>PF4</b>    | 8     | <b>PF4</b>    | 8     | <b>FTH1</b>   | 8     | <b>PF4</b>     | 8     |
| <b>B2M</b>    | 9     | <b>B2M</b>    | 9     | <b>TMSB4X</b> | 9     | <b>HBB</b>     | 9     |
| <b>HBA1/2</b> | 10    | <b>ACTB</b>   | 10    | FTHL5         | 10    | <b>ACTB</b>    | 10    |
| <b>FTH1</b>   | 11    | <b>TAGLN2</b> | 11    | <b>HBB</b>    | 11    | <b>FTH1</b>    | 11    |
| H3F3A         | 12    | FTL           | 12    | <b>NCOA4</b>  | 12    | GPXI           | 12    |
| OST4          | 13    | GPIIB         | 13    | <b>GNAS</b>   | 13    | <b>SPARC</b>   | 13    |
| FTHL5         | 14    | <b>CCL5</b>   | 14    | <b>HBA1/2</b> | 14    | <b>HLA-C</b>   | 14    |
| TUBB1         | 15    | GPX1          | 15    | HIST1H2AC     | 15    | TLN1           | 15    |
| <b>NRGN</b>   | 16    | <b>HBA1/2</b> | 16    | <b>RPL41</b>  | 16    | <b>GNAS</b>    | 16    |
| GPX1          | 17    | <b>MYL6</b>   | 17    | NGFRAP1       | 17    | <b>F13A1</b>   | 17    |
| <b>NCOA4</b>  | 18    | <b>FTH1</b>   | 18    | CFL1          | 18    | H3F2A          | 18    |
| <b>OAZ1</b>   | 19    | <b>SPARC</b>  | 19    | FTL           | 19    | <b>HBA1/2</b>  | 19    |
| HIST1H2AC     | 20    | <b>GNAS</b>   | 20    | GPX1          | 20    | MLH3           | 20    |
| <b>ACTB</b>   | 21    | <b>HLA-C</b>  | 21    | RGS10         | 21    | <b>PPBP</b>    | 21    |
| RGS18         | 22    | <b>PPBP</b>   | 22    | <b>CCL5</b>   | 22    | H2AL           | 22    |
| PTPRO         | 23    | GAPD          | 23    | GP1BB         | 23    | YWHAH          | 23    |
| C21orf7       | 24    | MLM3          | 24    | <b>HLA-C</b>  | 24    | GPIBB          | 24    |
| VCL           | 25    | <b>NCOA4</b>  | 25    | UBC           | 25    | <b>NCOA4</b>   | 25    |
| <b>GNAS</b>   | 26    | H2AFL         | 26    | SH3BGRL3      | 26    | HLA-E          | 26    |
| <b>CCL5</b>   | 27    | H3F3A         | 27    | HIST1H2BK     | 27    | CTSA           | 27    |
| ITGB1         | 28    | <b>RPL41</b>  | 28    | TMEM111       | 28    | PGRMC1         | 28    |
| MMD           | 29    | TUBA1         | 29    | C21orf7       | 29    | CFL1           | 29    |
| <b>F13A1</b>  | 30    | TLN1          | 30    | PNN           | 30    | MYL9           | 30    |
| GNG11         | 31    | PGRMC1        | 31    | HIST1H3H      | 31    | TUBA1          | 31    |
| PRKAR2B       | 32    | MIC2          | 32    | UBB           | 32    | <b>MYL6</b>    | 32    |
| FTL           | 33    | YWHAH         | 33    | SERF2         | 33    | <b>CCL5</b>    | 33    |
| <b>MYL6</b>   | 34    | TOP3B         | 34    | MMD           | 34    | <b>RPL41</b>   | 34    |
| LUZP6         | 35    | Unknown       | 35    | <b>OAZ1</b>   | 35    | ITGA2B         | 35    |

|               |    |              |    |               |    |                                    |    |
|---------------|----|--------------|----|---------------|----|------------------------------------|----|
| HIST1H2BK     | 36 | UBC          | 36 | GNG11         | 36 | H2B/H2A                            | 36 |
| RGS10         | 37 | H2AFQ        | 37 | MLH3          | 37 | HERV RTVL-H<br>neutral<br>protease | 37 |
| <b>RPL41</b>  | 38 | MLCB         | 38 | <b>SPARC</b>  | 38 | FTLL1                              | 38 |
| <b>SPARC</b>  | 39 | <b>F13A1</b> | 39 | <b>TAGLN2</b> | 39 | MIC2                               | 39 |
| SERF2         | 40 | Unknown      | 40 | HLA-A         | 40 | FLNA                               | 40 |
| LIMS1         | 41 | FLNA         | 41 | HLA-B         | 41 | VCL                                | 41 |
| UBB           | 42 | HLA-E        | 42 | TPT1          | 42 | H2BE                               | 42 |
| PNN           | 43 | PKM2         | 43 | MYL6          | 43 | PTMA                               | 43 |
| HLA-E         | 44 | PTMA         | 44 | RAB11A        | 44 | H2AE                               | 44 |
| <b>HLA-C</b>  | 45 | RGS10        | 45 | VCL           | 45 | DYNLL1                             | 45 |
| MFSD1         | 46 | Unknown      | 46 | <b>F13A1</b>  | 46 | HLA-A                              | 46 |
| <b>TAGLN2</b> | 47 | FL1          | 47 | HIST2H2BE     | 47 | Weakly similar<br>to histone H3.2  | 47 |
| GP1BB         | 48 | ITGA2B       | 48 | ARHGDIB       | 48 | ARPC1B                             | 48 |
| NT5C3         | 49 | H2BFE        | 49 | DYNLL1        | 49 | UBC                                | 49 |
| SRGN          | 50 | H2AFO        | 50 | CD99          | 50 | MMD                                | 50 |

**Tabla Suplementaria 2 | Genes coincidentes entre los 100 más expresados en plaquetas de adulto y neonato en nuestro array combinado A+B y su orden de expresión en cada tipo de muestra. La intensidad de señal se expresa en Log2. Ordenado según valores en adulto.**

| Gen (Símbolo) | Intensidad de Señal (Neonato) | Orden | Intensidad de Señal (Adulto) | Orden |
|---------------|-------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| SH3KBP1       | 14,55                         | 4     | 14,98                        | 1     |
| ATP13A5       | 14,28                         | 9     | 14,81                        | 2     |
| PPBP          | 14,54                         | 5     | 14,74                        | 3     |
| LOC100131754  | 14,37                         | 8     | 14,71                        | 4     |
| HBB           | 14,70                         | 3     | 14,71                        | 5     |
| DCAF6         | 14,38                         | 7     | 14,70                        | 6     |
| TMSB4X        | 14,44                         | 6     | 14,67                        | 7     |
| PF4           | 13,34                         | 20    | 14,54                        | 8     |
| B2M           | 14,27                         | 10    | 14,51                        | 9     |
| HBA1          | 14,86                         | 2     | 14,33                        | 10    |
| FTH1          | 12,53                         | 47    | 14,25                        | 11    |
| H3F3A         | 14,02                         | 12    | 14,14                        | 12    |
| OST4          | 13,67                         | 15    | 14,12                        | 13    |
| FTHL5         | 14,03                         | 11    | 14,04                        | 14    |
| TUBB1         | 13,21                         | 21    | 14,00                        | 15    |
| NRGN          | 13,75                         | 13    | 13,93                        | 16    |
| GPX1          | 13,70                         | 14    | 13,92                        | 17    |
| NCOA4         | 13,57                         | 17    | 13,82                        | 18    |
| OAZ1          | 13,64                         | 16    | 13,75                        | 19    |
| HIST1H2AC     | 13,18                         | 22    | 13,74                        | 20    |
| ACTB          | 13,05                         | 25    | 13,68                        | 21    |
| RGS18         | 12,97                         | 29    | 13,67                        | 22    |
| PTPRO         | 12,91                         | 32    | 13,64                        | 23    |
| C21orf7       | 12,65                         | 39    | 13,63                        | 24    |
| VCL           | 13,05                         | 24    | 13,38                        | 25    |
| GNAS          | 13,03                         | 27    | 13,35                        | 26    |
| CCL5          | 13,10                         | 23    | 13,27                        | 27    |
| ITGB1         | 12,41                         | 53    | 13,24                        | 28    |
| MMD           | 12,58                         | 42    | 13,18                        | 29    |
| F13A1         | 12,43                         | 52    | 13,15                        | 30    |
| GNG11         | 13,01                         | 28    | 13,12                        | 31    |
| PRKAR2B       | 12,27                         | 62    | 13,11                        | 32    |
| FTL           | 12,96                         | 30    | 13,10                        | 33    |
| MYL6          | 13,43                         | 18    | 13,08                        | 34    |
| LUZP6         | 12,34                         | 57    | 13,06                        | 35    |
| HIST1H2BK     | 12,58                         | 43    | 13,03                        | 36    |
| RGS10         | 12,94                         | 31    | 13,03                        | 37    |

|          |       |    |       |     |
|----------|-------|----|-------|-----|
| RPL41    | 12,81 | 35 | 13,01 | 38  |
| SPARC    | 12,29 | 61 | 12,90 | 39  |
| SERF2    | 12,67 | 37 | 12,86 | 40  |
| LIMS1    | 12,13 | 67 | 12,86 | 41  |
| UBB      | 13,36 | 19 | 12,84 | 42  |
| PNN      | 12,57 | 45 | 12,83 | 43  |
| HLA-E    | 12,50 | 49 | 12,77 | 44  |
| HLA-C    | 12,47 | 50 | 12,75 | 45  |
| TAGLN2   | 13,04 | 26 | 12,66 | 47  |
| GP1BB    | 12,61 | 41 | 12,65 | 48  |
| NT5C3    | 12,39 | 54 | 12,62 | 49  |
| SRGN     | 11,84 | 89 | 12,57 | 50  |
| NGFRAP1  | 12,88 | 33 | 12,57 | 51  |
| HLA-A    | 12,31 | 58 | 12,55 | 52  |
| MLH3     | 11,76 | 95 | 12,53 | 53  |
| ITM2B    | 12,13 | 69 | 12,52 | 54  |
| PTMA     | 12,57 | 44 | 12,50 | 56  |
| ARPC1B   | 12,13 | 66 | 12,45 | 59  |
| ACTG1    | 12,06 | 75 | 12,43 | 60  |
| NAP1L1   | 12,46 | 51 | 12,43 | 61  |
| SDPR     | 12,83 | 34 | 12,35 | 64  |
| RAP1B    | 11,90 | 82 | 12,31 | 67  |
| HNRNPA3  | 12,12 | 72 | 12,31 | 68  |
| TPT1     | 12,24 | 64 | 12,31 | 69  |
| HIST1H3H | 12,35 | 55 | 12,30 | 70  |
| SAT1     | 12,51 | 48 | 12,30 | 71  |
| UBC      | 12,12 | 71 | 12,27 | 72  |
| PGRMC1   | 12,79 | 36 | 12,25 | 73  |
| HMGB1    | 11,88 | 85 | 12,25 | 74  |
| CFL1     | 12,55 | 46 | 12,23 | 76  |
| CD99     | 12,19 | 65 | 12,21 | 78  |
| TMEM111  | 12,29 | 60 | 12,19 | 79  |
| ARHGDI1B | 12,64 | 40 | 12,18 | 80  |
| MAX      | 12,12 | 70 | 12,13 | 84  |
| RAB11A   | 12,10 | 73 | 12,11 | 88  |
| ACRBP    | 12,01 | 76 | 12,09 | 90  |
| HLA-B    | 11,83 | 90 | 12,04 | 92  |
| GAPDH    | 11,58 | 97 | 12,01 | 93  |
| EIF1     | 11,76 | 94 | 11,97 | 96  |
| HBG1     | 15,07 | 1  | 11,90 | 97  |
| ARL6IP5  | 11,77 | 93 | 11,86 | 98  |
| DYNLRB1  | 11,38 | 99 | 11,75 | 100 |

**Tabla Suplementaria 3 | Análisis de enriquecimiento génico empleando los genes coincidentes de entre los 100 genes más expresados en adultos y neonatos. Se considera  $p < 0,05$  como significativo.**

| ID | GO biological process complete  | # Genes de Referencia | # Genes Observados | # Genes Esperados | Enriquecimiento | p-valor  | Genes Enriquecidos              |
|----|---|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------|----------|---------------------------------|
| 1  | <b>Antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I via ER pathway, TAP-independent (GO:0002486)</b> | 3                     | 3                  | 0,01              | > 100           | 2,02E-03 | HLA-A, HLA-B, HLA-C             |
| 2  | Antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I (GO:0019885)  | 15                    | 4                  | 0,06              | 69,04           | 3,40E-03 |                                 |
| 3  | Antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen (GO:0002483)  | 16                    | 5                  | 0,06              | 80,91           | 5,14E-05 |                                 |
| 4  | Antigen processing and presentation of endogenous antigen (GO:0019883)  | 19                    | 5                  | 0,07              | 68,14           | 1,20E-04 |                                 |
| 5  | <b>Antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-independent (GO:0002480)</b>                 | 9                     | 5                  | 0,03              | > 100           | 2,96E-06 | HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, B2M |
| 6  | <b>Protection from natural killer cell mediated cytotoxicity (GO:0042270)</b>   | 6                     | 3                  | 0,02              | > 100           | 1,60E-02 | HLA-A, HLA-B, HLA-E             |
| 7  | Regulation of immune response (GO:0050776)  | 862                   | 14                 | 3,33              | 4,21            | 4,32E-02 |                                 |
| 8  | <b>Positive regulation of T cell mediated cytotoxicity (GO:0001916)</b>   | 16                    | 4                  | 0,06              | 64,73           | 4,38E-03 | HLA-A, HLA-B, HLA-E, B2M        |
| 9  | Regulation of T cell mediated immunity (GO:0002709)   | 53                    | 5                  | 0,20              | 24,43           | 1,83E-02 |                                 |
| 10 | Regulation of T cell mediated cytotoxicity (GO:0001914)   | 23                    | 4                  | 0,09              | 45,03           | 1,83E-02 |                                 |
| 11 | <b>Platelet aggregation (GO:0070527)</b>  | 40                    | 5                  | 0,15              | 32,36           | 4,67E-03 | HBB, GNAS, ACTG1,               |

|    |   |      |    |       |       |          |  |  |
|----|---|------|----|-------|-------|----------|--|--|
| 12 | Platelet activation (GO:0030168)  | 144  | 7  | 0,56  | 12,59 | 1,31E-02 | ACTB, VCL                                    |  |
| 13 | Cell activation (GO:0001775)  | 578  | 13 | 2,23  | 5,82  | 2,80E-03 |  |  |
| 14 | Blood coagulation (GO:0007596)  | 296  | 11 | 1,14  | 9,62  | 1,76E-04 |  |  |
| 15 | Coagulation (GO:0050817)  | 298  | 11 | 1,15  | 9,56  | 1,89E-04 |  |  |
| 16 | Hemostasis (GO:0007599)   | 301  | 11 | 1,16  | 9,46  | 2,09E-04 |  |  |
| 17 | Regulation of body fluid levels (GO:0050878)  | 503  | 13 | 1,94  | 6,69  | 5,79E-04 |  |  |
| 18 | Regulation of biological quality (GO:0065008)   | 3460 | 33 | 13,36 | 2,47  | 1,58E-03 |  |  |
| 19 | Wound healing (GO:0042060)  | 470  | 13 | 1,82  | 7,16  | 2,65E-04 |  |  |
| 20 | Response to wounding (GO:0009611)   | 568  | 14 | 2,19  | 6,38  | 3,08E-04 |  |  |
| 21 | Response to stress (GO:0006950)   | 3301 | 31 | 12,75 | 2,43  | 6,47E-03 |  |  |
| 22 | Response to stimulus (GO:0050896)   | 7565 | 50 | 29,22 | 1,71  | 1,94E-02 |  |  |
| 23 | Homotypic cell-cell adhesion (GO:0034109)   | 53   | 5  | 0,20  | 24,43 | 1,83E-02 |  |  |
| 24 | <b>Antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent (GO:0002479)</b> | 63   | 5  | 0,24  | 20,55 | 4,23E-02 |  | HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, B2M            |
| 25 | <b>Platelet degranulation (GO:0002576)</b>  | 106  | 7  | 0,41  | 17,10 | 1,72E-03 |  | SPARC, SRGN, PPBP, F13A1, TMSB4X, PF4, VCL |
| 26 | Exocytosis (GO:0006887)   | 312  | 9  | 1,21  | 7,47  | 2,89E-02 |  |  |
| 27 | Secretion by cell (GO:0032940)  | 493  | 11 | 1,90  | 5,78  | 2,63E-02 |  |  |
| 28 | Establishment of localization (GO:0051234)  | 3996 | 33 | 15,43 | 2,14  | 4,42E-02 |  |  |
| 29 | Vesicle-mediated transport (GO:0016192)   | 1256 | 17 | 4,85  | 3,50  | 4,24E-02 | CCL5, HLA-E, B2M, GAPDH, HLA-C, HLA-B, HLA-A |  |
| 30 | <b>Cellular response to interferon-gamma (GO:0071346)</b>   | 122  | 7  | 0,47  | 14,86 | 4,39E-03 |  |  |
| 31 | Response to interferon-gamma (GO:0034341)   | 144  | 7  | 0,56  | 12,59 | 1,31E-02 |  |  |
| 32 | Cellular response to chemical stimulus (GO:0070887)   | 2310 | 25 | 8,92  | 2,80  | 9,44E-03 |  |  |

**Tabla Suplementaria 4 | Lista de genes representando el patrón de expresión diferencial entre adultos y neonatos.** Los resultados del test ANOVA fueron filtrados por Fold Change >2 y <-2 y nivel de significación de p<0,05.

| Gen (Símbolo)  | Gen (Nombre)  | RefSeq Transcript ID   | p-valor | Fold Change |
|--|---|--|---------|-------------|
| SCGB1C1 /// SCGB1C2  | secretoglobin, family 1C, member 1 /// secretoglobin, family 1C, member 2                           | NM_001097610 ///<br>NM_145651 ///<br>XM_005252804 ///<br>XM_006725250 ///<br>XM_011535362              | 0,01397 | -10,46620   |
| LOC101060373 ///<br>LOC102723728 ///<br>NOMO1 /// NOMO2<br>/// NOMO3 | uncharacterized<br>LOC101060373 /// nodal<br>modulator 3-like /// NODAL<br>modulator 1 /// NODAL    | NM_001004060 ///<br>NM_001004067 ///<br>NM_014287 ///<br>NM_173614 ///<br>XM_005255318 ///<br>XM_00672 | 0,00405 | -9,05504    |
| LOC105379273 ///<br>LOC389834 /// MAFIP<br>/// TEKT4P2               | uncharacterized<br>LOC105379273 /// ankyrin<br>repeat domain 57<br>pseudogene /// MAFF<br>interacti | NM_001033515 ///<br>NM_001190825 ///<br>NM_174948 ///<br>NR_027420 ///<br>NR_038327 ///<br>NR_038328 / | 0,02014 | -4,84227    |
| LINC01088  | long intergenic non-protein<br>coding RNA 1088  | NR_038342  | 0,02206 | -4,55039    |
| ZNF542P  | zinc finger protein 542,<br>pseudogene  | NM_194319 ///<br>NR_003127 ///<br>NR_024055 ///<br>NR_024056 ///<br>NR_024057 ///<br>NR_033418         | 0,03693 | -4,16253    |
| FAM101B  | family with sequence<br>similarity 101, member B  | NM_182705  | 0,04789 | -4,14137    |
| CENPBD1P1 ///<br>LOC105373318 ///<br>RPL23AP7 ///<br>RPL23AP79       | CENPB DNA-binding domains<br>containing 1 pseudogene 1<br>/// uncharacterized<br>LOC105373318 //    | NM_023939 ///<br>NR_000029 ///<br>NR_024528 ///<br>NR_024529 ///<br>NR_024530 ///<br>NR_024531 /// NR_ | 0,01706 | -4,13157    |
| PANX1  | pannexin 1  | NM_015368 ///<br>XM_005273863 ///<br>XM_011542734  | 0,00828 | -4,01087    |
| GGTA1P   | glycoprotein, alpha-<br>galactosyltransferase 1<br>pseudogene                                       | NR_003191 ///<br>NR_045211   | 0,04458 | -3,72800    |
| ANAPC5   | anaphase promoting<br>complex subunit 5   | NM_001137559 ///<br>NM_016237 ///<br>XM_005253900 ///<br>XM_006719449                                  | 0,00389 | -3,55312    |
| ERV3-1   | endogenous retrovirus group<br>3, member 1  | NM_001007253   | 0,02383 | -3,49445    |
| DUBR   | DPPA2 upstream binding<br>RNA   | NR_028301 ///<br>NR_028302   | 0,01670 | -3,42582    |

|                 |  |  |         |          |
|-----------------|--|--|---------|----------|
| CDK14           | cyclin-dependent kinase 14   | NM_001287135 ///<br>NM_001287136 ///<br>NM_001287137 ///<br>NM_012395 ///<br>XM_005250436 ///<br>XM_00 | 0,00250 | -3,37097 |
| KANSL1-AS1      | KANSL1 antisense RNA 1   | NR_034172  | 0,01294 | -3,37078 |
| ABAT            | 4-aminobutyrate aminotransferase   | NM_000663 ///<br>NM_001127448 ///<br>NM_020686 ///<br>XM_011522400 ///<br>XM_011522401                 | 0,03130 | -3,36398 |
| C1orf87         | chromosome 1 open reading frame 87   | NM_152377  | 0,02989 | -3,29223 |
| PIK3CG          | phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma                | NM_001282426 ///<br>NM_001282427 ///<br>NM_002649 ///<br>XM_005250443 ///<br>XM_011516316 ///<br>XM_01 | 0,00559 | -3,27752 |
| MCUR1           | mitochondrial calcium uniporter regulator 1  | NM_001031713 ///<br>NM_022102 ///<br>XM_011514802  | 0,04569 | -3,17138 |
| PROSER2         | proline and serine rich 2  | NM_153256 ///<br>XM_011519438 ///<br>XM_011519439  | 0,04169 | -2,99785 |
| GNAZ            | guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide                    | NM_002073 ///<br>XR_937843 ///<br>XR_937844 ///<br>XR_937845 ///<br>XR_937846                          | 0,03402 | -2,83073 |
| PSD3            | pleckstrin and Sec7 domain containing 3  | NM_015310 ///<br>NM_206909 ///<br>XM_011544462 ///<br>XM_011544463 ///<br>XM_011544464 ///<br>XM_01154 | 0,04142 | -2,71393 |
| KCND3           | potassium channel, voltage gated Shal related subfamily D, member 3                    | NM_004980 ///<br>NM_172198 ///<br>XM_005270851 ///<br>XM_006710629 ///<br>XM_006710630 ///<br>XM_00671 | 0,03694 | -2,60912 |
| ACSBG1          | acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1  | NM_001199377 ///<br>NM_015162 ///<br>XM_011521389 ///<br>XM_011521390 ///<br>XM_011521391              | 0,01108 | -2,54728 |
| PABPC1 /// RLIM | poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 /// ring finger protein, LIM domain interacting | NM_002568 ///<br>NM_016120 ///<br>NM_183353 ///<br>XM_005250861  | 0,02930 | -2,51152 |
| PABPC3          | poly(A) binding protein, cytoplasmic 3   | NM_030979  | 0,02817 | -2,50765 |

|          |  |  |         |          |
|----------|--|--|---------|----------|
| ABCC3    | ATP binding cassette subfamily C member 3                    | NM_001144070 ///<br>NM_003786 ///<br>NM_020037 ///<br>NM_020038 ///<br>XM_005257763 ///<br>XM_01152542 | 0,02096 | -2,46310 |
| GNB5     | guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5       | NM_006578 ///<br>NM_016194 ///<br>XM_011521162 ///<br>XM_011521163                                     | 0,00083 | -2,46253 |
| NBEA     | neurobeachin   | NM_001204197 ///<br>NM_015678 ///<br>XM_005266346 ///<br>XM_005266347 ///<br>XM_005266348 ///<br>XM_00 | 0,02638 | -2,27989 |
| DNASE2B  | deoxyribonuclease II beta                                    | NM_021233 ///<br>NM_058248 ///<br>XM_011541878   | 0,02319 | -2,24955 |
| EIF4G3   | eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3          | NM_001198801 ///<br>NM_001198802 ///<br>NM_001198803 ///<br>NM_003760 ///<br>XM_011542356 ///<br>XM_01 | 0,03059 | -2,23713 |
| CPT1A    | carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)                    | NM_001031847 ///<br>NM_001876 ///<br>XM_005273762 ///<br>XM_005273763                                  | 0,01365 | -2,21531 |
| ENTPD6   | ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (putative)  | NM_001114089 ///<br>NM_001247 ///<br>XM_005260878 ///<br>XM_005260881 ///<br>XM_005260882 ///<br>XM_00 | 0,04058 | -2,17607 |
| LAMP5    | lysosomal-associated membrane protein family, member 5       | NM_001199897 ///<br>NM_012261 ///<br>XM_011529206  | 0,03250 | -2,14551 |
| FAM20B   | family with sequence similarity 20, member B                 | NM_014864 ///<br>XM_011510224 ///<br>XM_011510225 ///<br>XM_011510226                                  | 0,01547 | -2,13779 |
| SCFD2    | sec1 family domain containing 2                              | NM_152540 ///<br>XM_011534375 ///<br>XM_011534376 ///<br>XM_011534377 ///<br>XM_011534378              | 0,01819 | -2,10793 |
| C22orf39 | chromosome 22 open reading frame 39                          | NM_001166242 ///<br>NM_173793  | 0,03082 | -2,10706 |
| SERPING1 | serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1 | NM_000062 ///<br>NM_001032295  | 0,01714 | -2,10191 |
| USP31    | ubiquitin specific peptidase 31                              | NM_020718 ///<br>XM_011545909 ///<br>XM_011545910  | 0,01338 | -2,04910 |

|         |  |  |         |          |
|---------|--|--|---------|----------|
| TSPAN33 | tetraspanin 33   | NM_178562 ///<br>XM_006715960  | 0,00870 | -2,03649 |
| CCNT2   | cyclin T2  | NM_001241 ///<br>NM_058241 ///<br>NR_037649 ///<br>XM_006712827 ///<br>XM_011512132 ///<br>XM_01151213 | 0,00908 | 2,00324  |
| CSTF3   | cleavage stimulation factor,<br>3' pre-RNA, subunit 3  | NM_001033505 ///<br>NM_001033506 ///<br>NM_001326 ///<br>XM_006718154                                  | 0,00294 | 2,00848  |
| NADK    | NAD kinase   | NM_001198993 ///<br>NM_001198994 ///<br>NM_001198995 ///<br>NM_023018 ///<br>XM_005244778 ///<br>XM_00 | 0,04987 | 2,01146  |
| MRPL57  | mitochondrial ribosomal<br>protein L57                 | NM_024026  | 0,03787 | 2,01332  |
| HES6    | hes family bHLH<br>transcription factor 6              | NM_001142853 ///<br>NM_001282434 ///<br>NM_018645  | 0,00799 | 2,04882  |
| SH3BP4  | SH3-domain binding protein<br>4                        | NM_014521 ///<br>XM_011510891 ///<br>XM_011510892 ///<br>XM_011510893 ///<br>XM_011510894              | 0,00186 | 2,05369  |
| FKBP15  | FK506 binding protein 15                               | NM_015258 ///<br>XM_006717018 ///<br>XM_006717019  | 0,02159 | 2,06183  |
| DNAJA4  | DnaJ (Hsp40) homolog,<br>subfamily A, member 4         | NM_001130182 ///<br>NM_001130183 ///<br>NM_018602 ///<br>XM_005254535 ///<br>XM_006720601              | 0,00702 | 2,06382  |
| CDC34   | cell division cycle 34                                 | NM_004359 ///<br>XM_005259690 ///<br>XM_006722952  | 0,00583 | 2,06531  |
| BZW2    | basic leucine zipper and W2<br>domains 2               | NM_001159767 ///<br>NM_014038 ///<br>NR_027624 ///<br>XM_006715706 ///<br>XM_006715707 ///<br>XM_00671 | 0,01177 | 2,06613  |
| LRPPRC  | leucine-rich<br>pentatricopeptide repeat<br>containing | NM_133259 ///<br>XM_006711915 ///<br>XM_006711916 ///<br>XM_011532473 ///<br>XM_011532474              | 0,00785 | 2,08214  |
| CRYM    | crystallin mu  | NM_001014444 ///<br>NM_001888 ///<br>XM_011545740  | 0,00189 | 2,08537  |
| TSPYL2  | TSPY-like 2  | NM_022117 ///<br>XM_006724592  | 0,01783 | 2,09359  |

|   |   |  |         |         |
|---|---|--|---------|---------|
| APOBEC3B  | apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B                             | NM_001270411 ///<br>NM_004900  | 0,03522 | 2,09946 |
| RBM26   | RNA binding motif protein 26  | NM_001286631 ///<br>NM_001286632 ///<br>NM_018605 ///<br>NM_022118 ///<br>XM_005266491 ///<br>XM_00526 | 0,02057 | 2,10099 |
| CBWD1 /// CBWD2<br>/// CBWD3 ///<br>CBWD5 /// CBWD6 | COBW domain containing 1<br>/// COBW domain containing<br>2 /// COBW domain<br>containing 3 /// | NM_001024916 ///<br>NM_001085457 ///<br>NM_001145355 ///<br>NM_001145356 ///<br>NM_001286835 /// NM    | 0,01801 | 2,10866 |
| RREB1   | ras responsive element binding protein 1  | NM_001003698 ///<br>NM_001003699 ///<br>NM_001003700 ///<br>NM_001168344 ///<br>NM_002955 /// XM_00    | 0,03937 | 2,11256 |
| RIMKLB  | ribosomal modification protein rimK-like family member B  | NM_001297776 ///<br>NM_020734 ///<br>NR_123740 ///<br>XM_006719116 ///<br>XM_006719118 ///<br>XM_00671 | 0,04416 | 2,11336 |
| ADGRG1  | adhesion G protein-coupled receptor G1  | NM_001145770 ///<br>NM_001145771 ///<br>NM_001145772 ///<br>NM_001145773 ///<br>NM_001145774 /// NM    | 0,04918 | 2,11581 |
| HSP90B1   | heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1   | NM_003299  | 0,01014 | 2,12235 |
| CCNT1   | cyclin T1   | NM_001240 ///<br>NM_001277842  | 0,03261 | 2,12282 |
| RCN2  | reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain  | NM_001271837 ///<br>NM_002902  | 0,04889 | 2,13944 |
| ALG5  | ALG5, dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase   | NM_001142364 ///<br>NM_013338 ///<br>XM_005266362 ///<br>XM_011535054                                  | 0,04417 | 2,14311 |
| ANK1  | ankyrin 1, erythrocytic   | NM_000037 ///<br>NM_001142445 ///<br>NM_001142446 ///<br>NM_020475 ///<br>NM_020476 ///<br>NM_020477 / | 0,00784 | 2,14448 |
| MTF2  | metal response element binding transcription factor 2   | NM_001164391 ///<br>NM_001164392 ///<br>NM_001164393 ///<br>NM_007358 ///<br>XM_011541016 ///<br>XM_01 | 0,00996 | 2,14713 |

|          |  |  |         |         |
|----------|--|--|---------|---------|
| UQCRB    | ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein | NM_001199975 ///<br>NM_001254752 ///<br>NM_006294 ///<br>NR_045639                                     | 0,04449 | 2,15847 |
| FRYL     | FRY like transcription coactivator               | NM_001039751 ///<br>NM_015030 ///<br>XM_005248090 ///<br>XM_005248093 ///<br>XM_011513680 ///<br>XM_01 | 0,01027 | 2,16011 |
| LYRM4    | LYR motif containing 4                           | NM_001164840 ///<br>NM_001164841 ///<br>NM_020408 ///<br>NR_104417 ///<br>NR_104418 ///<br>XM_00524923 | 0,02430 | 2,17765 |
| CTBP2    | C-terminal binding protein 2                     | NM_001083914 ///<br>NM_001290214 ///<br>NM_001290215 ///<br>NM_001329 ///<br>NM_022802 ///<br>XM_00526 | 0,02115 | 2,18219 |
| C16orf95 | chromosome 16 open reading frame 95              | NM_001195124 ///<br>NM_001195125 ///<br>NM_001256917   | 0,03999 | 2,18881 |
| PTGR1    | prostaglandin reductase 1                        | NM_001146108 ///<br>NM_001146109 ///<br>NM_012212 ///<br>XM_011518394 ///<br>XM_011518395 ///<br>XR_92 | 0,02330 | 2,19281 |
| ANKRD12  | ankyrin repeat domain 12                         | NM_001083625 ///<br>NM_001204056 ///<br>NM_015208 ///<br>XM_005258092 ///<br>XM_005258093 ///<br>XM_00 | 0,02753 | 2,19326 |
| RPL27    | ribosomal protein L27                            | NM_000988  | 0,00311 | 2,19427 |
| SRI      | sorcin   | NM_001256891 ///<br>NM_001256892 ///<br>NM_003130 ///<br>NM_198901 ///<br>XM_006716097 ///<br>XM_01151 | 0,01363 | 2,21016 |
| CFAP97   | cilia and flagella associated protein 97         | NM_001292033 ///<br>NM_020827 ///<br>XM_005263154 ///<br>XM_011532151 ///<br>XM_011532152 ///<br>XM_01 | 0,01303 | 2,21693 |
| BAMBI    | BMP and activin membrane-bound inhibitor         | NM_012342  | 0,04637 | 2,23294 |

|         |   |  |         |         |
|---------|---|--|---------|---------|
| USP48   | ubiquitin specific peptidase 48           | NM_001032730 ///<br>NM_032236 ///<br>XM_005246009 ///<br>XM_006710951 ///<br>XM_006710955 ///<br>XM_01 | 0,01112 | 2,23949 |
| RPL36AL | ribosomal protein L36a-like               | NM_001001  | 0,01382 | 2,24317 |
| NOL7    | nucleolar protein 7                       | NM_016167 ///<br>XM_005249173  | 0,00436 | 2,25995 |
| WAPL    | WAPL cohesin release factor               | NM_015045 ///<br>XM_006717729 ///<br>XM_011539547 ///<br>XM_011539548                                  | 0,04605 | 2,26469 |
| DENR    | density-regulated protein                 | NM_003677  | 0,03553 | 2,27351 |
| TSPAN3  | tetraspanin 3                             | NM_001168412 ///<br>NM_005724 ///<br>NM_198902   | 0,01301 | 2,28328 |
| RRM2    | ribonucleotide reductase M2               | NM_001034 ///<br>NM_001165931  | 0,04924 | 2,29064 |
| TCF3    | transcription factor 3                    | NM_001136139 ///<br>NM_003200 ///<br>XM_006722852 ///<br>XM_006722853 ///<br>XM_006722855 ///<br>XM_00 | 0,02214 | 2,29152 |
| ZNF131  | zinc finger protein 131                   | NM_001297548 ///<br>NM_003432 ///<br>NR_123719 ///<br>NR_123720 ///<br>XM_005248359 ///<br>XM_00524836 | 0,04272 | 2,29842 |
| HBBP1   | hemoglobin, beta pseudogene 1             | NR_001589  | 0,03327 | 2,30013 |
| NUP50   | nucleoporin 50kDa                         | NM_007172 ///<br>NM_153645 ///<br>XM_005261312 ///<br>XM_005261313 ///<br>XM_005261314 ///<br>XM_00672 | 0,02300 | 2,30045 |
| SP100   | SP100 nuclear antigen                     | NM_001080391 ///<br>NM_001206701 ///<br>NM_001206702 ///<br>NM_001206703 ///<br>NM_001206704 /// NM    | 0,00034 | 2,31015 |
| HNRNPM  | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M | NM_001297418 ///<br>NM_005968 ///<br>NM_031203 ///<br>XM_005272478 ///<br>XM_005272479 ///<br>XM_00527 | 0,02672 | 2,32112 |
| CISH    | cytokine inducible SH2-containing protein | NM_013324 ///<br>NM_145071 ///<br>XM_011533329   | 0,02357 | 2,33645 |

|                                    |  |   |         |         |
|------------------------------------|--|---|---------|---------|
| SCAF8                              | SR-related CTD-associated factor 8   | NM_001286188 ///<br>NM_001286189 ///<br>NM_001286194 ///<br>NM_001286199 ///<br>NM_014892           | 0,00312 | 2,36079 |
| RAD23A                             | RAD23 homolog A, nucleotide excision repair protein                                    | NM_001270362 ///<br>NM_001270363 ///<br>NM_005053 ///<br>NR_072976                                  | 0,01597 | 2,36513 |
| NRBF2                              | nuclear receptor binding factor 2  | NM_001282405 ///<br>NM_030759 ///<br>XM_006717810   | 0,02969 | 2,37457 |
| RPSA                               | ribosomal protein SA   | NM_001304288 ///<br>NM_002295   | 0,00555 | 2,38010 |
| PXMP4                              | peroxisomal membrane protein 4   | NM_007238 ///<br>NM_183397  | 0,03262 | 2,38293 |
| RPS10 /// RPS10-NUDT3 /// RPS10P19 | ribosomal protein S10 /// RPS10-NUDT3 readthrough /// ribosomal protein S10 pseudogene | NM_001014 ///<br>NM_001202470 ///<br>NM_001203245 ///<br>NM_001204091                               | 0,01555 | 2,38687 |
| RPS28                              | ribosomal protein S28  | NM_001031   | 0,02585 | 2,38958 |
| MICAL2                             | microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2             | NM_001282663 ///<br>NM_001282664 ///<br>NM_001282665 ///<br>NM_001282666 ///<br>NM_001282667 /// NM | 0,04631 | 2,38996 |
| SRP72                              | signal recognition particle 72kDa  | NM_001267722 ///<br>NM_006947 ///<br>XM_005265765   | 0,03297 | 2,39240 |
| CENPF                              | centromere protein F   | NM_016343 ///<br>XM_011509082 ///<br>XM_011509083   | 0,00646 | 2,39531 |
| ZRANB1                             | zinc finger, RAN-binding domain containing 1   | NM_017580 ///<br>XM_005269925 ///<br>XM_005269926 ///<br>XM_006717907 ///<br>XM_011539887           | 0,00437 | 2,39803 |
| IL13RA1                            | interleukin 13 receptor, alpha 1   | NM_001560 ///<br>XM_011531336 ///<br>XM_011531337   | 0,02600 | 2,40113 |
| NDUFS8                             | NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, 23kDa (NADH-coenzyme Q reductase)      | NM_002496 ///<br>XM_005274013 ///<br>XM_005274014 ///<br>XM_005274015 ///<br>XM_011545053           | 0,02295 | 2,41203 |
| AMMECR1                            | Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal | NM_001025580 ///<br>NM_001171689 ///<br>NM_015365   | 0,01366 | 2,41635 |
| SLC25A38                           | solute carrier family 25, member 38  | NM_017875 ///<br>XM_006713214 ///<br>XM_011533869 ///<br>XM_011533870 ///<br>XM_011533871           | 0,04064 | 2,42128 |

|                    |   |  |         |         |
|--------------------|---|--|---------|---------|
| JMJD1C             | jumonji domain containing 1C  | NM_001282948 ///<br>NM_004241 ///<br>NM_032776 ///<br>XM_005269624 ///<br>XM_005269626 ///<br>XM_01153 | 0,02094 | 2,44412 |
| RPL13 /// RPL13P12 | ribosomal protein L13 ///<br>ribosomal protein L13<br>pseudogene 12 | NM_000977 ///<br>NM_001243130 ///<br>NM_001243131 ///<br>NM_033251                                     | 0,02587 | 2,44876 |
| NEK6               | NIMA-related kinase 6   | NM_001145001 ///<br>NM_001166167 ///<br>NM_001166168 ///<br>NM_001166169 ///<br>NM_001166170 /// NM    | 0,04020 | 2,45309 |
| EPB41              | erythrocyte membrane protein band 4.1                               | NM_001166005 ///<br>NM_001166006 ///<br>NM_001166007 ///<br>NM_004437 ///<br>NM_203342 ///<br>NM_20334 | 0,03697 | 2,45977 |
| SAMD9              | sterile alpha motif domain containing 9                             | NM_001193307 ///<br>NM_017654  | 0,01038 | 2,47340 |
| CLIC2              | chloride intracellular channel 2                                    | NM_001289  | 0,01673 | 2,50279 |
| SELENBP1           | selenium binding protein 1  | NM_001258288 ///<br>NM_001258289 ///<br>NM_003944 ///<br>XM_011510110 ///<br>XM_011510111 ///<br>XR_92 | 0,03467 | 2,51525 |
| RPL18A             | ribosomal protein L18a  | NM_000980  | 0,03463 | 2,54455 |
| ADD2               | adducin 2 (beta)  | NM_001185054 ///<br>NM_001185055 ///<br>NM_001617 ///<br>NM_017482 ///<br>NM_017483 ///<br>NM_017484 / | 0,03344 | 2,56120 |
| SOX4               | SRY box 4   | NM_003107  | 0,02110 | 2,56807 |
| DHX29              | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29                           | NM_019030 ///<br>XM_005248544 ///<br>XM_006714653 ///<br>XM_011543494                                  | 0,01365 | 2,59408 |
| NDUFAB1            | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa   | NM_005003 ///<br>XM_011545856  | 0,00735 | 2,59844 |
| PPP4R2             | protein phosphatase 4, regulatory subunit 2                         | NM_174907  | 0,01585 | 2,60195 |
| UROD               | uroporphyrinogen decarboxylase                                      | NM_000374 ///<br>NR_036510 ///<br>XM_005271169 ///<br>XM_005271170 ///<br>XM_011542080 ///<br>XM_01154 | 0,02425 | 2,61270 |

|                     |   |   |         |         |
|---------------------|---|---|---------|---------|
| CARD8               | caspase recruitment domain family, member 8   | NM_001184900 ///<br>NM_001184901 ///<br>NM_001184902 ///<br>NM_001184903 ///<br>NM_001184904 /// NM | 0,01927 | 2,63755 |
| RPS4X               | ribosomal protein S4, X-linked  | NM_001007   | 0,04774 | 2,68049 |
| PSMB1               | proteasome subunit beta 1   | NM_002793   | 0,00616 | 2,68429 |
| ATP5I               | ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit E                       | NM_007100 ///<br>NR_033743  | 0,02312 | 2,71386 |
| SUGT1               | SGT1 homolog, MIS12 kinetochore complex assembly cochaperone                            | NM_001130912 ///<br>NM_006704 ///<br>XM_011534891 ///<br>XM_011534892 ///<br>XM_011534893           | 0,03469 | 2,76482 |
| SERBP1              | SERPINE1 mRNA binding protein 1   | NM_001018067 ///<br>NM_001018068 ///<br>NM_001018069 ///<br>NM_015640                               | 0,04164 | 2,81431 |
| GYPC                | glycophorin C (Gerbich blood group)   | NM_001256584 ///<br>NM_002101 ///<br>NM_016815 ///<br>XM_006712460                                  | 0,00915 | 2,81917 |
| QARS                | glutaminyl-tRNA synthetase  | NM_001272073 ///<br>NM_005051 ///<br>NR_073590 ///<br>XM_011533973                                  | 0,01309 | 2,82832 |
| SLC6A8              | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 8                        | NM_001142805 ///<br>NM_001142806 ///<br>NM_005629   | 0,02928 | 2,82892 |
| HSPA5               | heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)                           | NM_005347   | 0,02538 | 2,82916 |
| SLU7                | SLU7 homolog, splicing factor   | NM_006425 ///<br>XM_005265793 ///<br>XM_011534418   | 0,03063 | 2,85343 |
| EEF1D /// EEF1DP1   | eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)  | NM_001130053 ///<br>NM_001130054 ///<br>NM_001130055 ///<br>NM_001130056 ///<br>NM_001130057 /// NM | 0,02765 | 2,85977 |
| SRP19               | signal recognition particle 19kDa   | NM_001204193 ///<br>NM_001204194 ///<br>NM_001204196 ///<br>NM_001204199 ///<br>NM_003135           | 0,04785 | 2,86197 |
| RPL14               | ribosomal protein L14   | NM_001034996 ///<br>NM_003973   | 0,03417 | 2,86351 |
| EEF1A1 /// EEF1A1P5 | eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 /// eukaryotic translation elongatio | NM_001402 ///<br>NM_001403 ///<br>XM_011535514  | 0,04520 | 2,89373 |

|                                     |  |  |         |         |
|-------------------------------------|--|--|---------|---------|
| DLGAP1-AS1                          | DLGAP1 antisense RNA 1   | NM_001039796 ///<br>NR_024101  | 0,02020 | 2,93013 |
| NOP58                               | NOP58 ribonucleoprotein  | NM_015934  | 0,01472 | 2,94575 |
| DLGAP5                              | discs, large (Drosophila)<br>homolog-associated protein<br>5                                     | NM_001146015 ///<br>NM_014750 ///<br>XM_011537414 ///<br>XR_943566                                     | 0,00581 | 2,95584 |
| TMEM56                              | transmembrane protein 56   | NM_001199679 ///<br>NM_152487  | 0,03306 | 2,96739 |
| LARP1                               | La ribonucleoprotein domain<br>family, member 1  | NM_015315 ///<br>NM_033551 ///<br>XM_005268404 ///<br>XM_005268406 ///<br>XM_005268407 ///<br>XM_00526 | 0,04224 | 2,98476 |
| RPL21 /// RPL21P119<br>/// RPL21P28 | ribosomal protein L21 ///<br>ribosomal protein L21<br>pseudogene 119 ///<br>ribosomal protein L2 | NM_000982 ///<br>NR_026911   | 0,00036 | 3,00670 |
| NUP153                              | nucleoporin 153kDa   | NM_001278209 ///<br>NM_001278210 ///<br>NM_005124 ///<br>XM_005249507 ///<br>XM_006715290 ///<br>XM_00 | 0,03364 | 3,04930 |
| HSP90AA1                            | heat shock protein 90kDa<br>alpha (cytosolic), class A<br>member 1                               | NM_001017963 ///<br>NM_005348 ///<br>XM_011536718  | 0,00248 | 3,06932 |
| SLC14A1                             | solute carrier family 14 (urea<br>transporter), member 1<br>(Kidd blood group)                   | NM_001128588 ///<br>NM_001146036 ///<br>NM_001146037 ///<br>NM_001308278 ///<br>NM_001308279 /// NM    | 0,01382 | 3,08749 |
| RPL36                               | ribosomal protein L36  | NM_015414 ///<br>NM_033643   | 0,00704 | 3,17274 |
| FOXP1                               | forkhead box P1  | NM_001012505 ///<br>NM_001244808 ///<br>NM_001244810 ///<br>NM_001244812 ///<br>NM_001244813 /// NM    | 0,01862 | 3,20605 |
| RALA                                | v-ral simian leukemia viral<br>oncogene homolog A (ras<br>related)                               | NM_005402 ///<br>XM_006715762 ///<br>XM_011515466 ///<br>XM_011515467                                  | 0,04933 | 3,20766 |
| KLHL42                              | kelch-like family member 42  | NM_020782 ///<br>XM_011520791 ///<br>XR_931314 ///<br>XR_931315  | 0,00998 | 3,22945 |

|                        |   |  |         |         |
|------------------------|---|--|---------|---------|
| TMEM14B ///<br>TMEM14C | transmembrane protein 14B<br>/// transmembrane protein<br>14C | NM_001127711 ///<br>NM_001165258 ///<br>NM_001286484 ///<br>NM_001286488 ///<br>NM_001286489 /// NM    | 0,02282 | 3,23918 |
| CELF1                  | CUGBP, Elav-like family<br>member 1                           | NM_001025596 ///<br>NM_001172639 ///<br>NM_001172640 ///<br>NM_006560 ///<br>NM_198700 ///<br>XM_01151 | 0,04596 | 3,26214 |
| RPL22                  | ribosomal protein L22   | NM_000983  | 0,03865 | 3,32420 |
| RPL13                  | ribosomal protein L13   | NM_000977 ///<br>NM_001243130 ///<br>NM_001243131 ///<br>NM_033251                                     | 0,03210 | 3,32968 |
| SNRPA1                 | small nuclear<br>ribonucleoprotein<br>polypeptide A'          | NM_003090 ///<br>XR_243213   | 0,03768 | 3,33364 |
| CTSB                   | cathepsin B   | NM_001908 ///<br>NM_147780 ///<br>NM_147781 ///<br>NM_147782 ///<br>NM_147783 ///<br>XM_006716244 ///  | 0,01576 | 3,35022 |
| RPL34                  | ribosomal protein L34   | NM_000995 ///<br>NM_033625 ///<br>XM_005263172 ///<br>XM_006714287                                     | 0,00728 | 3,35065 |
| E2F2                   | E2F transcription factor 2                                    | NM_004091 ///<br>XM_005245748 ///<br>XM_005245749 ///<br>XM_011540868 ///<br>XM_011540869 ///<br>XM_01 | 0,02001 | 3,38481 |
| U2SURP                 | U2 snRNP-associated SURP<br>domain containing                 | NM_001080415 ///<br>XM_005247246 ///<br>XM_005247248 ///<br>XM_005247249                               | 0,03500 | 3,42070 |
| TAF1D                  | TATA box binding protein<br>associated factor 1D              | NM_024116  | 0,02862 | 3,43170 |
| SPTA1                  | spectrin, alpha, erythrocytic<br>1                            | NM_003126 ///<br>XM_011509916 ///<br>XM_011509917 ///<br>XM_011509918 ///<br>XM_011509919 ///<br>XR_92 | 0,02412 | 3,44962 |
| CISD2                  | CDGSH iron sulfur domain 2                                    | NM_001008388   | 0,04395 | 3,51417 |
| HBD /// HBD            | hypophosphatemic bone<br>disease /// hemoglobin,<br>delta     | NM_000519  | 0,01113 | 3,57612 |
| RPL37A                 | ribosomal protein L37a  | NM_000998  | 0,01887 | 3,64927 |
| RPL37                  | ribosomal protein L37   | NM_000997  | 0,02327 | 3,73369 |

|              |  |  |         |         |
|--------------|--|--|---------|---------|
| SMC3         | structural maintenance of chromosomes 3                              | NM_005445  | 0,00856 | 3,77158 |
| LUC7L3       | LUC7-like 3 pre-mRNA splicing factor                                 | NM_006107 ///<br>NM_016424 ///<br>XM_005257448 ///<br>XM_005257449 ///<br>XM_005257450 ///<br>XM_00525 | 0,00051 | 3,87887 |
| SNRPG        | small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G                        | NM_003096  | 0,03680 | 3,89190 |
| SLC25A37     | solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37 | NM_016612 ///<br>XM_005273526 ///<br>XM_006716352 ///<br>XM_011544550 ///<br>XM_011544551 ///<br>XM_01 | 0,00151 | 3,90684 |
| HNRNPA2B1    | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1                        | NM_002137 ///<br>NM_031243 ///<br>XM_005249729 ///<br>XM_006715714 ///<br>XR_242076 ///<br>XR_242077 / | 0,02000 | 4,04260 |
| LOC101928429 | uncharacterized LOC101928429   | XR_245608 ///<br>XR_252102   | 0,04100 | 4,04887 |
| PPIB         | peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)                           | NM_000942  | 0,02595 | 4,05575 |
| RRAGD        | Ras-related GTP binding D  | NM_021244 ///<br>XM_005248755 ///<br>XM_011536022  | 0,00713 | 4,19001 |
| FXR1         | fragile X mental retardation, autosomal homolog 1                    | NM_001013438 ///<br>NM_001013439 ///<br>NM_005087 ///<br>XM_005247813 ///<br>XM_005247814 ///<br>XM_00 | 0,01460 | 4,27169 |
| ZC3H15       | zinc finger CCCH-type containing 15                                  | NM_018471 ///<br>XM_011511485  | 0,00395 | 4,27772 |
| RPL10A       | ribosomal protein L10a   | NM_007104  | 0,00604 | 4,37097 |
| HBZ          | hemoglobin, zeta   | NM_005332 ///<br>XM_005255287 ///<br>XM_005255288 ///<br>XM_011522471 ///<br>XM_011522472              | 0,04269 | 4,48132 |
| PSME4        | proteasome activator subunit 4                                       | NM_014614 ///<br>XM_006711969 ///<br>XM_011532705 ///<br>XM_011532706 ///<br>XM_011532707 ///<br>XM_01 | 0,00326 | 4,64386 |

|         |   |  |         |         |
|---------|---|--|---------|---------|
| CPEB2   | cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 | NM_001177381 ///<br>NM_001177382 ///<br>NM_001177383 ///<br>NM_001177384 ///<br>NM_182485 /// NM_18    | 0,03554 | 4,71750 |
| JUND    | jun D proto-oncogene                                  | NM_001286968 ///<br>NM_005354  | 0,00201 | 4,76146 |
| GLTSCR2 | glioma tumor suppressor candidate region gene 2       | NM_015710  | 0,01694 | 4,83773 |
| GYPB    | glycophorin B (MNS blood group)                       | NM_001304382 ///<br>NM_002100 ///<br>XM_011531903 ///<br>XM_011531904 ///<br>XM_011531905              | 0,04287 | 4,91027 |
| PSMA4   | proteasome subunit alpha 4                            | NM_001102667 ///<br>NM_001102668 ///<br>NM_002789  | 0,00172 | 4,92477 |
| PPIG    | peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)            | NM_004792 ///<br>XM_005246966 ///<br>XM_005246967 ///<br>XM_011512192                                  | 0,01099 | 5,10916 |
| RPL32   | ribosomal protein L32                                 | NM_000994 ///<br>NM_001007073 ///<br>NM_001007074  | 0,03238 | 5,34072 |
| RPS17   | ribosomal protein S17                                 | NM_001021 ///<br>NM_001199057 ///<br>NR_111943 ///<br>NR_111944  | 0,04999 | 5,55114 |
| CA1     | carbonic anhydrase I                                  | NM_001128829 ///<br>NM_001128830 ///<br>NM_001128831 ///<br>NM_001164830 ///<br>NM_001291967 /// NM    | 0,02569 | 5,87930 |
| RPS6    | ribosomal protein S6                                  | NM_001010  | 0,02799 | 6,01712 |
| EPB42   | erythrocyte membrane protein band 4.2                 | NM_000119 ///<br>NM_001114134 ///<br>XM_005254225 ///<br>XM_011521349 ///<br>XM_011521350 ///<br>XM_01 | 0,04154 | 6,05272 |
| ALAS2   | 5'-aminolevulinat synthase 2                          | NM_000032 ///<br>NM_001037967 ///<br>NM_001037968 ///<br>NM_001037969 ///<br>XM_005261995 ///<br>XM_01 | 0,00784 | 6,18015 |
| PRR11   | proline rich 11                                       | NM_018304  | 0,02965 | 6,25057 |
| ZFAND5  | zinc finger, AN1-type domain 5                        | NM_001102420 ///<br>NM_001102421 ///<br>NM_001278243 ///<br>NM_001278244 ///<br>NM_001278245 /// NM    | 0,01796 | 6,30045 |

|                               |  |  |         |          |
|-------------------------------|--|--|---------|----------|
| RPL24                         | ribosomal protein L24  | NM_000986  | 0,02146 | 6,34864  |
| RPL5                          | ribosomal protein L5   | NM_000969  | 0,03606 | 6,49773  |
| MYL4                          | myosin light chain 4   | NM_001002841 ///<br>NM_002476 ///<br>XM_005257391 ///<br>XM_011524838 ///<br>XM_011524839              | 0,03116 | 7,43575  |
| SLC4A1                        | solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1 (Diego blood group)                      | NM_000342 ///<br>XM_005257593 ///<br>XM_011525129 ///<br>XM_011525130 ///<br>XM_011525131              | 0,02475 | 9,25011  |
| HBG2                          | hemoglobin, gamma G  | NM_000184  | 0,02365 | 9,33105  |
| HBG1 /// HBG2                 | hemoglobin, gamma A ///<br>hemoglobin, gamma G   | NM_000184 ///<br>NM_000559   | 0,02651 | 9,81357  |
| ATP1B1                        | ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide                     | NM_001001787 ///<br>NM_001677  | 0,04064 | 10,51920 |
| AHSP                          | alpha hemoglobin stabilizing protein   | NM_016633 ///<br>XM_005255351 ///<br>XM_005255352  | 0,00920 | 10,92810 |
| DEFA1 /// DEFA1B ///<br>DEFA3 | defensin, alpha 1 ///<br>defensin, alpha 1B ///<br>defensin, alpha 3,<br>neutrophil-specific | NM_001042500 ///<br>NM_001302265 ///<br>NM_004084 ///<br>NM_005217 ///<br>XM_011534740 ///<br>XM_01153 | 0,03055 | 12,57490 |
| BPGM                          | 2,3-bisphosphoglycerate mutase   | NM_001293085 ///<br>NM_001724 ///<br>NM_199186 ///<br>XM_011516527                                     | 0,04063 | 14,22010 |
| HBM                           | hemoglobin, mu   | NM_001003938   | 0,01353 | 19,73360 |
| PRDX2                         | peroxiredoxin 2  | NM_005809 ///<br>NM_181737 ///<br>NM_181738  | 0,00636 | 22,58940 |
| TFRC                          | transferrin receptor   | NM_001128148 ///<br>NM_001313965 ///<br>NM_001313966 ///<br>NM_003234 ///<br>XM_011513112              | 0,01541 | 35,32060 |

**Tabla Suplementaria 5 | Análisis de enriquecimiento génico empleando la lista de genes diferencialmente expresados entre plaquetas de adulto y de neonato.** Los genes altamente expresados en reticulocitos fueron eliminados. Se tomó como significativo  $p < 0,001$

| ID | GO biological process complete  | # Genes de Referencia | # Genes Esperados | # Genes Observados | Enriquecimiento | $p$ -valor |
|----|---|-----------------------|-------------------|--------------------|-----------------|------------|
| 1  | <b>SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane (GO:0006614)</b> | 95                    | 21                | 0,82               | 25,47           | 4,15E-19   |
| 2  | cotranslational protein targeting to membrane                                   | 103                   | 21                | 0,89               | 23,49           | 2,14E-18   |
| 3  | protein targeting to membrane   | 163                   | 22                | 1,41               | 15,55           | 1,21E-15   |
| 4  | protein targeting   | 421                   | 26                | 3,65               | 7,12            | 6,34E-11   |
| 5  | intracellular protein transport   | 712                   | 29                | 6,18               | 4,69            | 4,65E-08   |
| 6  | cellular protein localization   | 1190                  | 35                | 10,33              | 3,39            | 1,81E-06   |
| 7  | protein localization  | 1760                  | 40                | 15,27              | 2,62            | 1,27E-04   |
| 8  | macromolecule localization  | 2111                  | 44                | 18,32              | 2,4             | 2,59E-04   |
| 9  | cellular macromolecule localization   | 1200                  | 35                | 10,41              | 3,36            | 2,26E-06   |
| 10 | cellular localization   | 1924                  | 45                | 16,7               | 2,7             | 4,98E-06   |
| 11 | intracellular transport   | 1206                  | 36                | 10,47              | 3,44            | 6,37E-07   |
| 12 | establishment of localization in cell   | 1474                  | 38                | 12,79              | 2,97            | 1,08E-05   |
| 13 | protein transport   | 1238                  | 33                | 10,74              | 3,07            | 7,22E-05   |
| 14 | establishment of protein localization   | 1363                  | 34                | 11,83              | 2,87            | 2,09E-04   |
| 15 | single-organism intracellular transport   | 497                   | 31                | 4,31               | 7,19            | 9,49E-14   |
| 16 | single-organism transport   | 2069                  | 45                | 17,96              | 2,51            | 4,77E-05   |
| 17 | single-organism localization  | 2286                  | 49                | 19,84              | 2,47            | 1,29E-05   |
| 18 | single-organism cellular localization   | 821                   | 33                | 7,12               | 4,63            | 1,87E-09   |
| 19 | establishment of protein localization to membrane                               | 271                   | 25                | 2,35               | 10,63           | 2,54E-14   |
| 20 | protein localization to membrane  | 382                   | 25                | 3,32               | 7,54            | 6,03E-11   |
| 21 | single-organism membrane organization   | 747                   | 29                | 6,48               | 4,47            | 1,45E-07   |
| 22 | membrane organization   | 910                   | 30                | 7,9                | 3,8             | 3,11E-06   |

|    |  |      |     |       |       |          |
|----|--|------|-----|-------|-------|----------|
| 23 | <b>protein targeting to ER (GO:0045047)</b>                    | 101  | 21  | 0,88  | 23,96 | 1,44E-18 |
| 24 | establishment of protein localization to endoplasmic reticulum | 105  | 21  | 0,91  | 23,05 | 3,16E-18 |
| 25 | establishment of protein localization to organelle             | 372  | 25  | 3,23  | 7,74  | 3,34E-11 |
| 26 | protein localization to organelle                              | 572  | 28  | 4,96  | 5,64  | 1,51E-09 |
| 27 | protein localization to endoplasmic reticulum                  | 125  | 22  | 1,08  | 20,28 | 4,64E-18 |
| 28 | <b>viral transcription (GO:0019083)</b>                        | 115  | 22  | 1     | 22,04 | 7,98E-19 |
| 29 | viral gene expression  | 126  | 22  | 1,09  | 20,12 | 5,49E-18 |
| 30 | viral process  | 822  | 35  | 7,13  | 4,91  | 5,88E-11 |
| 31 | symbiosis, encompassing mutualism through parasitism           | 863  | 37  | 7,49  | 4,94  | 7,08E-12 |
| 32 | interspecies interaction between organisms                     | 863  | 37  | 7,49  | 4,94  | 7,08E-12 |
| 33 | multi-organism cellular process                                | 825  | 35  | 7,16  | 4,89  | 6,54E-11 |
| 34 | gene expression  | 3770 | 69  | 32,72 | 2,11  | 1,54E-06 |
| 35 | macromolecule metabolic process                                | 7412 | 105 | 64,32 | 1,63  | 5,50E-06 |
| 36 | organic substance metabolic process                            | 9089 | 118 | 78,88 | 1,5   | 3,51E-05 |
| 37 | metabolic process  | 9497 | 121 | 82,42 | 1,47  | 5,49E-05 |
| 38 | multi-organism metabolic process                               | 138  | 22  | 1,2   | 18,37 | 3,72E-17 |
| 39 | viral life cycle   | 292  | 25  | 2,53  | 9,87  | 1,41E-13 |
| 40 | RNA metabolic process  | 3446 | 61  | 29,91 | 2,04  | 1,12E-04 |
| 41 | cellular macromolecule metabolic process                       | 6729 | 101 | 58,4  | 1,73  | 5,27E-07 |
| 42 | cellular metabolic process                                     | 8580 | 115 | 74,46 | 1,54  | 9,43E-06 |
| 43 | nucleic acid metabolic process                                 | 3961 | 68  | 34,37 | 1,98  | 3,59E-05 |
| 44 | nucleobase-containing compound metabolic process               | 4509 | 74  | 39,13 | 1,89  | 3,55E-05 |
| 45 | organic cyclic compound metabolic process                      | 4882 | 78  | 42,37 | 1,84  | 3,44E-05 |
| 46 | cellular nitrogen compound metabolic process                   | 5131 | 87  | 44,53 | 1,95  | 6,41E-08 |
| 47 | nitrogen compound metabolic process                            | 5609 | 90  | 48,68 | 1,85  | 4,78E-07 |
| 48 | heterocycle metabolic process                                  | 4646 | 77  | 40,32 | 1,91  | 8,34E-06 |

|    |   |      |     |       |       |          |
|----|---|------|-----|-------|-------|----------|
| 49 | cellular aromatic compound metabolic process  | 4695 | 78  | 40,74 | 1,91  | 5,27E-06 |
| 50 | primary metabolic process   | 8643 | 112 | 75,01 | 1,49  | 2,15E-04 |
| 51 | cellular nitrogen compound biosynthetic process   | 3508 | 63  | 30,44 | 2,07  | 3,19E-05 |
| 52 | macromolecule biosynthetic process  | 3714 | 62  | 32,23 | 1,92  | 7,31E-04 |
| 53 | <b>nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay (GO:0000184)</b> | 119  | 20  | 1,03  | 19,37 | 8,98E-16 |
| 54 | nuclear-transcribed mRNA catabolic process  | 193  | 20  | 1,67  | 11,94 | 8,24E-12 |
| 55 | mRNA catabolic process  | 205  | 20  | 1,78  | 11,24 | 2,52E-11 |
| 56 | RNA catabolic process   | 231  | 20  | 2     | 9,98  | 2,27E-10 |
| 57 | nucleobase-containing compound catabolic process  | 345  | 21  | 2,99  | 7,01  | 3,80E-08 |
| 58 | aromatic compound catabolic process   | 387  | 21  | 3,36  | 6,25  | 3,11E-07 |
| 59 | cellular catabolic process  | 1358 | 38  | 11,79 | 3,22  | 1,09E-06 |
| 60 | catabolic process   | 1673 | 38  | 14,52 | 2,62  | 3,20E-04 |
| 61 | cellular nitrogen compound catabolic process  | 380  | 21  | 3,3   | 6,37  | 2,23E-07 |
| 62 | organic cyclic compound catabolic process   | 408  | 21  | 3,54  | 5,93  | 8,07E-07 |
| 63 | organic substance catabolic process   | 1572 | 38  | 13,64 | 2,79  | 6,19E-05 |
| 64 | heterocycle catabolic process   | 374  | 21  | 3,25  | 6,47  | 1,67E-07 |
| 65 | cellular macromolecule catabolic process  | 815  | 35  | 7,07  | 4,95  | 4,58E-11 |
| 66 | macromolecule catabolic process   | 951  | 35  | 8,25  | 4,24  | 3,89E-09 |
| 67 | mRNA metabolic process  | 621  | 32  | 5,39  | 5,94  | 5,59E-12 |
| 68 | <b>translational initiation (GO:0006413)</b>  | 153  | 24  | 1,33  | 18,08 | 7,99E-19 |
| 69 | translation   | 450  | 32  | 3,91  | 8,19  | 6,28E-16 |
| 70 | cellular protein metabolic process  | 3511 | 69  | 30,47 | 2,26  | 5,87E-08 |
| 71 | protein metabolic process   | 4068 | 72  | 35,3  | 2,04  | 2,25E-06 |
| 72 | peptide biosynthetic process  | 473  | 32  | 4,1   | 7,8   | 2,63E-15 |
| 73 | peptide metabolic process   | 615  | 34  | 5,34  | 6,37  | 7,69E-14 |

|    |  |      |    |       |      |          |
|----|--|------|----|-------|------|----------|
| 74 | organonitrogen compound metabolic process    | 1822 | 46 | 15,81 | 2,91 | 2,44E-07 |
| 75 | cellular amide metabolic process             | 743  | 34 | 6,45  | 5,27 | 1,93E-11 |
| 76 | organonitrogen compound biosynthetic process | 1050 | 37 | 9,11  | 4,06 | 2,71E-09 |
| 77 | amide biosynthetic process                   | 532  | 32 | 4,62  | 6,93 | 7,45E-14 |
| 78 | <b>rRNA processing (GO:0006364)</b>          | 258  | 20 | 2,24  | 8,93 | 1,69E-09 |
| 79 | ribosome biogenesis                          | 321  | 20 | 2,79  | 7,18 | 8,38E-08 |
| 80 | ribonucleoprotein complex biogenesis         | 459  | 25 | 3,98  | 6,28 | 3,39E-09 |
| 81 | rRNA metabolic process                       | 264  | 20 | 2,29  | 8,73 | 2,56E-09 |
| 82 | ncRNA metabolic process                      | 554  | 24 | 4,81  | 4,99 | 1,10E-06 |
| 83 | ncRNA processing                             | 404  | 21 | 3,51  | 5,99 | 6,76E-07 |
| 84 | RNA processing                               | 860  | 35 | 7,46  | 4,69 | 2,19E-10 |



## ***ANEXO II***

---



**Tabla Suplementaria 1| miRNA sobreexpresados en plaquetas de neonatos (N) en comparación con adultos (A)**

| <b>Nombre miRNA</b> | <b>Fold Change (N vs. A)</b> | <b>Intensidad de Señal A</b> | <b>Intensidad de Señal N</b> |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| hsa-miR-1323        | 12528,281                    | 0                            | 95                           |
| hsa-miR-519a-3p     | 9832,151                     | 0                            | 75                           |
| hsa-miR-517a-3p     | 213,950                      | 2                            | 398                          |
| hsa-miR-520h        | 158,348                      | 0                            | 37                           |
| hsa-miR-518d-5p     | 157,236                      | 0                            | 62                           |
| hsa-miR-516b-5p     | 140,681                      | 1                            | 86                           |
| hsa-miR-522-3p      | 131,393                      | 0                            | 21                           |
| hsa-miR-5739        | 109,331                      | 1                            | 112                          |
| hsa-miR-302a-5p     | 52,635                       | 0                            | 25                           |
| hsa-miR-3690        | 44,772                       | 1                            | 60                           |
| hsa-miR-675-5p      | 27,632                       | 1                            | 22                           |
| hsa-miR-518f-5p     | 23,236                       | 3                            | 60                           |
| hsa-miR-516a-5p     | 22,349                       | 3                            | 71                           |
| hsa-miR-203a        | 13,868                       | 2                            | 32                           |
| hsa-miR-1180        | 9,219                        | 3                            | 28                           |
| hsa-miR-505-3p      | 7,621                        | 244                          | 1857                         |
| hsa-miR-1246        | 7,058                        | 5                            | 38                           |
| hsa-miR-1469        | 6,797                        | 7                            | 45                           |
| hsa-miR-1273d       | 6,415                        | 5                            | 33                           |
| hsa-miR-337-5p      | 6,234                        | 722                          | 4502                         |
| hsa-miR-3178        | 6,222                        | 40                           | 247                          |
| hsa-miR-379-3p      | 6,172                        | 478                          | 2952                         |
| hsa-miR-656         | 6,123                        | 12                           | 74                           |
| hsa-miR-655         | 6,037                        | 37                           | 222                          |
| hsa-miR-452-5p      | 5,996                        | 155                          | 928                          |
| hsa-miR-612         | 5,844                        | 6                            | 37                           |
| hsa-miR-889         | 5,787                        | 239                          | 1385                         |
| hsa-miR-424-3p      | 5,572                        | 57                           | 320                          |
| hsa-miR-539-3p      | 5,540                        | 474                          | 2624                         |
| hsa-miR-369-3p      | 5,348                        | 797                          | 4261                         |
| hsa-miR-5588-3p     | 5,333                        | 24                           | 130                          |
| hsa-miR-1185-5p     | 5,234                        | 11                           | 58                           |
| hsa-miR-323b-3p     | 5,216                        | 1060                         | 5530                         |
| hsa-miR-4539        | 5,190                        | 4                            | 23                           |
| hsa-miR-1227-3p     | 4,764                        | 4                            | 19                           |
| hsa-miR-4732-3p     | 4,685                        | 7                            | 32                           |
| hsa-miR-224-3p      | 4,612                        | 72                           | 333                          |
| hsa-miR-409-5p      | 4,537                        | 645                          | 2927                         |
| hsa-miR-432-5p      | 4,537                        | 1136                         | 5156                         |
| hsa-miR-654-5p      | 4,510                        | 192                          | 867                          |

|                   |       |      |       |
|-------------------|-------|------|-------|
| hsa-miR-6127      | 4,479 | 4    | 19    |
| hsa-miR-380-3p    | 4,177 | 117  | 487   |
| hsa-miR-223-5p    | 3,987 | 83   | 330   |
| hsa-miR-210       | 3,881 | 294  | 1141  |
| hsa-miR-433       | 3,849 | 827  | 3183  |
| hsa-miR-485-5p    | 3,819 | 302  | 1152  |
| hsa-miR-144-3p    | 3,814 | 295  | 1123  |
| hsa-miR-296-5p    | 3,698 | 12   | 46    |
| hsa-miR-495-5p    | 3,683 | 56   | 208   |
| hsa-miR-297       | 3,651 | 6    | 21    |
| hsa-miR-380-5p    | 3,649 | 11   | 40    |
| hsa-miR-323a-3p   | 3,648 | 491  | 1792  |
| hsa-miR-382-3p    | 3,587 | 333  | 1193  |
| hsa-miR-370       | 3,572 | 503  | 1798  |
| hsa-let-7a-3p     | 3,440 | 8    | 28    |
| hsa-miR-376a-2-5p | 3,388 | 57   | 193   |
| hsa-miR-4279      | 3,377 | 10   | 33    |
| hsa-miR-566       | 3,376 | 6    | 19    |
| hsa-miR-411-3p    | 3,362 | 1218 | 4096  |
| hsa-miR-369-5p    | 3,319 | 241  | 801   |
| hsa-miR-337-3p    | 3,279 | 2233 | 7320  |
| hsa-miR-5010-3p   | 3,258 | 36   | 119   |
| hsa-miR-377-5p    | 3,210 | 166  | 532   |
| hsa-miR-382-5p    | 3,188 | 1666 | 5312  |
| hsa-miR-224-5p    | 3,178 | 3360 | 10677 |
| hsa-miR-376c-5p   | 3,114 | 261  | 812   |
| hsa-miR-4419b     | 3,077 | 18   | 57    |
| hsa-miR-299-5p    | 2,981 | 361  | 1075  |
| hsa-miR-3195      | 2,965 | 55   | 164   |
| hsa-miR-30a-3p    | 2,947 | 91   | 269   |
| hsa-miR-3196      | 2,945 | 155  | 455   |
| hsa-miR-450b-5p   | 2,927 | 13   | 39    |
| hsa-miR-410       | 2,865 | 1174 | 3364  |
| hsa-miR-4516      | 2,846 | 111  | 317   |
| hsa-miR-568       | 2,834 | 46   | 130   |
| hsa-miR-493-5p    | 2,831 | 3551 | 10053 |
| hsa-miR-376b-5p   | 2,823 | 319  | 900   |
| hsa-miR-668       | 2,817 | 106  | 299   |
| hsa-miR-431-5p    | 2,732 | 1904 | 5203  |
| hsa-miR-127-5p    | 2,681 | 30   | 80    |
| hsa-miR-4500      | 2,677 | 70   | 187   |
| hsa-miR-6506-3p   | 2,650 | 9    | 24    |
| hsa-miR-539-5p    | 2,643 | 2251 | 5949  |
| hsa-miR-411-5p    | 2,607 | 648  | 1689  |
| hsa-miR-376a-3p   | 2,586 | 2393 | 6188  |

|                 |       |       |       |
|-----------------|-------|-------|-------|
| hsa-miR-4532    | 2,555 | 17    | 42    |
| hsa-miR-758-5p  | 2,547 | 15    | 37    |
| hsa-miR-4778-5p | 2,532 | 57    | 143   |
| hsa-miR-770-5p  | 2,527 | 13    | 33    |
| hsa-miR-381-5p  | 2,507 | 105   | 262   |
| hsa-miR-483-5p  | 2,507 | 30    | 74    |
| hsa-miR-1255a   | 2,506 | 38    | 95    |
| hsa-let-7f-5p   | 2,502 | 19902 | 49786 |
| hsa-miR-485-3p  | 2,496 | 3035  | 7576  |
| hsa-miR-625-3p  | 2,481 | 309   | 766   |
| hsa-miR-374c-3p | 2,457 | 10    | 26    |
| hsa-miR-4687-3p | 2,454 | 54    | 132   |
| hsa-miR-431-3p  | 2,444 | 15    | 37    |
| hsa-miR-376a-5p | 2,437 | 623   | 1517  |
| hsa-miR-299-3p  | 2,434 | 100   | 244   |
| hsa-miR-503-5p  | 2,426 | 123   | 297   |
| hsa-miR-6722-3p | 2,414 | 16    | 38    |
| hsa-miR-409-3p  | 2,347 | 517   | 1213  |
| hsa-miR-149-3p  | 2,334 | 32    | 76    |
| hsa-miR-3129-3p | 2,301 | 14    | 31    |
| hsa-miR-30e-5p  | 2,262 | 8737  | 19766 |
| hsa-miR-641     | 2,261 | 126   | 285   |
| hsa-miR-424-5p  | 2,260 | 629   | 1422  |
| hsa-miR-379-5p  | 2,230 | 2804  | 6254  |
| hsa-let-7a-5p   | 2,178 | 20743 | 45181 |
| hsa-miR-136-3p  | 2,170 | 208   | 451   |
| hsa-miR-376c-3p | 2,147 | 15260 | 32765 |
| hsa-let-7f-1-3p | 2,132 | 16    | 35    |
| hsa-miR-98-3p   | 2,118 | 24    | 51    |
| hsa-miR-1234-3p | 2,099 | 62    | 130   |
| hsa-miR-496     | 2,067 | 743   | 1536  |
| hsa-miR-92b-3p  | 2,043 | 8008  | 16364 |
| hsa-miR-486-5p  | 2,034 | 5753  | 11701 |

**Tabla Suplementaria 2| miRNA infraexpresados en plaquetas de neonatos (N) en comparación con adultos (A)**

| <b>Nombre miRNA</b> | <b>Fold Change (N vs. A)</b> | <b>Intensidad de Señal A</b> | <b>Intensidad de Señal N</b> |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| hsa-miR-1299        | -2239,470                    | 29                           | 0                            |
| hsa-miR-551b-3p     | -24,452                      | 546                          | 22                           |
| hsa-miR-133a        | -12,917                      | 1254                         | 97                           |
| hsa-miR-1           | -12,163                      | 2144                         | 176                          |
| hsa-miR-133b        | -10,922                      | 1041                         | 95                           |
| hsa-miR-98-5p       | -10,651                      | 13511                        | 1269                         |
| hsa-miR-181c-3p     | -10,530                      | 228                          | 22                           |
| hsa-miR-5586-3p     | -8,368                       | 39                           | 5                            |
| hsa-miR-29b-2-5p    | -6,621                       | 261                          | 39                           |
| hsa-miR-29c-3p      | -6,325                       | 2891                         | 457                          |
| hsa-miR-605         | -5,795                       | 76                           | 13                           |
| hsa-miR-181a-3p     | -4,873                       | 292                          | 60                           |
| hsa-miR-30d-3p      | -4,867                       | 36                           | 7                            |
| hsa-miR-497-5p      | -4,817                       | 269                          | 56                           |
| hsa-miR-17-3p       | -4,808                       | 1197                         | 249                          |
| hsa-miR-27b-5p      | -4,656                       | 229                          | 49                           |
| hsa-miR-5586-5p     | -4,593                       | 50                           | 11                           |
| hsa-miR-548w        | -4,110                       | 998                          | 243                          |
| hsa-miR-204-5p      | -3,998                       | 67                           | 17                           |
| hsa-miR-1537        | -3,895                       | 48                           | 12                           |
| hsa-miR-3177-3p     | -3,771                       | 42                           | 11                           |
| hsa-miR-29c-5p      | -3,578                       | 656                          | 183                          |
| hsa-miR-940         | -3,422                       | 90                           | 26                           |
| hsa-miR-34a-5p      | -3,405                       | 196                          | 58                           |
| hsa-miR-744-3p      | -3,403                       | 123                          | 36                           |
| hsa-miR-1307-5p     | -3,398                       | 141                          | 41                           |
| hsa-miR-1273g-3p    | -3,371                       | 17545                        | 5205                         |
| hsa-miR-345-5p      | -3,343                       | 1686                         | 504                          |
| hsa-miR-6088        | -3,318                       | 705                          | 213                          |
| hsa-miR-3667-3p     | -3,222                       | 41                           | 13                           |
| hsa-miR-589-3p      | -3,140                       | 118                          | 37                           |
| hsa-miR-3615        | -3,075                       | 599                          | 195                          |
| hsa-miR-769-5p      | -3,017                       | 499                          | 165                          |
| hsa-miR-29a-5p      | -2,976                       | 94                           | 32                           |
| hsa-miR-548a-5p     | -2,916                       | 147                          | 50                           |
| hsa-miR-141-3p      | -2,856                       | 52                           | 18                           |
| hsa-miR-1281        | -2,742                       | 59                           | 21                           |
| hsa-miR-182-5p      | -2,738                       | 2581                         | 943                          |
| hsa-miR-491-5p      | -2,702                       | 153                          | 56                           |
| hsa-miR-22-3p       | -2,702                       | 15975                        | 5913                         |

|                   |        |       |       |
|-------------------|--------|-------|-------|
| hsa-miR-6513-5p   | -2,700 | 54    | 20    |
| hsa-miR-502-3p    | -2,691 | 333   | 124   |
| hsa-miR-1287      | -2,672 | 154   | 58    |
| hsa-miR-3667-5p   | -2,654 | 64    | 24    |
| hsa-miR-766-5p    | -2,642 | 100   | 38    |
| hsa-miR-361-3p    | -2,641 | 778   | 295   |
| hsa-miR-200a-3p   | -2,627 | 135   | 52    |
| hsa-miR-29a-3p    | -2,612 | 6672  | 2555  |
| hsa-miR-339-5p    | -2,596 | 1363  | 525   |
| hsa-let-7f-2-3p   | -2,538 | 119   | 47    |
| hsa-miR-4485      | -2,513 | 1543  | 614   |
| hsa-miR-502-5p    | -2,509 | 68    | 27    |
| hsa-miR-652-5p    | -2,485 | 518   | 208   |
| hsa-miR-20a-5p    | -2,456 | 22310 | 9084  |
| hsa-miR-744-5p    | -2,423 | 2931  | 1210  |
| hsa-miR-590-5p    | -2,413 | 488   | 202   |
| hsa-miR-93-5p     | -2,390 | 14880 | 6226  |
| hsa-miR-10a-5p    | -2,375 | 2678  | 1128  |
| hsa-miR-18a-5p    | -2,335 | 4103  | 1757  |
| hsa-miR-550a-5p   | -2,310 | 48    | 21    |
| hsa-miR-23a-5p    | -2,276 | 103   | 45    |
| hsa-miR-500a-3p   | -2,274 | 515   | 227   |
| hsa-let-7a-2-3p   | -2,266 | 33    | 15    |
| hsa-miR-103a-2-5p | -2,205 | 1236  | 560   |
| hsa-miR-24-2-5p   | -2,197 | 2228  | 1014  |
| hsa-miR-550b-3p   | -2,192 | 60    | 27    |
| hsa-miR-412       | -2,185 | 36    | 16    |
| hsa-miR-3617-5p   | -2,184 | 241   | 111   |
| hsa-miR-627       | -2,166 | 130   | 60    |
| hsa-miR-10b-5p    | -2,164 | 798   | 369   |
| hsa-miR-664a-5p   | -2,143 | 508   | 237   |
| hsa-miR-33a-5p    | -2,127 | 69    | 32    |
| hsa-miR-27a-3p    | -2,123 | 9106  | 4289  |
| hsa-miR-3928      | -2,085 | 35    | 17    |
| hsa-miR-6132      | -2,063 | 26    | 12    |
| hsa-miR-5096      | -2,042 | 277   | 136   |
| hsa-miR-151a-5p   | -2,019 | 29652 | 14683 |
| hsa-miR-101-3p    | -2,018 | 2854  | 1414  |
| hsa-miR-20a-3p    | -2,016 | 447   | 222   |
| hsa-miR-28-5p     | -2,016 | 6359  | 3154  |
| hsa-miR-339-3p    | -2,011 | 670   | 333   |
| hsa-miR-151a-3p   | -2,003 | 12715 | 6347  |

**Tabla Suplementaria 3 | Rutas en las que están implicados los miRNA más diferentemente expresados (sobre- e infraexpresados) entre plaquetas de adulto y neonato**

| Nombre de la Ruta   | TERM ID      | Número Total de Genes de la ruta | Genes Diana en la ruta | miRNA potencialmente implicados en la regulación de la ruta | Score |
|---|--------------|----------------------------------|------------------------|---|-------|
| Biología del desarrollo   | REACT_111045 | 494                              | 294                    | 97  | 1,544 |
| Hemostasia  | REACT_604    | 467                              | 273                    | 97  | 0,971 |
| Transporte transmembrana de moléculas pequeñas                                      | REACT_15518  | 427                              | 221                    | 97  | 0,667 |
| Guía axonal   | REACT_18266  | 266                              | 198                    | 95  | 1,600 |
| Sistema neuronal  | REACT_13685  | 289                              | 172                    | 94  | 0,857 |
| Sistema inmune adaptativo   | REACT_75774  | 482                              | 219                    | 93  | 0,599 |
| Ciclo celular mitótico  | REACT_152    | 330                              | 145                    | 93  | 0,512 |
| Transmisión a través de sinápsis químicas   | REACT_13477  | 190                              | 120                    | 92  | 0,81  |
| Transporte transmembrana mediado por slc  | REACT_19118  | 250                              | 129                    | 92  | 0,509 |
| Sistema inmune innato   | REACT_6802   | 262                              | 95                     | 91  | 0,465 |
| Señalización por NGF  | REACT_11061  | 221                              | 156                    | 89  | 1,044 |
| Activación plaquetaria, señalización y agregación                                   | REACT_798    | 205                              | 129                    | 89  | 0,642 |
| Presentación de antígeno mediada por CMH clase I                                    | REACT_75820  | 251                              | 133                    | 89  | 0,577 |
| Unión a receptor de neurotransmisor y transducción de señal en célula postsináptica | REACT_15370  | 136                              | 81                     | 89  | 0,554 |
| Interacciones L1CAM   | REACT_22205  | 94                               | 76                     | 88  | 1,076 |
| Degradación vía ubiquitina-proteasoma   | REACT_75842  | 213                              | 116                    | 88  | 0,578 |
| Metabolismo de RNA  | REACT_21257  | 264                              | 95                     | 88  | 0,42  |
| Ruta de transcripción genérica  | REACT_12627  | 244                              | 88                     | 88  | 0,408 |
| Replicación de DNA  | REACT_383    | 200                              | 79                     | 88  | 0,382 |

|  |             |     |     |    |       |
|--|-------------|-----|-----|----|-------|
| Señalización NGF via TRKA desde la membrana plasmática                             | REACT_12056 | 136 | 100 | 87 | 0,934 |
| Fases mitóticas M-M G1   | REACT_21300 | 178 | 73  | 87 | 0,369 |
| Unión GPCR-ligando   | REACT_21340 | 410 | 157 | 86 | 0,403 |
| Señalización por PDGF  | REACT_16888 | 122 | 87  | 85 | 0,796 |
| Señalización por citoquinas en el sistema immune                                   | React_75790 | 220 | 103 | 85 | 0,533 |
| Metabolismo de mRNA  | REACT_20605 | 218 | 71  | 85 | 0,399 |
| Formación y maduración de transcritos de mRNA                                      | REACT_2039  | 185 | 92  | 85 | 0,385 |
| Metabolismo de proteínas   | React_17015 | 296 | 101 | 85 | 0,383 |
| Procesamiento de mRNA  | React_1675  | 157 | 77  | 85 | 0,364 |
| Factores implicados en el desarrollo del megacariocito y en producción plaquetaria | React_24970 | 125 | 73  | 84 | 0,523 |
| Transporte a membrana  | React_11123 | 133 | 83  | 84 | 0,492 |

**Tabla Suplementaria 4 | Genes diana seleccionados y función en plaquetas**

| Gen (Símbolo)  | Gen (Nombre)  | Función de la correspondiente proteína en plaquetas  | Referencia  |
|----------------|---|--|---|
| <i>ADRA2A</i>  | Adrenergic Receptor $\alpha$ 2A                                     | Internaliza la señal del agonista plaquetario epinefrina   | Pozgajová M et al, <i>Blood</i> , 2006;108(2):510-4 |
| <i>GNAZ</i>    | Guanine Nucleotide Binding Protein (G protein), alpha z Polypeptide | Implicada en la transducción de señal aguas abajo de los receptores adrenérgicos $\alpha$ 2A                             | Pozgajová M et al, <i>Blood</i> , 2006;108(2):510-4 |
| <i>RANBP10</i> | RAN Binding Protein 10  | Proteína citosólica de unión a tubulina $\beta$ 1 que modula la formación de microtúbulos en megacariocitos y plaquetas, | Kunert S et al, <i>Blood</i> 2009;114:5532-40,      |
| <i>STX11</i>   | Syntaxin 11   | Integrante del complejo SNARE involucrado en la secreción granular plaquetaria   | Ye S et al, <i>Blood</i> 2012;120:2484-92,          |

# ***APÉNDICE I***

---

*Producción científica derivada de la Tesis*



## **1. ARTÍCULOS POR ORDEN CRONOLÓGICO**

- I.* DOWNREGULATION OF MUNC18B-SYNTAXIN-11 COMPLEX AND  $\beta$ 1-TUBULIN IMPAIR SECRETION AND SPREADING IN NEONATAL PLATELETS. **E Caparrós-Pérez**, R Teruel-Montoya, JM. Torregrosa, JE. Blanco, JL. Delgado, ML. Lozano, V Vicente, M Sola-Visner, J Rivera, C Martínez, F Ferrer-Marín. **(ENVIADO)**
- II.* A COMPREHENSIVE COMPARISON OF NEONATE AND ADULT HUMAN PLATELETS TRANSCRIPTOME REVEALS IMMUNE RELATED COMMON HIGH EXPRESSED GENES AND DIFFERENTIAL RIBOSOMAL AND TRANSLATION RELATED GENE PROFILE. **E Caparrós-Pérez**, R Teruel-Montoya, JM. Torregrosa, JE. Blanco, JL. Delgado, ML. Lozano, V Vicente, M Sola-Visner, J Rivera, C Martínez, F Ferrer-Marín. **(ENVIADO)**

## **2. COMUNICACIONES A CONGRESO POR ORDEN CRONOLÓGICO**

- I.*  $\beta$ 1-TUBULIN DIFFERENTIAL EXPRESSION MAY CONTRIBUTE TO THE REDUCED ADHESIVE FUNCTIONALITY OF NEONATAL PLATELETS. **E Caparrós-Pérez**; JM Torregrosa; JE Blanco; MC Llanos; JV Sánchez; V Vicente; J Rivera; F Ferrer-Marín; C Martínez. European Congress of Thrombosis and Haemostasis (ECTH). La Haya, Holanda. 28/09/2016- 30/09/2016
- II.* LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE TUBULINA- $\beta$ 1 PODRÍA CONTRIBUIR A LA MENOR CAPACIDAD ADHESIVA DE LAS PLAQUETAS DE NEONATO. **E Caparrós-Pérez**; JM Torregrosa; JE Blanco; MC Llanos; JV Sánchez; V Vicente; J Rivera; F Ferrer-Marín; C Martínez. LVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Valencia, Comunidad Valenciana, España. 20/10/2015- 24/10/2015
- III.* ROLE OF G-PROTEINS AND SYNTAXIN-11 IN THE DIFFERENCES OF PLATELET REACTIVITY AND SECRETION BETWEEN NEONATES AND ADULTS. **E Caparrós-Pérez**, JM Torregrosa,

- R Teruel-Montoya, JE Blanco, J Rivera, V Vicente, C Martínez, F Ferrer-Marín. XXV Congreso ISTH. Toronto, Canadá. 20/06/2015-25/06/2015.
- IV. FUNCIONALIDAD PLAQUETARIA Y HEMOSTASIA EN EL PERIODO NEONATAL: MECANISMOS REGULADORES Y POTENCIALES IMPLICACIONES CLÍNICAS F Ferrer-Marín; **E Caparrós-Pérez**; JM Torregrosa; J Rivera. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Madrid, España. 06/11/2014-08/11/2014.
- V. LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS G CONTRIBUYE A LA DISTINTA REACTIVIDAD DE LAS PLAQUETAS DE NEONATO Y DE ADULTO A DIFERENTES AGONISTAS. **E Caparrós-Pérez**; R Teruel-Montoya; JL Delgado; JM Torregrosa; JE Blanco; V Vicente; J Rivera; C Martínez; F Ferrer-Marín. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Madrid, España. 06/11/2014-08/11/2014.
- VI. LAS RUTAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO PROTEICO ESTÁN DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS ENTRE PLAQUETAS DE NEONATO Y DE ADULTO. **E Caparrós-Pérez**; R Teruel-Montoya; JL Delgado; MC Llanos; JM Torregrosa; J Rivera; V Vicente; C Martínez; F Ferrer-Marín. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Madrid, España. 06/11/2014-08/11/2014.
- VII. GENE EXPRESSION DIFFERENCES BETWEEN NEONATAL AND ADULT PLATELETS: NEW POTENTIAL MODULATORS OF HUMAN PLATELET REACTIVITY. **E Caparrós-Pérez**; R Teruel-Montoya; JM Torregrosa; JL Delgado; MC Llanos; J Rivera; R González-Conejero; V Vicente; C Martínez; F Ferrer-Marín. 23rd Biennial International Congress on Thrombosis. Valencia, España. 14/05/2014-17/05/2014.

- VIII. ROLE OF SYNTAXIN-11 IN GRANULE RELEASE OF NEONATAL PLATELETS. **E Caparrós-Pérez**; R Teruel-Montoya; JL Delgado; JM Torregrosa; F Navarro; N Montoya; J Rivera; MC Llanos; V Vicente; C Martínez; F Ferrer-Marín. 23rd Biennial International Congress on Thrombosis. Valencia, España. 14/05/2014-17/05/2014.
- IX. DIFERENTE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE PLAQUETAS DE NEONATO Y DE ADULTO: ELEMENTOS QUE PUEDEN JUSTIFICAR LA HIPORREACTIVIDAD DE LAS PLAQUETAS NEONATALES. **E Caparrós-Pérez**; R Teruel-Montoya; JL Delgado; JM Torregrosa; N Montoya; F Navarro; J Rivera; R González-Conejero; V Vicente; C Martínez; F Ferrer-Marín. LV Reunión Anual de la SEHH y XXIX Congreso Nacional de la SETH. Sevilla, España. 17/10/2013-19/10/2013
- X. PAPEL DE SINTAXINA-11 EN LA LIBERACIÓN DE GRÁNULOS PLAQUETARIOS EN NEONATOS. **E Caparrós-Pérez**; R Teruel-Montoya; JL Delgado; F Navarro; N Montoya; JM Torregrosa; J Rivera; J Parrilla; V Vicente; C Martínez; F Ferrer-Marín. LV Reunión Anual de la SEHH y XXIX Congreso Nacional de la SETH. Sevilla, España. 17/10/2013-19/10/2013

### **3. FINANCIACIÓN OBTENIDA EN PROYECTOS NACIONALES COMPETITIVOS**

- I. F Ferrer Marín (IP); J Rivera Pozo (Co-IP); AI Antón García (Col); **E Caparrós Pérez (Col)**; ML Lozano Almela (Col); R Teruel Montoya (Col); JM Torregrosa Díaz (Col). Título: NUEVOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA EN NEONATOS. Instituto de Salud Carlos III. Subprograma de proyectos de investigación en salud (PI14/01956). Fecha de inicio-fin: 01/01/2015 - 31/12/2017.

### **4. PREMIOS Y DISTINCIONES**

- I. F Ferrer Marín; J Rivera Pozo; C Martínez Gómez; AI Antón García; **E Caparrós Pérez**; JM Torregrosa Díaz. Premio Antonio López Borrasca de La Sociedad Española de

Trombosis y Hemostasia. Título: PAPEL DE LAS VÍAS DE INHIBICIÓN PLAQUETARIA Y DE LOS PATRONES DE COEXPRESIÓN DE MIRNA: MRNA EN LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA. Fecha de concesión: 17/10/2013.

## ***APÉNDICE II***

---

*Producción científica no derivada de la  
Tesis*



## 1. **ARTÍCULOS POR ORDEN CRONOLÓGICO**

- I. G Soler; A Bernal-Vicente; AI Antón; JM Torregrosa; **E Caparrós-Pérez**; I Sánchez-Serrano; A Martínez-Pérez; B Sánchez-Vega; V Vicente; F Ferrer-Marín. The JAK2 46/1 haplotype does not predispose to CALR-mutated myeloproliferative neoplasms. *Annals of Hematology*. 09/12/2014. ISSN 0939-5555
- II. F Ferrer-Marín; B Bellosillo; L Martínez-Avilés; G Soler; P Carbonell; G Luengo-Gil; **E Caparrós-Pérez**; JM Torregrosa; C Besses; V Vicente. Leukemic transformation driven by an ASXL1 mutation after a JAK2V617F-positive primary myelofibrosis: Clonal evolution and hierarchy revealed by next-generation sequencing. PMID: 24011025. *Journal of Hematology and Oncology*. 09/2013. ISSN 1756-8722

## 2. **COMUNICACIONES A CONGRESO POR ORDEN CRONOLÓGICO**

- I. CARACTERIZACIÓN DE CUATRO NUEVAS VARIANTES MOLECULARES DE RASGRP2 QUE IMPIDEN LA ACTIVACIÓN DE AIIBB3 MEDIADA POR CALDAG-GEFI CAUSANDO DISFUNCIÓN PLAQUETARIA Y LEUCOCITARIA. ML Lozano; JM Bastida; **E Caparrós**; V Barqueros; J Padilla; T Sevivas; G Iruin; AR Cid; R Adan-Pedroso; M Coucelo; D Marques; JR González-Porras; JM Hernández-Rivas; F Ferrer-Marin; V Vicente; S P Watson; W Bergmeier; J Rivera. LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Santiago de Compostela, Galicia, España. 20/10/2016-24/10/2016
- II. EVALUACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE INHIBEN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA EN NEONATOS. V Palma; JM Torregrosa; **E Caparrós-Pérez**; MC Llanos; JE Blanco; ML Lozano; R Teruel-Montoya; AI Antón; V Vicente; C Martínez; J Rivera; F Ferrer-Marín. LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y

- Hemoterapia y XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Santiago de Compostela, Galicia, España. 20/10/2016- 24/10/2016
- III. MECANISMOS REGULADORES DE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA NEONATAL: PAPEL DE LOS RECEPTORES PLAQUETARIOS CON DOMINIOS ITAM E ITIM. V Palma; JV Sánchez; **E Caparrós-Pérez**; R Teruel-Montoya; JL Delgado; JE Blanco; ML Lozano; AI Antón; V Vicente; F Ferrer-Marín; J Rivera. LVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Santiago de Compostela, Galicia, España. 20/10/2016- 24/10/2016
- IV. EVALUATION OF PLATELETS INHIBITION PATHWAYS IN NEWBORNS. V Palma; JM Torregrosa; **E Caparrós-Pérez**; MC Llanos; JE Blanco; ML Lozano; R Teruel Montoya; AI; Antón; V Vicente; C Martínez; J Rivera; F Ferrer-Marín. European Congress of Thrombosis and Haemostasis (ECTH). La Haya, Holanda. 28/09/2016-30/09/2016.
- V. ACQUIRED GPVI DEFICIENCY IN TWO UNRELATED PATIENTS WITH MILD THROMBOCYTOPENIA. SP Watson; M Romera; **E Caparrós-Pérez**; JV Sánchez-Méndez; MI Sánchez Guiu; I Martínez; J Padilla; F Ferrer-Marín; R Teruel-Montoya; R Andrews; E Gardiner; ML Lozano; V Vicente; C Martínez; F Ferrer-Marín; J Rivera. XXV Congreso ISTH. Toronto, Canadá. 20/06/2015-25/06/2015
- VI. EL HAPLOTIPO JAK2 46/1 NO PREDISPONE AL DESARROLLO DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS CON MUTACIONES EN CALRETICULINA. F Ferrer-Marín; G Soler; A Bernal-Vicente; AI Antón; I Sánchez-Serrano; A Martínez-Pérez; **E Caparrós-Pérez**; JM M Torregrosa; J Sánchez-Vega; V Vicente. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Madrid, España. 06/11/2014-08/11/2014.

- VII. INFRAEXPRESIÓN DE LA DEUBIQUITINASA BAP1 EN NEOPLASIAS MIELOIDES: NUEVO MECANISMO PREDOMINANTE EN LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA. AM Hurtado; **E Caparrós-Pérez**; JMI Torregrosa; J Rivera; G Luengo; M Toderici; ME de la Morena; B Muiña; ML Lozano; C Martínez; ML Amigo; F de Arriba; F Ortuño; V Vicente; F Ferrer-Marín; A Jerez. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Madrid, España. 06/11/2014-08/11/2014.
- VIII. LA HIPERSENSIBILIDAD DE LAS PLAQUETAS NEONATALES A LA PGE1 REVELA UN NUEVO MECANISMO REGULADOR DE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA DEL RECIÉN NACIDO. JM Torregrosa; **E Caparrós-Pérez**; JL Delgado; JE Blanco; MLLozano; V Vicente; J Rivera; F Ferrer-Marín. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Madrid, España. 06/11/2014-08/11/2014.
- IX. LOS PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL Y MUTACIONES EN CALR POSEEN MENOR ACTIVACIÓN LEUCOPLAQUETARIA QUE LOS PORTADORES DE MUTACIÓN EN JAK2. JM Torregrosa; ML Lozano; MJ Moreno; AI Antón; C Martínez; **E Caparrós-Pérez**; V Vicente; J Rivera; F Ferrer-Marín. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Madrid, España. 06/11/2014-08/11/2014.
- X. PAPEL DE LOS MICRORNA EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA HEMOSTÁTICO. C Martínez; S Saloum-Asfar; AB Arroyo; R Teruel-Montoya; **E Caparrós-Pérez**; V Vicente; R González-Conejero. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Madrid, España. 06/11/2014-08/11/2014.
- XI. HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA MEJORA GENÉTICA DE BITUMINARIA BITUMINOSA: UNA ESPECIE CON MÚLTIPLES POSIBILIDADES. M Dabauza; M Pazos-

- Navarro; E Correal; I Serrano-Sánchez; **E Caparrós**; B Bautista. X Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in Vitro de Tejidos Vegetales. Zaragoza, España. 22/10/2013- 24/12/2013
- XII. CAMBIOS EN LA INCIDENCIA Y EN EL PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE LOS MARCADORES INFECCIOSOS VHB, VHC, VIH Y SÍFILIS EN LA ÚLTIMA DÉCADA (2001-2012) EN LA POBLACIÓN DE DONANTES DE LA REGIÓN DE MURCIA. JM Torregrosa; MC García-Santalla; MJ Candela; A Cascales; MJ Moreno; I Zuazu; **E Caparrós-Pérez**; V Vicente; F Ferrer-Marín. LV Reunión Anual de la SEHH y XXIX Congreso Nacional de la SETH. Sevilla, España. 17/10/2013-19/10/2013
- XIII. PROGNOSTIC ROLE OF MIR146A POLYMORPHISMS IN ATRIAL FIBRILLATION. V Roldán; S Salloum-Asfar; P Gallego; AB Arroyo; N García-Barberá; R Teruel-Montoya; **E Caparrós-Pérez**; V Vicente; R González-Conejero; C Martínez. XXIV Congreso ISTH. Amsterdam, Holanda. 29/06/2013-04/07/2013
- XIV. CAMBIOS EN LA INCIDENCIA Y EN EL PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE LOS MARCADORES INFECCIOSOS VHB, VHC, VIH Y SÍFILIS EN LA ÚLTIMA DÉCADA (2001-2012) EN LA POBLACIÓN DE DONANTES DE LA REGIÓN DE MURCIA. MC García-Santalla; F Ferrer-Marín; MJ Candela; A Cascales; I Zuazu; ML Lozano; JM Torregrosa; **E Caparrós-Pérez**; J Rivera; V Vicente. XXIV Congreso SETS. Murcia, España. 20/06/2013-22/06/2013
- XV. RISK OF LIMPHOPLIFERATIVE NEOPLASMS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS. S Cancio; G Soler; JM Torregrosa; **E Caparrós-Pérez**; M Osma; F Ortuño; G Luengo-Gil; V Vicente; F Ferrer-Marín. XVIII Congreso EHA. Estocolmo, Suecia. 13/06/2013- 6/06/2013.
- XVI. MEGACARIOPOYESIS Y TROMBOPOYESIS NEONATAL. F Ferrer-Marín; **E Caparrós-Pérez**; V Vicente; M Sola-Visner. LIV Reunión Anual de la SEHH y XVIII Congreso Nacional de la SETH. Salamanca, España. 18/10/2012-20/10/2012.

- XVII. MIR-181A-5P REGULA LA EXPRESIÓN DE FACTOR XI EN HÍGADO HUMANO S Salloum-Asfar; R Teruel-Montoya; N García-Barberá; G Luengo-Gil; **E Caparrós-Pérez**; A Chadhry; E Schuetz; J Rivera; V Vicente; R González-Conejero; C Martínez. LIV Reunión Anual de la SEHH y XXVIII Congreso Nacional de la SETH. Salamanca, España. 18/10/2012-20/10/2012.
- XVIII. MIR-181A-5P REGULATES FACTOR XI EXPRESSION IN HUMAN LIVER. S Salloum-Asfar; R Teruel-Montoya; G Luengo-Gil; **E Caparrós-Pérez**; N García-Barberá; A Chadhry; E Schuetz; V Vicente; R González-Conejero; C Martínez. EMBO workshop: Reciprocal interactions of signaling pathways & non-coding RNA. Ascona, Suiza. 16/09/2012-19/09/2012



# ***ABREVIATURAS***

---



|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>3'-UTR</b>          | <i>3' Untranslated region</i>                  |
| <b>5'-UTR</b>          | <i>5' Untranslated region</i>                  |
| <b>ADP</b>             | <i>Adenosina difosfato</i>                     |
| <b>AMPc</b>            | <i>Adenosina monofosfato cíclico</i>           |
| <b>ATP</b>             | <i>Adenosina trifosfato</i>                    |
| <b>BCA</b>             | <i>Ácido bicinquinónico</i>                    |
| <b>BSA</b>             | <i>Albúmina de suero bovino</i>                |
| <b>CD62</b>            | <i>P-selectina</i>                             |
| <b>circRNA</b>         | <i>RNA circular</i>                            |
| <b>CMH</b>             | <i>Complejo mayor de histocompatibilidad</i>   |
| <b>DTT</b>             | <i>Ditiotreitol</i>                            |
| <b>EDTA</b>            | <i>Ácido etilendiaminotetraacético</i>         |
| <b>EP3</b>             | <i>Receptor 3 de prostaglandina E</i>          |
| <b>EP4</b>             | <i>Receptor 4 de prostaglandina E</i>          |
| <b>FITC</b>            | <i>Isotiocianato de fluoresceína</i>           |
| <b>FvW</b>             | <i>Factor von Willebrand</i>                   |
| <b>GAPDH</b>           | <i>Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa</i> |
| <b>GPCR</b>            | <i>Receptor acoplado a proteína G</i>          |
| <b>HIC</b>             | <i>Hemorragia intracraneal</i>                 |
| <b>mi-RISC</b>         | <i>miRNA-Induced silencing complex</i>         |
| <b>mRNA</b>            | <i>RNA mensajero</i>                           |
| <b>miRNA</b>           | <i>microRNA</i>                                |
| <b>ncRNA</b>           | <i>RNA no codificante</i>                      |
| <b>IP</b>              | <i>Receptor de prostaciclina</i>               |
| <b>IP3</b>             | <i>Inositol 1,4,5-trifosfato</i>               |
| <b>PAR1</b>            | <i>Receptor activado por proteasa 1</i>        |
| <b>PAR4</b>            | <i>Receptor activado por proteasa 4</i>        |
| <b>PBS</b>             | <i>Salino tamponado con fosfato</i>            |
| <b>PE</b>              | <i>Ficoeritrina</i>                            |
| <b>PFA-100</b>         | <i>Analizador de función plaquetaria 100</i>   |
| <b>PGE2</b>            | <i>Prostaglandina E2</i>                       |
| <b>PGI2</b>            | <i>Prostaglandina I2 o Prostaciclina</i>       |
| <b>PIP<sub>2</sub></b> | <i>Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato</i>       |
| <b>PLC</b>             | <i>Fosfolipasa C</i>                           |
| <b>PPP</b>             | <i>Plasma pobre en plaquetas</i>               |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>PRP</b>             | <i>Plasma rico en plaquetas</i>                                       |
| <b>PVDF</b>            | <i>Polifluoruro de vinilideno</i>                                     |
| <b>qRT-PCR</b>         | <i>PCR cuantitativa a tiempo real (quantitative real time PCR)</i>    |
| <b>RISC</b>            | <i>RNA-induced silencing complex</i>                                  |
| <b>RNAse</b>           | <i>Ribonucleasa</i>   |
| <b>SCR</b>             | <i>Scramble</i>   |
| <b>SDS-PAGE</b>        | <i>Gel de electroforesis de poliacrilamida-Dodecil sulfato sódico</i> |
| <b>SDS</b>             | <i>Dodecil sulfato sódico</i>   |
| <b>TEG</b>             | <i>Tromboelastógrafo</i>  |
| <b>TPO</b>             | <i>Trombopoyetina</i>   |
| <b>TRAP</b>            | <i>Péptido activador del receptor de trombina</i>                     |
| <b>TxA<sub>2</sub></b> | <i>Tromboxano A<sub>2</sub></i>                                       |
| <b>UCIN</b>            | <i>Unidad de cuidados intensivos neonatal</i>                         |
| <b>VPM</b>             | <i>Volumen plaquetario medio</i>                                      |

