TESE DE DOUTORAMENTO

IMPACTO Y APLICACIÓN DEL SECRETOMA DE LAS PLAQUETAS EN MEDICINA TRANSFUSIONAL

Lidia Hermida Nogueira

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

D./Dna. **LIDIA HERMIDA NOGUEIRA**

Título da tese: **IMPACTO Y APLICACIÓN DEL SECRETOMA DE LAS PLAQUETAS EN MEDICINA TRANSFUSIONAL**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **SANTIAGO DE COMPOSTELA**, **11 de Novembro de 2021**.

Sinatura electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dna. **ÁNGEL GARCÍA ALONSO**

En condición de: **Director/a**

Título da tese: **IMPACTO Y APLICACIÓN DEL SECRETOMA DE LAS PLAQUETAS EN MEDICINA TRANSFUSIONAL**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna LIDIA HERMIDA NOGUEIRA, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade Monográfica con reproducción de publicacións, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En **SANTIAGO DE COMPOSTELA**, **11 de Novembro de 2021**

Sinatura electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La presente tesis doctoral ha contado con el apoyo económico de las siguientes fuentes de financiación:

- Financiación otorgada por las compañías Intra-Lock Iberia y Global Dental Surgical Group (GDSG), del grupo Henry Schein, gracias a la colaboración existente con el Dr. Juan Blanco Carrión del Grupo de Investigación Odontología Médico-Quirúrgica.
- Financiación a Grupos de Referencia Competitiva (GRC2014/011), con cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- Financiación del Centro singular de investigación de Galicia (acredatición 2016-2019, ED431G/05), con cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- La doctoranda ha sido beneficiaria de una ayuda de apoyo a la etapa predoctoral del Sistema gallego de I+D+, cofinanciadas parcialmente por el programa operativo Fondo Social Europeo Galicia 2014-2020, concendida en el año 2018 por la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia.

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE CULTURA, EDUCACIÓN
E ORDENACIÓN UNIVERSITARIA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

La tesis que aquí se presenta lo hace bajo mi nombre, pero durante este camino han sido muchas las personas que han contribuido de manera profesional al desarrollo de este trabajo. Sin embargo, la etapa predoctoral es mucho más que crecimiento profesional, y en el aspecto personal también ha sido mucha la gente que ha hecho que la chica que hoy presenta este manuscrito sea distinta, aunque con la misma esencia, a la que pisó por primera vez el laboratorio de Proteómica de Plaquetas, al que he tenido el placer de pertenecer durante varios años.

Precisamente, al director de mi grupo, el Profesor Ángel García, es al primero al que quiero agradecerle su apoyo. Ángel, gracias por confiar en mí para el desarrollo de este proyecto tan variado y alejado, por momentos, de la esencia plaquetaria del grupo. Gracias por tu sinceridad en todo momento y por no cesar en la búsqueda de las herramientas necesarias para la realización de este trabajo. Gracias también por apostar por mis ideas y permitirme llevarlas a cabo y gracias, además, por darme la oportunidad de presentar mis resultados en distintos escenarios permitiendo así enriquecer mi conocimiento científico.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a los colaboradores de los distintos proyectos su gran ayuda e interés en el desarrollo de los mismos. Gracias al Dr. Juan Blanco y al Dr. Pedro Diz por sus aportaciones clave en el desarrollo de gran parte de esta tesis doctoral y su visión clínica del proyecto. En especial al Dr. Juan Blanco agradecerle su entusiasmo, la pasión con la que transmite su conocimiento y ejerce su profesión y por las ganas insaciables de la búsqueda de respuestas. Por supuesto, gracias por la confianza que ha depositado en mí desde el principio y por promover mi desarrollo profesional, ha sido un enorme placer trabajar contigo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Gracias también a la Dra. Azucena Castrillo, por saber transmitirme su conocimiento en el campo de la medicina transfusional y por su curiosidad y sus ganas de seguir aprendiendo. También agradecer a la Dra. Susana Bravo su disposición y ayuda, así como su rápida respuesta y cercanía.

A mis amigas, pero también mis primeras compañeras de laboratorio, María e Irene, sin duda sois las personas más importantes que he encontrado en esta etapa. Gracias por vuestro conocimiento y por todas las enseñanzas que me han permitido crecer científica y personalmente. Por acogerme desde el principio, aguantarme, entenderme y ayudarme a encontrar en mí virtudes que ni yo conocía, además de enseñarme a lidiar con mis defectos. Gracias por estar desde el principio, pero sobre todo gracias por estar en el final, porque da igual cuantos kilómetros o husos horarios nos separen, estáis ahí a la distancia de una palabra para conseguir animarme y calmarme sea la hora que sea. No sé si empecé la tesis en este grupo en parte por vosotras, pero de lo que sí estoy segura es que la he acabado gracias a vosotras.

A mis actuales compañeras de laboratorio Delia y Sara, siento que hayáis conocido la versión más estresada de mí, pero gracias por escucharme y ayudarme en todo momento. A otro de mis compañeros, Luis, gracias por todos los debates científicos que hemos compartido y también por las charlas sobre la vida que tanto nos han enriquecido. Gracias por tu pasión a la hora de trabajar, tus ganas de aportar lo mejor en cada proyecto y por no descuidar la amistad que hemos forjado en el laboratorio.

No me puedo olvidar del resto de compañeros que he tenido a lo largo de estos años, Xueqing, Nuria, Clara, Fran, Jignan, Marcin, Serena y María chiquita los cuales también me han ayudado a crecer como persona y como investigadora. Particularmente, agradecer a Serena por su disposición y dedicación siempre acompañadas de una sonrisa y a María chiquita por su entusiasmo y sus ganas infinitas de aprender, me has enseñado tú más cosas a mí que yo a ti.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mis otras compañeras de laboratorio, aunque no de grupo, Sonia, Nuria, Yaiza, Daniela y Leticia. Gracias por vuestra alegría mañanera, por estar dispuestas a escuchar cada una de mis quejas y por vuestros consejos acompañados de mucho café y chocolate. Gracias también al Profesor Jesús Requena por promover siempre un ambiente agradable y la unión de ambos grupos. Está claro que los compañeros del laboratorio de al lado no se pueden elegir, pero no podría pedir compañeras y amigas mejores al otro lado de la pared.

Ya que esto va por grupos, agradecer a uno al que también pertenezco, Biofarma, por abrirme las puertas de sus laboratorios y ayudarme con todo lo que he necesitado durante todos estos años. En especial agradecer a Marta, Elia y Laura por las visitas que alegraban los días, por la preocupación y el interés recíproco y por los planes más allá del laboratorio. Agradecer, además, al resto de sus compañeros de grupo, en particular a Rocío, Sonias, Marías y Edu por su disposición y ayuda desinteresada, por acogerme en cultivos como una más y por facilitarme el trabajo con los últimos experimentos de la tesis.

A mi supervisora de la estancia, directora del grupo Oral Research Laboratory de la Universidad de Oslo, thanks Professor Janne E. Reseland for hosting me in your lab, it was an amazing professional and personal experience. Thank you for your patience, your time and your support. Thanks also to all the great people that I met in the lab, especially to my friends Safiyye and Anne for discovering me new cultures and places and for all the nice moments shared.

A las amistades que surgen de trabajar juntos, gracias a los técnicos del CIQUS, concretamente, a Laura y Pablo por todo el tiempo compartido en la sala de la ultracentrífuga y por recibirme siempre con los brazos abiertos. Gracias a Lucía, técnico del CIMUS, por su curiosidad científica que despertaba todavía más la mía y por todas las horas de más que me ha dedicado siempre con la energía y paciencia que la caracterizan. Agradecer asimismo la labor de mi amiga Ángela, por

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

prestarme su tiempo, por todas sus explicaciones y el cariño que ponía en ellas.

Agradecer también el cariño con el que me han tratado siempre las trabajadoras de la clínica Blanco-Ramos, en especial a Lolín, por su gran profesionalidad, por coordinar y organizar el trabajo y hacérmelo mucho más fácil.

Por otra parte, me gustaría agradecer a los amigos que han estado a mi lado para lo bueno y para lo malo, especialmente en este último año, Alberto, Tiago y Germán. Gracias por preocuparos por mí en todo momento, por estar dispuestos a escucharme cuando lo necesitaba y por convertiros en mis compañeros de celebración cuando había una buena noticia, todavía nos queda brindar por la defensa de esta tesis y por las de todos vosotros.

Gracias también a los amigos que han surgido por mi descaro a la hora de pasarme por sus laboratorios a pedir favores. Gracias Vera, Parda, Cristina, Adriana, Elena, Sara, Mari, Miguel, Edward, Natalia, Tamara y Nerea por todas las palabras de ánimo que me habéis dedicado este último año y por hacerme sentir todavía como en casa cuando nos cruzábamos por los pasillos.

A mis amigas del máster, Jeni, Laura, Esther y Estefa que habéis seguido con interés esta etapa y habéis hecho todo lo posible por buscar un hueco para poder vernos, me alegro de seguir manteniendo amistades tan bonitas después de tantos años.

Una mención especial se merecen mis compañeras de piso, ellas sí que han vivido el proceso completo de hacer una tesis sin haber hecho ninguna. Gracias Carla, Clara y Tania, por las charlas en la cocina y las risas en salón, por hacer especial volver a casa y comentar nuestro día a día y por todos nuestros momentos compartidos y logros conseguidos, ha sido bonito crecer juntas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mis amigos de Cambados que han vivido mi ausencia este último año, pero que me han animado siempre en este duro camino. Gracias en especial a Yago, por su preocupación cada semana, por su apoyo incondicional tras todos estos años, y por seguir ahí a pesar de la distancia y de no habernos visto en mucho tiempo. Agradecer también a César su confianza ciega en que conseguiría ser Dra., a partir de ahora ya puedes referirte a mí así de forma oficial.

La gente que me conoce sabe que lo más importante para mí es mi familia, y a ella tengo que agradecerle todo el apoyo que me han brindado durante esta etapa y desde siempre.

Especialmente, quiero agradecer a mis padres que me hayan animado a perseguir mis objetivos sin importar lo que cueste si eso me hace feliz. Por su sacrificio constante para que pudiera comenzar esta tesis, por calmarme y ser la paz que necesito cuando ya no me aguanto ni yo misma. Por estar ahí siempre que lo necesito, por sus consejos y todo su cariño que me han permitido finalizar esta etapa con éxito. Puede que no comprendáis parte de lo que está aquí escrito, pero nada de esto ni de todas mis etapas anteriores hubieran existido si no es por vosotros.

Por último, gracias a mi hermana, Tamara, por confiar siempre mí, por hacerme recapacitar y ayudarme a ver las cosas desde otro punto de vista. Gracias por tu paciencia infinita, tu sinceridad y tu madurez y por saber aconsejarme siempre lo mejor, sin duda este trabajo es tan tuyo como mío.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado"

Albert Szent-Györgyi

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Resumen

Las plaquetas son las células más pequeñas presentes en la sangre y tienen la particularidad de carecer de núcleo ya que derivan de una célula precursora llamada megacariocito. Sus funciones principales son el mantenimiento de la integridad vascular y la hemostasia, pero participa en otros muchos procesos como la inmunidad, inflamación y cierre de heridas.

En medicina transfusional los concentrados de plaquetas se utilizan para detener una hemorragia o reponer este componente en la sangre por pérdida como consecuencia de algunas enfermedades o tratamientos. Los concentrados de plaquetas se almacenan en los bancos de sangre a 22ºC para evitar su activación, lo que conlleva un aumento del riesgo de crecimiento de patógenos. En la actualidad se utilizan tecnologías de reducción de patógenos que contienen algunas moléculas se intercalan en el ADN de virus y bacterias rompiendo sus cadenas tras un pulso de luz ultravioleta, disminuyendo el riesgo de contaminación con patógenos. Estas tecnologías no afectan a las plaquetas ya que estas carecen de núcleo, sin embargo, la propia conservación provoca cambios en las plaquetas conocidos como lesiones derivadas del almacenamiento.

Entre las lesiones derivadas del almacenamiento se encuentran cambios metabólicos, bioquímicos y también morfológicos. Estos últimos pueden dar lugar a la formación de vesículas extracelulares (VEs) que contienen en su interior una gran variedad de moléculas (por ejemplo, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos…) que indican el estado de la célula de origen y a su vez su contenido puede tener efectos en las células receptoras.

En la presente tesis doctoral se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo del proteoma de las VEs derivadas de concentrados de plaquetas a dos momentos de almacenamiento, días 2 y 7, con el fin de identificar marcadores de lesión plaquetaria. En este sentido se

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

identificaron las proteínas S100A9 y GPVI a distintos tiempos de almacenamiento indicando el estado y la viabilidad de las plaquetas durante su conservación. Además, se observó un incremento en la expresión de la proteína proinflamatoria CCL5 en las VEs derivadas de CP a día 7 lo cual podría aumentar el riesgo de reacciones postransfusionales.

En el ámbito odontológico las plaquetas se utilizan con fines regenerativos por su participación en el proceso de curación de heridas gracias a la liberación del contenido de sus gránulos tras su activación. Los concentrados de plaquetas empleados en este ámbito se obtienen tras la centrifugación del propio tubo de sangre en ausencia de anticoagulante, dando lugar a la formación de un coágulo. Dependiendo del protocolo utilizado, se obtienen unos concentrados con unas características u otra. El más utilizado en odontología es un concentrado rico en plaquetas y leucocitos que posee una fuerte membrana de fibrina (L-PRF).

El éxito de los buenos resultados obtenidos tras la aplicación de las membranas es atribuido a los factores de crecimiento que las plaquetas contenidas en estas membranas liberan. Sin embargo, estas no son las únicas moléculas que las plaquetas liberan cuando se activan pudiendo ser muchas otras las responsables de los resultados observados. En este sentido en la presente tesis doctoral se planteó caracterizar el perfil proteico del secretoma de las membranas L-PRF y cuantificar sus diferencias a lo largo del tiempo. En el análisis proteómico se identificaron varios cientos de proteínas a día 3 de cultivo de estas membranas entre las que destacan factores de crecimiento y proteínas relacionadas con respuesta de fase aguda. La gran mayoría de proteínas identificadas disminuyeron sus niveles con el paso del tiempo, al contrario que el factor de crecimiento GDF-15, la catepsina S y el fibrinógeno indicando que a día 3 se produce una alta degranulación neutrófila y plaquetaria y a días 7 y 21 diferenciación de monocitos a macrófagos y apoptosis celular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tras descifrar el secretoma liberado por las membranas L-PRF, se pretendió avanzar en el conocimiento del efecto del secretoma de estas membranas sobre distintos tipos celulares que participan en procesos de cicatrización y curación de heridas. En este sentido se evaluó el efecto del secretoma recogido a días 3 y 7 del cultivo de las membranas L-PRF sobre la proliferación y migración de fibroblastos, encontrando diferencias entre los distintos procesos dependiendo del tiempo de recogida del secretoma, sugiriendo una contribución específica de las proteínas liberadas por las membranas en cada momento sobre la cicatrización de una herida.

Además, se evaluó el efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre osteoblastos y células madre mesenquimales con el propósito de conocer su papel sobre la diferenciación osteogénica. Los resultados obtenidos sugieren que las moléculas liberadas por las membranas tienen un ligero efecto sobre la diferenciación osteogénica. Estos análisis abren las puertas a futuros estudios que permitan comprender con mayor precisión el efecto regenerador de las membranas L-PRF.

En resumen, esta tesis doctoral incluye un exhaustivo análisis del secretoma liberado por las plaquetas empleadas en distintos ámbitos clínicos. Los resultados obtenidos en ambos estudios podrían dar lugar a la optimización del uso de los CP tanto en medicina transfusional, en el caso de los concentrados de plaquetas, como en el ámbito odontológico y regenerativo en el caso de las membranas L-PRF.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Abstract

Platelets are anucleated cells and the smallest ones present in blood. Their principal functions are the maintenance of vascular integrity and haemostasis. However, platelets participate also in other processes such as immunity, inflammation and wound healing.

In the transfusion field, platelet concentrates (PC) are used to stop bleeding or increase the number of platelets in patients with thrombocytopenia. Platelets concentrates are stored in blood banks at 22ºC in order to avoid their activation, although this temperature increases the risk of pathogen growth. Currently, blood banks applied pathogen reduction technologies to decrease the possibility of pathogen contamination. These technologies are based on solvents that intercalate between DNA strands of virus and bacteria, killing them after a UV light pulse. However, they do not have a negative impact on platelets due to their absence of nuclei.

It is known that platelet storage produces lesions in their metabolism, their proteome and/or their morphology, triggering the release of extracellular vesicles (EVs). EVs cargo contains lipids, nucleic acids and proteins that may indicates the state of the derived cell, and the potential effect on their receptor cells.

In the first chapter of the thesis, we performed a qualitative and quantitative analysis of proteome of EVs-derived PC over storage time in order to identify platelet storage lesions markers related with transfusion adverse reactions. In the qualitative analysis protein S100A9 and GPVI were identified at specific time points indicating platelets viability state over storage. In addition, proinflammatory cytokine CLL5 was found overexpress in EVs-PC derived at day 7, which could increase the risk of transfusion adverse reactions.

In dentistry, platelets are used due to their regeneration properties. Platelets release their granules content when they get activate, having an impact in inflammation and wound healing process. Platelets were

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

obtained by blood centrifugation in absence of any anticoagulants forming a clot product which is obtained with different characteristics depending on the methodology followed. Leukocyte platelet rich fibrin (L-PRF) is the most applied in dentistry. Indeed, different studies have observed promising results in wound healing after L-PRF treatment.

Platelets from L-PRF release many molecules in the wound, however many researchers have been only focus on growth factors. In the second chapter of this thesis, we studied the secretome release by L-PRF membranes and identified the differences over time. Many proteins related to clathrin-mediated endocytosis and acute phase response were found in the secretome of L-PRF membranes cultured at day 3. The majority of these proteins identified decrease their levels over time. On the contrary, growth factor GDF-15, cathepsin S and fibrinogen increased their concentration over time, suggesting macrophage differentiation and platelet and leukocyte apoptosis.

In order to understand the secretome biological properties, we analysed their effect in different cells types which may participate in wound heling processes. Secretome samples collected at different time points were applied at different concentrations to fibroblast. The rationale was to analyse their effect on proliferation and migration. The results obtained suggest a specific secretome contribution on wound healing.

After that, the effect of secretome in osteogenic differentiation was analysed *in vitro* using osteoblast and mesenchymal stem cells. The results obtained show a slight osteogenic differentiation. In addition, we found that proteins released by L-PRF membranes may stimulate mesenchymal stem cells differentiation to adipocytes, myocytes, chondrocytes or fibroblasts, increasing the potential use of these membranes in other clinical scenarios.

To sum up, an exhaustive analysis of secretome released by platelets used in different clinical scenarios was performed. The results obtained in this thesis could help to improve the use of PC in transfusion field and the application of L-PRF membranes in regenerative medicine.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índices

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas xxiii
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1 La sangre: composición y funciones 3
1.1.1 Papel de las plaquetas en hemostasia, inmunidad, inflamación y cierre de heridas 5
1.1.2 Papel de los leucocitos en inmunidad, inflamación y cierre de heridas 9
1.1.3 Interacción entre plaquetas y leucocitos en el cierre de heridas 11
1.2 Medicina transfusional 12
1.2.1 Transfusión sanguínea: Aplicaciones terapéuticas y posibles reacciones adversas 13
1.2.2 Métodos de fraccionamiento y almacenamiento de los componentes sanguíneos 16
1.2.3 Lesiones derivadas del almacenamiento 22
1.2.3.1 Impacto del almacenamiento en el proteoma de los concentrados 24
1.2.3.2 Evaluación de las lesiones derivadas del almacenamiento en los concentrados 26
1.2.4 Vesículas extracelulares: Interés de su estudio en concentrados celulares destinados a transfusión 27
1.3 Autotransfusión: Productos sanguíneos no destinados a uso transfusional 31
1.3.1 Plasma autólogo: Fracciones componentes o derivados 31
1.3.2 Aplicación de derivados sanguíneos con fines regenerativos: Etapas de curación de heridas y fracturas 35
1.3.2.1 Etapas de curación de heridas 36

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.2.2 Etapas de curación de fracturas.....38
1.3.3.3 Aplicación de derivados sanguíneos in vitro e in vivo con fines regenerativos.....40
2. OBJETIVOS.....45
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....49
3.1 Selección de donantes y obtención de las muestras para el estudio de VEs.....51
3.2 Selección de donantes y obtención de las muestras para el estudio del secretoma de las membranas L-PRF.....52
3.3 Aislamiento de las VE.....53
3.4 Caracterización de VE.....55
3.4.1 Microscopía electrónica de transmisión.....55
3.4.2 Dispersión dinámica de luz (DDL).....56
3.4.3 Citometría de flujo.....56
3.5 Puesta a punto del protocolo de recogida del secretoma de las membranas L-PRF.....57
3.6 Protocolo definitivo de cultivo de las membranas y recogida del secretoma.....59
3.7 Estudios proteómicos.....60
3.7.1 Procesamiento de la muestra para estudios proteómicos.....60
3.7.1.1 Precipitación de proteína.....60
3.7.1.2 Cuantificación de proteína.....61
3.7.1.2.1 Cuantificación de proteína por el método Bradford.....61
3.7.1.2.2 Cuantificación de proteína por el método Pierce 660.....62

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.7.1.3 Identificación y cuantificación de proteínas mediante la hibridación de un array específico 64
3.7.1.4 Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE) 65
3.7.1.5 Electroforesis bidemensional 66
3.7.1.6 Tinción de geles de poliacrilamida y escisión de bandas 67
3.7.2 Identificación de proteínas: Espectrometría de masas 68
3.7.2.1 Digestión en gel: Digestión tríptica 69
3.7.2.2 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas Triple TOF 70
3.7.2.3 Creación de la librería para la cuantificación relativa mediante la adquisición por SWATH 71
3.7.2.4 Cuantificación relativa mediante la adquisición por SWATH 73
3.7.3 Inmunodetección 74
3.7.4 Inmunodetección mediante tecnología multiplex 76
3.8 Ensayos celulares 78
3.8.1 Cultivos celulares 78
3.8.1.1 Descongelación celular 78
3.8.1.2 Expansión celular 78
3.8.1.3 Congelación celular 79
3.8.1.4 Siembra celular 79
3.8.1.5 Fijación celular 79
3.8.1.6 Lisis celular 79
3.8.2 Ensayos celulares con fibroblastos 80
3.8.3 Ensayos celulares con osteoblastos 80
3.8.4 Ensayos celulares con células madre mesenquimales 81

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.8.5 Ensayo de proliferación celular por el método MTT.....82
3.8.6 Ensayo de cierre de herida.....82
3.8.7 Ensayo de citotoxicidad mediante la medida de la lactato deshidrogenasa (LDH).....83
3.8.8 Medida de la actividad de la fosfatasa alcalina 84
3.8.9 Ensayo de determinación de depósitos de calcio.....84
3.9 Análisis de datos.....85
3.9.1 Análisis de biología de sistemas.....85
3.9.2 Análisis estadísticos.....86
4. RESULTADOS 87
4.1 Estudio del contenido de las VEs liberadas por los CP tratados con Mirasol durante el almacenamiento.....89
4.1.1 Caracterización de las VEs 89
4.1.2 Análisis cualitativo del proteoma de las VEs presentes a distintos días de almacenamiento en CP tratados con la tecnología Mirasol.....91
4.1.3 Análisis cuantitativo del proteoma de las VEs presentes a distintos días de almacenamiento en CP tratado con la tecnología Mirasol.....93
4.1.4 El número de MVs está afectado por la variabilidad inter-individual 98
4.1.5 Validaciones de los resultados mediante inmunodetección: Aumento de los niveles de CD9, ACTN1 e ITA2B con el tiempo de almacenamiento 99
4.2 Estudio de caracterización del perfil proteómico del secretoma de las membranas L-PRF 101

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.1 Puesta a punto del procedimiento: Selección de las condiciones de recogida del secretoma de las membranas L-PRF 101

4.2.2 Análisis cualitativo y cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF 105

4.2.2.1 Análisis cualitativo del perfil del secretoma de las membranas L-PRF a día 3 de cultivo 106

4.2.2.2 Análisis diferencial 1D-SDS-PAGE del perfil del secretoma recogido a días 3 y 7 109

4.2.2.3 Análisis cuantitativo de factores de crecimiento mediante ELISA 110

4.2.2.4 Análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF mediante SWATH-MS: Enriquecimiento proteico a día 3 de cultivo 112

4.2.2.5 MMP9, TSP1 y CO3 están aumentadas y fibrinógeno y CATS están disminuidas en el secretoma recogido a día 3 de cultivo 115

4.3 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre diferentes tipos celulares 117

4.3.1 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre fibroblastos 117

4.3.1.1 Puesta a punto de los ensayos de proliferación y migración celular: Evaluación de la concentración de FBS y su interacción con el secretoma 117

4.3.1.2 Puesta a punto de los ensayos de proliferación y migración celular: Evaluación de la concentración de secretoma 120

4.3.1.3 Puesta a punto de los ensayos de proliferación y migración celular: Evaluación de bajas concentraciones de secretoma 124

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.1.4 Efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre la proliferación y migración celular.....126

4.3.2 Estudio del efecto de la proteína BMP-5 presente en el secretoma de las membranas L-PRF sobre los osteoblastos.....128

4.3.2.1 Efecto de BMP-5 y secretoma sobre la citotoxicidad celular.....129

4.3.2.2 Efecto de BMP-5 y secretoma en la diferenciación osteogénica (Actividad de la fosfatasa alcalina, proteínas solubles).....130

4.3.2.3 Efecto de BMP-5 y secretoma en la mineralización..133

4.3.2.4 Efecto de BMP-5 en la osteoblastogénesis / osteoclastogénesis: Niveles de expresión de OPG y RANKL en los lisados celulares a día 14.....134

4.3.3 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre diferenciación osteogénica.....136

4.3.3.1 Efecto del secretoma en la diferenciación osteogénica: Evaluación de la citotoxicidad.....137

4.3.3.2 Efecto del secretoma en la diferenciación osteogénica: Evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina.....138

4.3.3.3 Efecto del secretoma en la diferenciación osteogénica: Evaluación de un panel de citoquinas y proteínas específicas de diferenciación osteogénica.....139

4.3.3.4 Efecto del secretoma en la diferenciación osteogénica: Evaluación de los niveles de calcio.....147

5. DISCUSIÓN.....151

5.1 Estudio del contenido de las VEs liberadas por los CP tratados con Mirasol durante el almacenamiento.....153

5.2 Estudio de caracterización del perfil proteómico del secretoma de las membranas L-PRF.....158

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre diferentes tipos celulares 164

5.3.1 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre fibroblastos 164

5.3.2 Estudio del efecto de la proteína BMP-5 presente en el secretoma de las membranas L-PRF sobre los osteoblastos 169

5.3.3 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre las MSC 173

6. CONCLUSIONES 181

6.1 Estudio del contenido de las VEs liberadas por los CP tratados con Mirasol durante el almacenamiento 183

6.2 Estudio de caracterización del perfil proteómico del secretoma de las membranas L-PRF 184

6.3 Estudio de los efectos del secretoma de las membranas L-PRF sobre distintos tipos celulares 185

6. CONCLUSIONS 187

6.1 Study of platelet concentrates EVs proteome over storage time 189

6.2 Study of the characterization of the L-PRF secretome 190

6.3 Study of the effect of the secretome released by L-PRF membranes on different cellular types 191

7. BIBLIOGRAFÍA 193

8. ANEXOS 217

Anexo I. Listado de materiales, equipos y reactivos utilizados en la presente tesis doctoral 219

Anexo I.I Listado del material utilizado en la presente tesis doctoral 219

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexo I.II Listado de los equipos utilizados en la presente tesis doctoral 220

Anexo I.III Listado de los reactivos utilizados en la presente tesis doctoral 222

Anexo II. Composición de soluciones y tampones empleados en la presente tesis doctoral 226

Anexo III. Figuras Suplementarias del análisis proteómico de las VEs derivadas de CP y análisis proteómico de las membranas L-PRF 228

Anexo IV. Resultados ampliados del estudio del contenido de las VEs liberadas por los CP tratados con Mirasol durante el almacenamiento 232

Anexo IV.I Resultados ampliados del análisis cualitativo del proteoma de las VEs 232

Anexo IV.II Resultados ampliados del análisis cuantitativo del proteoma de las VEs 257

Anexo V. Resultados ampliados del estudio de caracterización del perfil proteómico del secretoma de las membranas L-PRF 273

Anexo V.I Resultados ampliados del análisis cualitativo del perfil del secretoma de las membranas L-PRF a día 3 de cultivo 273

Anexo V.II Resultados ampliados del análisis diferencial 1D-SDS-PAGE del perfil del secretoma recogido a días 3 y 7 295

Anexo V.III Resultados ampliados del análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF mediante SWATH-MS....308

Anexo VI. Lista de publicaciones realizadas durante el periodo de tesis 351

Anexo VII. Tesis monográfica con reproducción total o parcial de publicaciones 354

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de Figuras

Figura 1. Papel de las plaquetas en la hemostasia. 6
Figura 2. Conservación de los elementos de la sangre. 17
Figura 3. Diferencias entre las metodologías de reducción de patógenos empleadas para inactivar CP. 20
Figura 4. Lesiones derivadas del almacenamiento: Cambios a nivel metabólico, morfológico y bioquímico. 26
Figura 5. Biogénesis y secreción de VEs. 28
Figura 6. Pasos a seguir para la producción de los distintos tipos de CRP 32
Figura 7. Fases de curación de una herida y tipos celulares que participan. 36
Figura 8. Diseño experimental del cultivo de las membranas L-PRF para la puesta a punto del protocolo de recogida del secretoma. 59
Figura 9. Caracterización de las subpoblaciones de VEs derivadas de CP: MVs y exosomas 90
Figura 10. Análisis de biología de sistemas (FunRich) de las proteínas identificadas en las muestras de VEs aisladas a días 2 y 7 de almacenamiento de los CP..... 92
Figura 11. Análisis de las proteínas aumentadas a día 7 de almacenamiento que participan en en la ruta de la glicólisis mediante biología de sistemas con Cytoscape-Wikipathway 97
Figura 12. El análisis de citometría de flujo confirma la variabilidad en el número de MVs liberadas por las plaquetas entre las muestras y el tiempo de almacenamiento 98
Figura 13. Confirmación del aumento de los niveles de CD9, ACTN1 e ITA2B en las VEs liberadas por los CP a días 4 y 7 de almacenamiento 100
Figura 14. Selección de las condiciones adecuadas de recogida del secretoma de las membranas L-PRF 102
Figura 15. Selección de los tiempos de recogida del secretoma de las membranas L-PRF. 104

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 16. Electroforesis bidimensional de las proteínas liberadas por las membranas L-PRF recogidas a día 7 105
Figura 17. Electroforesis bidimensional de las proteínas liberadas por las membranas L-PRF según el momento de la recogida del secretoma 105
Figura 18. Análisis de biología de sistemas del secretoma de las membranas L-PRF 108
Figura 19. Análisis cuantitativo de factores de crecimiento en los secretomas de las membranas L-PRF a días 3 y 7 111
Figura 20. Inmunodetección de varias proteínas expresadas diferencialmente en los secretomas de las membranas L-PRF recogidos a distintos tiempos.....116
Figura 21. Evaluación de distintas concentraciones de FBS sobre la proliferación celular a las 24 h.....118
Figura 22. Evaluación de distintas concentraciones de FBS sobre la migración celular.....119
Figura 23. Evaluación de distintas concentraciones de FBS sobre la migración celular a las 24 (A) y 72 horas (B).....120
Figura 24. Evaluación de distintas concentraciones de secretoma sobre la proliferación celular a las 24 h 122
Figura 25. Evaluación de distintas concentraciones de secretoma sobre la migración celular.....123
Figura 26. Evaluación de un rango bajo de concentraciones de secretoma sobre la proliferación celular a las 24 h 124
Figura 27. Evaluación de un rango bajo de concentraciones de secretoma sobre la migración celular.....125
Figura 28. Efecto del secretoma a distintas concentraciones y recogido a distintos tiempos sobre la proliferación celular a las 24 h 127
Figura 29. Efecto del secretoma a distintas concentraciones y recogido a distintos tiempos sobre la migración celular.....128
Figura 30. Evaluación de la citotoxicidad celular en el medio de osteoblastos tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF 129

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 31. Evaluación de la fosfatasa alcalina en el medio de osteoblastos tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF 130
Figura 32. Evaluación de proteínas relacionadas con la formación de hueso en el medio de osteoblastos tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF 131
Figura 33. Evaluación de citoquinas proinflamatorias en el medio de osteoblastos tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF 132
Figura 34. Evaluación de los depósitos de calcio en los osteoblastos a día 14 tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF 133
Figura 35. Evaluación de la expresión de OPG y RANKL en los osteoblastos a día 14 tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF 135
Figura 36. Evaluación de la citotoxicidad celular de las MSC tras la aplicación del secretoma de las membranas L-PRF 138
Figura 37. Evaluación de la fosfatasa alcalina de las MSC tras la aplicación del secretoma de las membranas L-PRF 139
Figura 38. Evaluación de proteínas relacionadas con la diferenciación osteogénica en las muestras de secretoma y en el medio de las MSC tratadas con estas muestras 140
Figura 39. Evaluación de citoquinas proinflamatorias en las muestras de secretoma y en el medio de las MSC tratadas con estas muestras 143
Figura 40. Evaluación de citoquinas proinflamatorias en las muestras de secretoma y en el medio de las MSC tratadas con estas muestras 144
Figura 41. Evaluación de factores de crecimiento en las muestras de secretoma y en el medio de las MSC tratadas con estas muestras ... 146
Figura 42. Imágenes representativas de los cristales de hidroxiapatita producidos por las MSC a día 21 de cultivo 148
Figura 43. Evaluación de los depósitos de calcio en las MSC a día 21 149

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figuras suplementarias

Figura Suplementaria 1. Análisis de componentes de las muestras de VEs a días 2 y 7 de almacenamiento en CP tratados con la tecnología Mirasol 228
Figura Suplementaria 2. Perfil del secretoma de las membranas L-PRF a día 3 de cultivo. 229
Figura Suplementaria 3. Análisis 1D-SDS-PAGE del secretoma de las membranas L-PRF a días 3 y 7 230
Figura Suplementaria 4. Análisis de componentes de las muestras de secretoma de las membranas L-PRF recogidas a distintos días de cultivo (2, 7 y 21) 231

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de tablas

Tabla 1. Principales factores de crecimiento que intervienen en procesos de regeneración 8
Tabla 2. Grado de reducción logarítmica de los patógenos más "comunes" con las distintas tecnologías 21
Tabla 3. Distribución de muestras atendiendo al análisis realizado para caracterizar y cuantificar las proteínas presentes en el secretoma de las membranas L-PRF 53
Tabla 4. Electroforesis monodimensional 66
Tabla 5. Programa de IEF para muestras en tiras IPG de 7 cm 67
Tabla 6. Anticuerpos empleados para inmunodetección. 76
Tabla 7. Selección de proteínas aumentadas en las VEs a día 7 de almacenamiento versus día 2 95
Tabla 8. Factores de crecimiento cuantificados en los secretomas de las membranas L-PRF a días 3 y 7 110
Tabla 9. Selección de proteínas encontradas diferencialmente expresadas en los secretomas de las membranas L-PRF comparando los días 3, 7 y 21 (d3, d7, d21) por SWATH (p-valor<0,05) 114

Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1. Proteínas identificadas en el análisis cualitativo del proteoma de las VEs presentes a distintos días de almacenamiento 232
Tabla suplementaria 2. Proteínas identificadas diferencialmente expresadas en el análisis cuantitativo del proteoma de las VEs presentes a distintos días de almacenamiento día 2 vs día 7. 257
Tabla suplementaria 3. Proteínas identificadas en el análisis cualitativo del secretoma de las membranas L-PRF a día 3 de cultivo 273
Tabla suplementaria 4. Proteínas identificadas en el análisis diferencial 1D-SDS-PAGE del perfil del secretoma recogido a días 3 y 7.. 295

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla suplementaria 5. Proteínas identificadas en el análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF por SWATH entre las condiciones día 3 vs día 7.....308
Tabla suplementaria 6. Proteínas identificadas en el análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF por SWATH entre las condiciones día 3 vs día 21.....321
Tabla suplementaria 7. Proteínas identificadas en el análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF por SWATH entre las condiciones día 7 vs día 21.....336

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

ºC	Centígrado
Å	Ángstrom
ACD	Ácido citrato dextrosa
ACTN1	α-Actinina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
ALP	Fosfatasa alcalina
APA2A1	Complejo proteico 2 relacionado con el adaptador alfa 1 de clatrina
AREG	*Amphiregulin*
ATP	Adenosín trifosfato
B. burgdorferi	*Borrelia burgdorferi*
BC	*Buffy coat*
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bFGF	*basic Fibroblast growth factor*
BMP	Proteína morfogénica ósea
BPI	*Bactericidal permeability-increasing protein*
BSA	Albúmina
CA2	Anhidrasa carbónica-2
CAH1	Anhidrasa carbónica-1
CAP7	Azurocidina
CAPN1	*Calpain-1 catalytic subunit*
CATG	*Cathepsin G*
CATS	*Cathepsin S*
CCL5	Ligando 5 de la quimiocina CC
CE	Certificación europea
CE	*Collision energy*
CFL1	Cofilina
CH	Concentrados de hematíes

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CMV	Citomegalovirus
CO3	Complemento 3
CO4	Complemento 4
Cols.	Colaboradores
CP	Concentrados de plaquetas
CPD	Citrato fosfato dextrosa
CRP	Concentrados ricos en plaquetas
CSF1R	*Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor*
CUR	*Curtain gas*
DDA	*Data dependent acquisition*
DDL	Distribución de luz
DEF3	*Neutrophil defensin 3*
DIA	*Data-independent acqusition*
DKK1	*Dickkopf-related protein 1*
DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	*Standard deviation*
DSTN	Destrina
DTT	Ditiotreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPN4	*Clathrin interactor 1*
EVs	*Extracellular vesicles*
FBLN3	*EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*
FBS	*Fetal bovine serum*
FDA	*Food and Drug Administration*
FDR	*False discovery rate*
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FIBA	Cadena α de fibrinógeno

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FIBB	Cadena β de fibrinógeno
Fig.	Figura
FINC	Fibronectina
FITC	*Fluorescein IsoTioCyanate*
FT	Factor tisular
GDF-15	Factor de diferenciación de crecimiento-15
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GP	Glicoproteína
GSN	*Gelsolin*
GSTO1	*Glutathione S-transferase omega-1*
GSTP	*Glutathione S-transferase P*
Gy	Grey
h	horas
HBA	Subunidad α de la hemoglobina
HBB	Subunidad β de la hemoglobina
HBD	Subunidad γ de la hemoglobina
HBEGF	*Heparin-binding EGF-like growth factor*
HDGF	Factor de crecimiento derivado de hepatoma
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
hMSC	*human Mesenchymal Stem Cells*
IBP	*Insulin-like growth factor-binding protein*
ICAM3	*Intercellular adhesion molecule 3*
IDCR	*Ionic Detergent Compatibility Reagent*
IEF	Isoelectroenfoque
IFN γ	Interferón γ
IGF-1	Factor de crecimiento insulinoide
IL	Interleuquina
INS	Insulina
IPG	*Immobilized pH gradients*
ISEV	*International Society of Extracellular Vesicles*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ISVF	*Ionspray voltaje floating*
ITA2B	Integrina αIIb
ITB1	Integrina β1
K. penumoniae	Klebsiella pneumonieae
kDa	Kilodalton
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
KIT	*Mast/stem cell growth factor receptor Kit*
KITLG	*LG Kit ligand*
LC	Cromatografía líquida
LC/MS-MS	MS-MS Cromatografía líquida acoplada a masas en tándem
LDH	Lactato deshidrogenasa
L-PRF	*Leukocyte Platelet Rich Fibrin*
L-PRF	*Leukocyte Platelet Rich Plasma*
LTBP	*Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2*
LXR/RXR	Receptor X hepático/Receptor X retinoide
LYAM	P-selectina
M	Molar
m/s	masa/carga
mA	Miliamperios
MCP-1	*Monocyte chemoattractant protein 1*
MEM	Medio esencial mínimo
MET	Microscopía electrónica de transmisión
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MMP	Metaloproteinasas
MPO	Mieloperoxidasa
ms	milisegundos
MS/MS	Masas en tándem

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MSC	Células madre mesenquimales
MSCF	Factor de crecimiento de células progenitoras
MTT	*Metil tiazol tetrazolium*
MVs	Microvesículas
MYL6	*Myosin light polypeptide 6*
NE	*Neutrophil elastase*
ng	nanogramo
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblast
NHO	Normal Human Osteoblast
NK	*Natural Killer*
nm	nanómetro
nM	nanomolar
OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
P. falciparum	*Plasmodium falciparum*
PAS	Solución aditiva de plaquetas
PBS	Tampón fosfato salino
PC	*Platelet concentrates*
PCA	Análisis de componentes principales
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDVF	Polifluoruro de vinilideno
PE	Ficoeritrina
PERM	Mieloperoxidasa
PF4	*Platelet factor 4*
PFC	Plasma fresco congelado
PGI2	Prostaciclina
PLGF	Factor de crecimiento de placenta
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
PPP	Plasma pobre en plaquetas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

P-PRF	*Pure Platelet Rich Fibrin*
P-PRP	*Pure Plaletel Rich Plasma*
PRDX	Peroxiredoxina
PROK1	*Prokineticin 1*
PRP	Plasma rico en plaquetas
RAB7A	*Ras-related protein Rab-7a*
RANK	Receptor activador nuclear kappa β
RANKL	Ligando receptor activador nuclear kappa β
RANTES	*Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted cytokine*
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
S. epidermidis	*Staphylococcus epidermidis*
SARS-CoV	Síndrome respiratorio agudo
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SOMA	Somatotropin
SOST	Sclerostin
SWATH-MS	*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra*
T. cruzi	Trypanozoma cruzi
T. pallidum	Treponema pallidum
TBS-T	Tampón salino + Tween
TCA	Ácido tricloroacético
TGF	*Transforming growth factor*
TLN1	Talina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNR	*Tumor necrosis factor receptor superfamily member*
TOF	*Time of flight*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TR11B	*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B*
TRALI	Lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión
TRFL	Lactotransferrina
TSP1	Trombospondina 1
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VEs	Vesículas extracelulares
VHA	Virus hepatitis A
VHB	Virus hepatitis B
VHC	Virus hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VMP	Volumen medio plaquetar
Y. enterocolitica	*Yersinia enterocolitica*
µl	Microlitro
µm	Micrómetros

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1 LA SANGRE: COMPOSICIÓN Y FUNCIONES

La sangre es un fluido biológico cuya función principal es el transporte de oxígeno y nutrientes a los órganos y tejidos y la eliminación de los productos de desecho. Además, participa en la respuesta inmunitaria y la defensa contra agentes externos. Esta se compone de una parte líquida, el plasma, que constituye el 55% de la sangre total, y de células en suspensión provenientes de la médula ósea: glóbulos rojos, blancos y plaquetas (1).

- Glóbulos rojos o eritrocitos: Son el tipo celular más abundante en la sangre ($4{,}5 \times 10^{12}$/l), se producen en la médula ósea y tras un proceso de maduración se liberan al torrente sanguíneo. Tienen forma de disco bicóncavo, son anucleados y poseen un diámetro de entre 7 y 10 micras. Su función principal es el transporte de oxígeno que es posible gracias a la hemoglobina, proteína también encargada de conferir el color rojo característico a estas células. Su vida media es de 120 días y tras ese tiempo los eritrocitos son fagocitados por macrófagos y eliminados en el hígado o en el bazo (2).

- Glóbulos blancos o leucocitos: Son menos abundantes que los hematíes y los valores en sangre en una persona adulta se encuentran entre 4-11 $\times$ 10^9/l. También se producen en la médula ósea, pero existen diferentes tipos según el progenitor hematopoyético del que derivan dando lugar a dos grupos: los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y los agranulocitos (monocitos y linfocitos). Sin embargo, todos ellos tienen un papel en la respuesta inmunitaria, migrando desde el sistema circulatorio al lugar de la herida atraídos por distintas señales químicas.
    - Neutrófilos: Son células polimorfonucleares, pertenecientes al grupo de los granulocitos y constituyen aproximadamente el 70% de los glóbulos blancos. Su periodo de vida media es muy corto, durando horas o días. Son las primeras células que acuden al lugar de la inflamación y su función principal es la fagocitosis. Además, presenta gránulos en el citoplasma que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

contienen enzimas y proteínas que son liberadas en el lugar de la infección y ayudan a contenerla (3).

- Eosinófilos: Son granulocíticos y polimorfonucleares caracterizados por su núcleo bilobulado y representan alrededor del 4% del total de leucocitos circulantes. Este tipo se moviliza en presencia de parásitos y las proteínas granulares son responsables de funciones proinflamatorias relacionadas con las alergias (3).
- Basófilos: Son los leucocitos menos abundantes, constituyen el 1% o menos del total, y poseen un núcleo irregular. Juegan un papel crucial en las reacciones de hipersensibilidad inmediata (3) debido a la presencia de receptores de inmunoglobulina E en su interior.
- Monocitos y linfocitos: Son los leucocitos que carecen de gránulos en su interior y representan el 25% del total. Los monocitos permanecen poco tiempo en el torrente sanguíneo (24-36 horas) pues rápidamente migran a los tejidos para diferenciarse a macrófagos. Tanto los monocitos circulantes como los macrófagos se encargan de fagocitar a los microorganismos invasores y presentar sus antígenos a los linfocitos, estimulando el sistema inmunitario. Los linfocitos son los encargados de la producción de los anticuerpos y de estimular el sistema inmunitario con la liberación de citoquinas reclutando otros tipos celulares (3).

- Plaquetas: Son el tipo celular más pequeño presente en la sangre, tienen un diámetro de entre 2-5 µm y carecen de núcleo. Estas particulares características se deben a que las plaquetas son fragmentos generados en la médula ósea a partir de una célula precursora llamada megacariocito. Se encuentran en el torrente sanguíneo a una concentración comprendida entre 150-400 $\times$ 10^9/l y poseen una vida media de 7 a 10 días (3). Su función principal es mantener la integridad vascular y la hemostasia.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Plasma: Es la parte líquida de la sangre y está compuesto mayoritariamente por agua (92%), y una mezcla de proteínas (7%), azúcares, grasas, sales minerales y vitaminas (1, 2). El plasma se encarga del mantenimiento de la presión, el volumen y de la amortiguación del pH sanguíneo. Además, es el vehículo de las células sanguíneas, nutrientes, hormonas, productos de desecho, factores de coagulación y anticuerpos, confiriéndole estos últimos un papel clave en la coagulación y en la inmunidad (3).

1.1.1 Papel de las plaquetas en hemostasia, inmunidad, inflamación y cierre de heridas

Las plaquetas se encuentran en estado de reposo mientras circulan por el torrente sanguíneo gracias a la producción de moléculas inhibitorias que libera el endotelio vascular. Cuando se produce un daño en la superficie vascular, el endotelio deja de producir esas señales inhibitorias y a su vez expone una serie de componentes de la matriz subendotelial (colágeno y laminina) que interaccionan con las plaquetas circulantes (4). A partir de ese momento se desencadena el proceso de adhesión seguido por el de activación plaquetaria (Figura 1).

Esto provoca un aumento de los niveles de calcio citoplasmático, lo que conlleva la liberación de mediadores contenidos en los gránulos intracelulares que continúan retroalimentando la activación, además de favorecer el reclutamiento de otras plaquetas para formar el tapón hemostático (4).

Entre las moléculas que se liberan durante la degranulación plaquetaria, se encuentra el factor tisular (FT) que desencadena la activación del sistema de coagulación dando lugar a la formación de un coágulo estable.

El papel principal del FT es generar trombina que es la molécula más importante en términos de retroalimentación de la cascada. Tras el daño vascular producido, el factor VII, que circula por el torrente sanguíneo, se encuentra con el FT liberado por las plaquetas y forman un complejo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que activan a otros factores de la cascada, el IX y X. Una vez el factor X se activa convierte la protrombina en trombina, potente activador plaquetario, que a su vez activa y libera otros factores de la cascada de la coagulación retroalimentándola. Finalmente, la trombina es la encargada de transformar el fibrinógeno en fibrina dando lugar a la formación de un coágulo estable gracias a la ayuda del factor XIII (4). En este coágulo de fibrina se quedan atrapadas plaquetas y leucocitos que seguirán liberando su contenido, contribuyendo así a la resolución de la inflamación y al cierre de la herida.

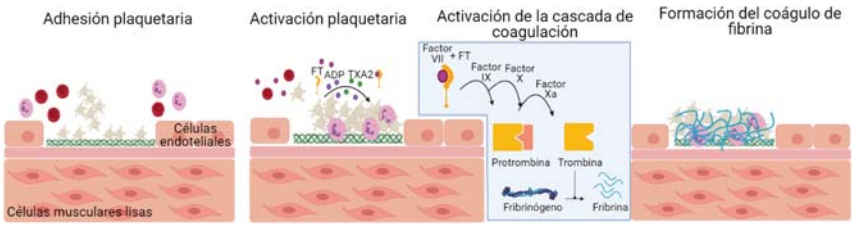


Figura 1. Papel de las plaquetas en la hemostasia. Imagen elaborada por la doctoranda con el programa Biorender.

Las plaquetas también participan en inmunidad, inflamación y cierre de heridas. Su papel en estos procesos radica en el contenido de los gránulos que se liberan tras su activación. Se han identificado más de 300 agentes bioactivos, algunos procedentes de los megacariocitos y otros eliminados del plasma concentrándose en los gránulos de las plaquetas (5, 6) .

Entre las moléculas identificadas se encuentran factores que intervienen en la coagulación (Factor V y fibrinógeno), quimioquinas y citoquinas (PF4 y RANTES), que intervienen en inflamación e inmunidad, y factores de crecimiento que participan en procesos de regeneración tisular.

Los factores de crecimiento son múltiples y variados y presentan una amplia heterogeneidad en sus funciones y también en sus orígenes, puesto que pueden ser liberados por otros tipos celulares (Tabla 1). Entre todos ellos, destaca TGFβ-1 por ser el factor más abundante en plaquetas y por intervenir en las fases del proceso de curación de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

heridas. Entre sus funciones están el reclutamiento de células inflamatorias al lugar de la herida, la angiogénesis, la reepitelización, y la producción de matriz extracelular por parte de los fibroblastos (7). Otro factor relevante y exclusivo de plaquetas, PDGF, tiene propiedades quimioatrayentes sobre fibroblastos y células musculares, además de poseer la capacidad de inducir proliferación celular en células mesenquimales (8). Cabe también destacar la principal isoforma de FGF presente en plaquetas, FGF-2, porque promueve la angiogénesis y la cicatrización de heridas, esta última mediante la síntesis de ácido hialurónico por parte de los fibroblastos (9, 10). Los factores también participan en resolución de la inflamación estimulando la expresión de proteínas que aumentan la adhesión leucocitaria, como es el caso de VEGF (11, 12).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Principales factores de crecimiento que intervienen en procesos de regeneración.

Factores de crecimiento	Origen celular	Efectos
EGF	Plaquetas y macrófagos	Regula la migración y proliferación epitelial y fibroblástica (13, 14).
FGF	Plaquetas, macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos	Posee propiedades quimioatrayentes sobre macrófagos, fibroblastos y células endoteliales y regula la migración de estos últimos tipos celulares. Además interviene en la síntesis de colagenasa (13). También tiene propiedades mitogénicas sobre células mesenquimales y osteoblastos (14).
IGF-1	Plaquetas, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales y osteoblastos	Tiene propiedades quimioatrayentes sobre los fibroblastos y estimula la síntesis de proteínas (14). Además, promueve la diferenciación y proliferación de osteoblastos (15).
PDGF	Plaquetas, células endoteliales, macrófagos	Tiene actividad mitogénica sobre células mesenquimales, osteoblastos y fibroblastos (15). Además, posee propiedades quimiotrayentes sobre neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células madre mesenquimales. También regula la proliferación fibroblásica y la síntesis de colágeno y colagenasa (13, 14).
TGFα y TGFβ	Plaquetas, macrófagos, linfocitos T y queratinocitos	Está implicado en la sístesis de colágeno y colagenasa. Regula la proliferación y migración fibroblástica y epitelial (13). Además, estimula la proliferación de células mesenquimales en estadios indeferenciados y la mitogénesis osteoblástica (15).
VEGF	Plaquetas, macrófagos, queratinocitos y células endoteliales	Induce la angiogénesis y estimula la migración y proliferación de células endoteliales (14).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1.2 Papel de los leucocitos en inmunidad, inflamación y cierre de heridas

Existen diferentes tipos de leucocitos y cada uno de ellos tiene unas funciones determinadas, como se especificó en el apartado 1.1. Sin embargo, la función principal de los leucocitos es participar en el proceso de inmunidad e inflamación contribuyendo en parte al cierre de heridas.

En la inmunidad interviene el sistema innato y el adaptativo, que protegen al individuo de las infecciones, y en el que juegan un papel esencial los leucocitos. Los monocitos, macrófagos, neutrófilos y células *Natural Killer* (NK) participan principalmente en la inmunidad innata, mientras que los linfocitos intervienen en la inmunidad adaptativa.

El sistema inmune innato no es específico, se activa cuando detecta la presencia de múltiples invasores como virus, bacterias, parásitos o toxinas de manera que intenta eliminarlos. La activación ocurre a través del reconocimiento de patrones moleculares de agentes microbianos por parte de los receptores tipo TOLL, expresados en la superficie de la membrana de células del sistema inmune (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y linfocitos T y B) (16). Tras la interacción, se induce la secreción de citoquinas, principalmente de interferón α, y de otras moléculas coestimuladoras, que desencadenan la acción de defensa por parte de los neutrófilos, monocitos-macrófagos y células dendríticas.

Los neutrófilos se encargan de la fagocitosis y lisis de los microorganismos mediante la acción de enzimas procedentes de sus gránulos y lisosomas. Entre ellos, se encuentran proteasas, como las metaloproteinasas (por ejemplo, MMP9), que se encargan de destruir la matriz extracelular además de colagenasas y elastasas. Además, procedentes de los distintos gránulos también se liberan un gran número de proteínas y enzimas con actividad microbicida como la azurocidina, cathepsina G, lactoferrina, o mieloperoxidasa (MPO). Esta última

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

transforma el peróxido de hidrógeno a ácido hipocloroso contribuyendo a la formación de especies reactivas de oxígeno (17). Adicionalmente, la MPO, junto con la neutrophil elastase (NE) participan en el proceso de netosis, un mecanismo de muerte celular programada que consiste en la liberación del contenido granular junto con proteínas nucleares incluyendo histonas y cromatina (18).

Los macrófagos también intervienen en la fagocitosis y secretan citoquinas y moléculas que inducen efectos proinflamatorios. Entre ellas están las proteínas del sistema del complemento que, además de producir péptidos proinflamatorios (C3a, C4a y C5a), se encargan de la opsonización de patógenos, la lisis de microorganismos y la activación de los linfocitos. Las citoquinas o interleuquinas liberadas para luchar contra los patógenos, estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos y monocitos y participan también en la inflamación. Los macrófagos representan la conexión entre los dos tipos de inmunidades, ya que se encargan de procesar los antígenos y presentarlos a los linfocitos a través de las moléculas de histocompatibilidad (16).

Las células NK son una subclase de linfocitos que destruyen las células infectadas y liberan grandes cantidades de interferón γ (IFNγ) potenciando la función fagocítica del macrófago, encargándose además de la presentación de antígenos a través de las moléculas de histocompatibilidad.

La inmunidad adaptativa es específica, puesto que reconoce diferentes tipos de antígenos, y diversa ya que responde a una amplia variedad de ellos. Además, posee memoria y está especializada en generar respuestas óptimas para la defensa contra distintos microorganismos. Los leucocitos que se encargan de esta parte de la inmunidad son los linfocitos. Generan una respuesta humoral, basada en la producción de anticuerpos, principalmente mediada por los linfocitos B que reconocen antígenos y los presentan a los linfocitos T colaboradores específicos, desencadenando la liberación de citoquinas. La secreción de citoquinas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

específicas por parte del linfocito T produce la liberación de inmunoglobulinas concretas por parte de los linfocitos B (16).

En la respuesta inmune celular las células dendríticas o los macrófagos presentan los antígenos a los linfocitos T, de manera que estos se diferencian a linfocitos T efectores y de memoria. A su vez, una subpoblación de linfocitos T CD4+ migran al sitio de inflamación y liberan las citoquinas que estimulan la eliminación de los microorganismos por parte de los macrófagos, además de inducir la diferenciación de los linfocitos B y la secreción de anticuerpos (16).

1.1.3 Interacción entre plaquetas y leucocitos en el cierre de heridas

El conjunto de todas las moléculas liberadas por los distintos leucocitos favorece la migración de distintos tipos celulares al lugar donde se encuentra un patógeno para eliminarlo, o en el caso de una herida, a esa zona para contribuir a su cierre.

El sistema inmunitario se activa en cuanto se produce una herida. Primero actúan las plaquetas deteniendo el sangrado, y a continuación son los leucocitos los que acuden al lugar para, mediante la liberación del contenido granular, proceder a la desinfección de la zona. Es en este momento cuando receptores tipo TOLL de las plaquetas (TLR4, 2 y 7) interaccionan con los neutrófilos regulando el proceso de netosis, la liberación de especies reactivas de oxígeno y el contenido granular para limitar la expansión de posibles microorganismos que hayan entrado a través de la herida y facilitar su eliminación (15, 19). Sin embargo, el proceso de netosis puede desencadenarse por la propia presencia de patógenos, por el reconocimiento de lipopolisacáridos de paredes bacterianas por parte de los neutrófilos a través de sus receptores, por anticuerpos, inmunocomplejos o citoquinas (IL-8 y TNF) (19).

Los monocitos también migran al lugar de la herida adhiriéndose a la zona y secretando moléculas inflamatorias para atraer más células y ejercer además actividades proteolíticas. Adicionalmente, las plaquetas pueden modular a los monocitos induciendo la activación de NF-kb, un mediador de la inflamación y activador de la diferenciación de células

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inmunitarias. La interacción entre células dendríticas y plaquetas, a través de CD40-CD40L, también facilita la presentación de antígenos a los linfocitos T y la liberación de CD40L facilitando la interacción con otros leucocitos (15).

Asimismo, las moléculas liberadas por las plaquetas en la zona de la herida (PF4, RANTES, IL-1) previenen la apoptosis de monocitos y favorecen su diferenciación a macrófagos (20), estimulando la liberación de más citoquinas proinflamatorias con propiedades quimioatrayentes sobre otros tipos celulares desencadenando las siguientes fases de la resolución de una herida.

1.2 MEDICINA TRANSFUSIONAL

La medicina transfusional, perteneciente a la rama de la hematología y hemoterapia, se encarga del estudio de la transfusión de la sangre y sus derivados.

Esta rama de la medicina se remonta al siglo XVII donde se consiguió con éxito, y por primera vez, la transfusión humano-humano. Sin embargo, la medicina transfusional moderna comenzó en el año 1900 con el descubrimiento de los grupos sanguíneos por Karl Landsteiner. Desde ese momento, otros hallazgos fueron sucediendo en los años posteriores, entre ellos la introducción de anticoagulantes como el citrato sódico, que años más tarde derivaría en ácido citrato dextrosa (ACD), permitiendo prolongar el tiempo de almacenamiento de la sangre.

A partir de los años 50, este campo de la medicina empezó a evolucionar a pasos agigantados con el desarrollo de nuevos materiales para la recolección de la sangre y la introducción de metodologías para el fraccionamiento y la conservación de los distintos componentes sanguíneos. Con la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en los años 80, se desarrollaron múltiples métodos de detección, análisis, procesamiento y tratamiento de la sangre para disminuir los riesgos asociados a las transfusiones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por ello, en la actualidad, la medicina transfusional abarca diferentes materias desde la epidemiología y la estadística pasando por la microbiología y la biología molecular hasta la inmunología y la histocompatibilidad e inmunogenética entre otras (21). Esta especialidad de la medicina comprende, además de los componentes sanguíneos, la terapia celular y de tejidos y la inmunoterapia.

1.2.1 Transfusión sanguínea: Aplicaciones terapéuticas y posibles reacciones adversas

La transfusión es una operación en la cual un paciente recibe sangre o componentes sanguíneos por vía intravenosa. Está indicada especialmente para reponer de forma rápida la sangre perdida por hemorragia, pero también sirve para tratar anemias graves.

Antes de realizar una transfusión se tienen en cuenta muchos parámetros (edad, enfermedad de base, sintomatología) ya que es un tratamiento transitorio y si no se identifican bien las causas que obligan a la transfusión, la deficiencia volverá a producirse. Además, este tratamiento puede causar efectos adversos de gravedad variable a pesar de haberse reducido considerablemente gracias al desarrollo de nuevas tecnologías y al avance del conocimiento en la materia. Por tanto, se debe tener en cuenta la relación entre el beneficio y el riesgo de un efecto indeseable siempre que se valora la posibilidad de transfundir.

Las principales razones por las que se pauta una transfusión son: La pérdida de sangre como consecuencia de una intervención quirúrgica, una herida o una enfermedad, la incapacidad de producción de componentes sanguíneos por causa de enfermedades crónicas de la sangre o tratamientos que pueden afectar a la médula ósea, y evitar complicaciones derivadas de enfermedades de la sangre o trastornos hemorrágicos (anemia falciforme, talasemia, hemofilia o enfermedad de von Willebrand).

En definitiva, una transfusión se realiza con el fin de reponer una pérdida de sangre o de algún componente de la misma. A pesar de que se puede transfundir sangre completa, lo común es administrar los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

componentes sanguíneos que necesita el paciente disminuyendo el riesgo de sufrir reacciones adversas.

Las complicaciones que pueden aparecer tras una transfusión son múltiples y variadas. Se clasifican en inmediatas o retardadas atendiendo al tiempo que pasa entre la administración de los hemoderivados y su manifestación clínica.

En las reacciones postransfusionales de aparición inmediata se hace distinción entre las hemolíticas y no hemolíticas. Las hemolíticas producen la destrucción de los glóbulos rojos por una reacción entre los anticuerpos plasmáticos del receptor contra el antígeno eritrocitario del donante. Este tipo de reacciones se producen normalmente por incompatibilidad ABO por error en la identificación de las unidades (22). Las reacciones no hemolíticas son causadas por otras interacciones específicas entre los componentes del producto a transfundir y el receptor dando lugar a reacciones febriles, alérgicas, hipervolémicas, bacterianas y a la lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (TRALI). Dichas reacciones se describen brevemente a continuación:

- Las reacciones febriles se producen por la interacción de leucocitos y citoquinas del producto transfundido con los anticuerpos del receptor. En cambio, en las alérgicas la reacción ocurre entre las proteínas plasmáticas del producto a transfundir con antígenos del receptor (22).
- Las hipervolémicas se desencadenan por una administración excesiva de volumen o una transfusión demasiado rápida provocando una sobrecarga circulatoria (23).

- La reacción por contaminación bacteriana tras la transfusión tiene su origen en el crecimiento de bacterias en los productos sanguíneos almacenados a temperaturas no adecuadas o durante más tiempo del debido. La sepsis bacteriana es más común tras la transfusión de plaquetas (con una mortalidad del 26%) debido a su temperatura de almacenamiento. Esta complicación es de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

sobra conocida porque muchos de los organismos que las provocan están implicados en sepsis relacionadas con catéteres (24).

- La lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (TRALI) se ha atribuido a la transferencia pasiva de anticuerpos antileucocitos en el donante que reaccionan con aloantígenos en los leucocitos del receptor, tales como aloanticuerpos contra HLA-A, HLA-B y aloanticuerpos contra antígenos específicos de granulocitos que reaccionan con los neutrófilos del receptor (25, 26). Es una complicación que todavía está infradiagnosticada y es potencialmente mortal.

Todas las reacciones comentadas anteriormente se producen durante el proceso de transfusión o inmediatamente después. Sin embargo, hay otras que pueden originarse entre las 24 horas o los 30 días posteriores a la transfusión. Entre ellas se encuentran algunas reacciones que no son inmunitarias (hemosiderosis y transmisión de infecciones) y otras donde interviene el sistema inmunitario (aloinmunización y enfermedad injerto contra huésped):

- La hemosiderosis puede producirse en pacientes que reciben transfusiones frecuentemente por sobrecarga de hierro depositándose este en órganos vitales.
- La transmisión de infecciones por medio de la transfusión es un riesgo existente. El aumento del control de los donantes y el desarrollo de metodologías precisas para la detección de los virus más comunes (VIH, VHB y VHC) han permitido disminuir el riesgo de transmisión de estas enfermedades asociadas a la transfusión.
- La reacción de aloinmunización ocurre cuando el receptor produce anticuerpos contra los antígenos de productos transfundidos anteriormente pudiendo estimular una respuesta inmunológica en futuras transfusiones. Esto puede producirse tras la transfusión de eritrocitos o de plaquetas, generando en el último caso lo conocido como refractariedad plaquetaria, es decir, anticuerpos antiplaquetas que causan la inhibición de las plaquetas administradas (22).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- La enfermedad injerto contra huésped es una reacción debida a una respuesta inadecuada del organismo frente a la incorporación de linfocitos T presentes en el producto a transfundir. Esta complicación se ha reportado con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos o cuyo sistema inmunológico se encuentra alterado (24).

1.2.2 Métodos de fraccionamiento y almacenamiento de los componentes sanguíneos

Generalmente hoy en día no se transfunde sangre total o completa, sino la parte que le hace falta al paciente, lo que conlleva a fraccionar los componentes de la misma. Dependiendo del motivo por el que se pauta la transfusión, se utiliza un producto u otro permitiendo seleccionar el más adecuado y disminuyendo además los posibles efectos adversos.

Como se ha descrito anteriormente, cada componente sanguíneo tiene unas características propias, esto hace que sea necesario aplicar diferentes métodos de separación, almacenamiento y conservación para cada uno de ellos (Figura 2).

Concentrados de hematíes (CH): Los productos utilizados para transfusión de hematíes son los concentrados de los mismos. Una posibilidad de obtenerlos es mediante eritroaféresis, pero la forma más habitual es mediante centrifugación de una donación de sangre total. En una donación de sangre se extrae un volumen aproximado de 500 ml que se recogen en una bolsa con una solución conservante (63 ml) de citrato fosfato dextrosa (CPD). La bolsa se centrifuga a una velocidad intensa de manera que los hematíes sedimentan en el fondo, el plasma se queda en la parte superior y se obtiene una capa leucoplaquetaria entre estas dos fases. Tras retirar las fases superiores, se añade a los glóbulos rojos una solución conservante que contiene glucosa, adenina, cloruro sódico y manitol situando el volumen del producto entre los 200 y 300 ml (27). Para disminuir al máximo el riesgo de reacciones adversas, es habitual introducir un paso de leucoreducción tras la separación de los componentes celulares con el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fin de obtener un recuento leucocitario lo más bajo posible, siendo aceptable un valor inferior al millón por CH.

El almacenamiento de los concentrados varía según su procesado, aquellos en solución con manitol pueden almacenarse hasta 42 días a temperaturas entre 1-6ºC. En ocasiones, los CH se someten a una irradiación γ de 25 Gy para reducir más todavía el riesgo de reacciones postransfusionales, disminuyendo a su vez el tiempo de almacenamiento hasta un máximo de 28 días (27).

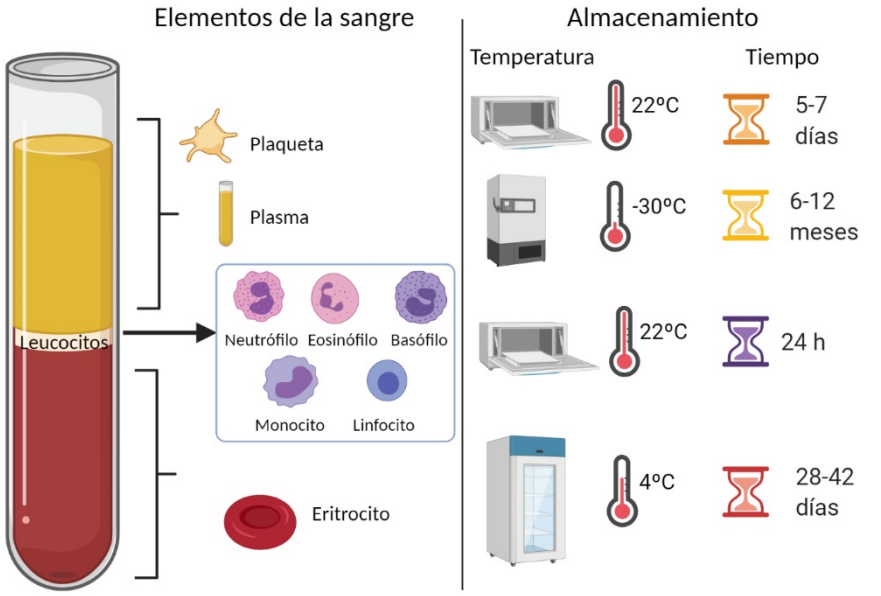


Figura 2. Conservación de los elementos de la sangre. Imagen elaborada por la doctoranda con el programa Biorender.

Concentrados de plaquetas (CP): A pesar de que las plaquetas se transfunden como concentrados, existen diferentes tipos dependiendo de los métodos de preparación y fraccionamiento de los mismos.

Los CP pueden obtenerse por aféresis de un único donante, donde las plaquetas quedan suspendidas a una concentración superior a $2,5 \times 10^{11}$ en un volumen de 250 ml aproximadamente de plasma (20-35%) y solución aditiva de plaquetas (PAS) (65-80%) (28). La solución aditiva

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

es un medio con nutrientes empleado para el almacenamiento como sustitutivo del plasma por la presencia de enzimas en este que pueden afectar a las plaquetas durante su conservación.

Por otra parte, las plaquetas también pueden obtenerse mediante el fraccionamiento de donaciones de sangre total por dos procedimientos, el de plasma rico en plaquetas (PRP) o el de *buffy coat* (BC). El método de PRP se basa en una primera centrifugación de la sangre total a baja velocidad, de manera que se precipitan los hematíes y la gran mayoría de los leucocitos, quedando en el sobrenadante el PRP. Este sobrenadante se leucoreduce antes de centrifugarse la bolsa a alta velocidad para obtener las plaquetas en el sedimento, quedando en el sobrenadante el plasma pobre en plaquetas (PPP). Mediante una prensa o fraccionador automático se separan las dos fases, pero dejando un volumen de plasma (40-70 ml) en la bolsa de los CP como solución de conservación (29).

El método de BC también se basa en centrifugaciones seriadas, pero invirtiendo las velocidades. En este caso, la centrifugación de sangre total se realiza a alta velocidad de manera que se obtienen tres fases: un sedimento, donde se encuentran los glóbulos rojos, el sobrenadante, compuesto por plasma, y una capa intermedia, conocida por el nombre de BC, donde están presentes leucocitos y plaquetas. Tras la separación de las capas (obteniendo unidades de los distintos componentes sanguíneos) el BC se deja reposar entre 2-18 horas y se mezcla con BC de diferentes donantes (entre 4 y 6). Pasado ese tiempo, la mezcla de BC se centrifuga a baja velocidad con el objetivo de precipitar los hematíes y leucocitos residuales, obteniendo las plaquetas en el sobrenadante. Esta fracción es el CP y se recoge haciéndolo pasar a través de un filtro con el fin de reducir al mínimo la presencia de leucocitos residuales. Las plaquetas obtenidas de BC pueden conservarse en plasma, pero lo habitual en la práctica clínica es utilizar una mezcla de plasma (20-40%) y PAS (60-80%). Con este método de fraccionamiento y combinación de BC suelen obtenerse CP con una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

concentración de 3 x 10^{11} plaquetas en 250-300 ml de plasma y solución aditiva (27, 30).

Independientemente del método de obtención o fraccionamiento, los CP se almacenan en agitación horizontal continua, a una temperatura comprendida entre 20 y 24ºC y durante un tiempo máximo de 5 días. Las características especiales tanto de separación como de conservación de los CP, pusieron de manifiesto la necesidad de desarrollar metodologías con el objetivo de inactivar los linfocitos residuales y un gran rango de virus que pueden estar presentes en el plasma, además de una amplia gama de bacterias que pueden crecer debido a sus condiciones de almacenamiento. Estos tratamientos se conocen con el nombre de tecnología de reducción de patógenos. Estas técnicas se basan en el mismo fundamento, un agente químico se intercala en el ADN de virus, bacterias o células presentes en la muestra y lo inactiva tras someterlo a un pulso de radiación a una longitud de onda específica. Las diferencias entre las metodologías radican en la molécula presente en la solución aditiva, en la longitud de onda empleadas y en el efecto que producen en el ADN (Figura 3). En la actualidad, existen 2 métodos de reducción de patógenos aprobados para uso en CP basados en este principio: Intercept y Mirasol.

La tecnología de Intercept combina el uso de un psoraleno, amotosalen, con radiación ultravioleta A. El amotosalen se intercala entre los ácidos nucleicos y tras la aplicación de luz ultravioleta (320-400 nm) produce la formación de enlaces covalentes entre las bases pirimidínicas del ADN impidiendo la replicación y la transcripción. Esta metodología requiere de un paso adicional de adsorción para eliminar el amotosalen y sus fotoproductos. Sin embargo, fue la primera en recibir la certificación CE en el año 2002 y fue aprobada por la FDA en 2014 (31).

El sistema Mirasol utiliza la riboflavina (vitamina B2) para intercalarse entre los ácidos nucleicos de manera selectiva y provocar un daño irreversible cuando se somete a la luz ultravioleta (280-400 nm). En este

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

caso las bases de guanina aceptan electrones procedentes de la riboflavina, que en presencia de oxígeno molecular forman especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando daños en el ADN impidiendo su replicación y reparación (32). A diferencia de Intercept, esta metodología no necesita pasos adicionales de eliminación de derivados. No obstante, recibió la certificación CE en el año 2007 y actualmente se encuentra en fase de aprobación por la FDA (31).

A día de hoy existe otro método de reducción de patógenos para uso en CP pero que no utiliza compuestos fotosensibles. Esta tecnología llamada Theraflex, produce la formación de ciclobutanos en las bases pirimidínicas impidiendo la transcripción del ADN solamente aplicando luz ultravioleta de tipo C (33). Este sistema recibió la certificación CE en el año 2009 aunque presenta un grado menor de inactivación sobre virus como el del VIH (31).

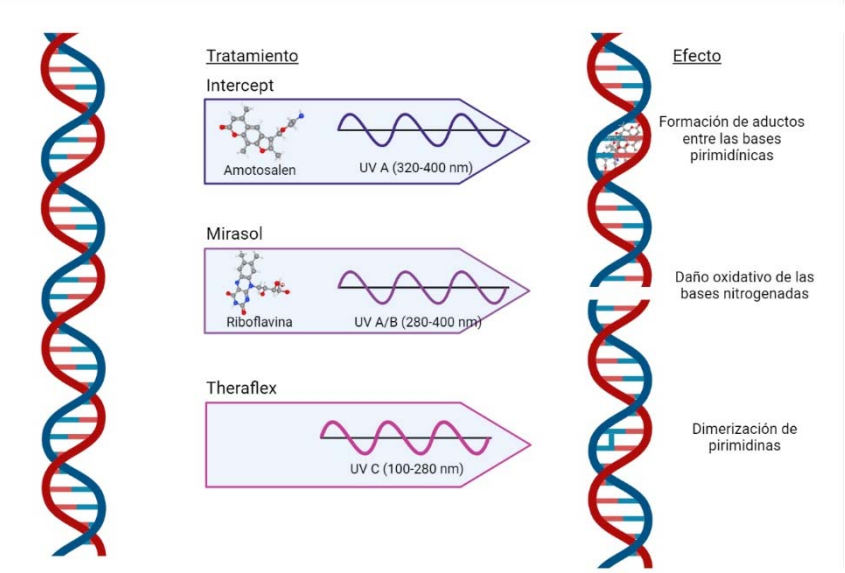


Figura 3. Diferencias entre las metodologías de reducción de patógenos empleadas para inactivar CP. Imagen elaborada por la doctoranda con el programa Biorender.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las tecnologías mencionadas anteriormente actúan inactivando una gran variedad de patógenos incluyendo virus, bacterias y parásitos. En la tabla 2 se especifica el grado de reducción de patógenos de estas tecnologías en CP.

Tabla 2. Grado de reducción logarítmica de los patógenos más "comunes" con las distintas tecnologías. (Tabla adaptada (30, 34))

	Amotosalen/UVA	Mirasol	Theraflex
Virus encapsulados			
VHB	> 5,5	2,3	-
VHC	> 4,5	3,2	-
VIH (asociado a células)	> 6,2	> 5,9	1,4
VIH (libre)	> 6,1	> 4,5	-
CMV (asociado a células)	> 5,9	-	-
Virus Influenza A (H5N1)	> 5,9	> 5	-
SARS-CoV	> 5,8	-	-
Virus no encapsulados			
VHA	0	1,8	-
Parvovirus B19	3,5 a 5,0	> 5	5,46
Bacterias			
S. aureus	≥ 6,6	≥ 4	> 4,8
S. epidermidis	≥ 6,6	4,2	4,8
E. coli	≥ 6,4	4,4	> 4
K. pneumonia	> 5,6	2,8	4,8
Y.enterocolitica	> 5,9	3,3	-
Espiroquetas			
T. pallidum	> 6,8	-	-
B. burgdorferi	> 6,8	-	-
Parásitos			
P. falciparum	> 5,3	6	-
T. cruzi	> 6	> 3,2	-

- (información no disponible), Citomegalovirus (CMV), Virus hepatitis A (VHA), Virus hepatitis B (VHB), Virus hepatitis C (VHC), Virus inmunodeficiencia humana (VIH)

Plasma fresco congelado (PFC): La parte líquida de la sangre se separa y almacena en las horas siguientes a la extracción para conservar al máximo las concentraciones de los diferentes factores de la coagulación. El plasma puede obtenerse también por aféresis o por centrifugación de la sangre completa, descrito en la obtención de CH, donde el plasma corresponde al sobrenadante. Este se congela y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

almacena a temperaturas inferiores de -30ºC como máximo durante 1 año o durante 6 meses a temperaturas de -18ºC o inferiores (27).

Del plasma deriva el crioprecipitado que es la fracción de proteínas plasmáticas insolubles al frío. Se obtiene tras la centrifugación de una unidad de PFC descongelada a 4ºC y se almacena como máximo un año a temperaturas inferiores a -30ºC. El crioprecipitado debe contener más de 70 U de factor VIII y 140 mg de fibrinógeno por unidad y está indicado en el tratamiento de deficiencias congénitas y adquiridas de los factores citados siempre y cuando no se disponga de concentrados del factor necesario viralmente inactivados (27).

El plasma también se somete a tratamientos adicionales para disminuir el riesgo residual de transmisión de enfermedades virales. Sin embargo, debido a que es un componente acelular y se almacena congelado durante largos periodos de tiempo, pueden aplicarse procedimientos que no son posibles en componentes lábiles como son los CH y CP. Entre esos procedimientos figura la cuarentena, que consiste en realizar las pruebas virales habituales en plasma y tras un periodo comprendido entre 3 y 6 meses, al mismo donante se le extrae plasma de nuevo realizando otra vez las pruebas virales para confirmar los resultados de las primeras, evitando transmisiones infecciosas debido al periodo de ventana (35).

Otra metodología para reducir la carga viral radica en someter al plasma a la acción de agentes físicos, como la pasteurización, o fisicoquímicos como el uso de detergentes o del azul de metileno, aunque estos últimos producen una reducción de los factores de la coagulación. La última opción se basa en la aplicación de psoralenos para inactivar los ácidos nucleicos de células presentes en el plasma así como posibles virus y bacterias (35).

1.2.3 Lesiones derivadas del almacenamiento

Las lesiones derivadas del almacenamiento se definen como cambios en los componentes de la sangre que alteran su función biológica.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los factores que favorecen estas alteraciones no solamente comprenden las condiciones de almacenamiento sino también las técnicas de extracción y fraccionamiento empleadas. Son muchas las variables presentes en todo el proceso, desde la extracción hasta la conservación, y en cada paso pueden originarse alteraciones en los componentes que tendrán un impacto en su función biológica.

Las principales variaciones que se producen en los componentes celulares de la sangre afectan a nivel morfológico o bioquímico y metabólico. A continuación, se describen las lesiones más características de cada uno de los productos transfusionales que afectan principalmente a nivel morfológico, metabólico y bioquímico (Figura 4).

Las lesiones principales de los eritrocitos se producen a nivel metabólico derivando en alteraciones morfológicas. Durante el almacenamiento se produce una acumulación de los productos procedentes de la glicólisis, protones principalmente, causando una disminución del pH. El descenso en el ratio de la glicólisis va acompañado de una menor producción de ATP, y por tanto de las reacciones celulares que requieren energía como la distribución de fosfolípidos de membrana o las reacciones del sistema de defensa antioxidante. Estos cambios tienen consecuencias a nivel morfológico, produciendo la pérdida de la deformabilidad de la membrana y la liberación de vesículas extracelulares (VEs) (36).

Otro cambio metabólico que ocurre durante el almacenamiento es la depleción de 2,3-difosfoglicerato, lo cual se traduce en un aumento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, reduciendo la capacidad de los eritrocitos de liberarlo en los tejidos (36, 37).

Las plaquetas también sufren lesiones a nivel metabólico similares a los glóbulos rojos. En los CP puede producirse la disminución del pH como consecuencia aumento de la producción de lactato a través de la glicólisis. Además, la actividad metabólica de los leucocitos residuales presentes y la liberación de enzimas y citoquinas también contribuyen

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a la acidificación del medio. Sin embargo, si la cantidad de plasma en el CP es suficiente, el bicarbonato presente actúa de tampón evitando variaciones en el pH (38). La función mitocondrial también puede verse alterada y va acompañada de un descenso de la producción de ATP. Todo ello indicaría lisis plaquetaria lo que conlleva a la reducción del volumen medio plaquetar (VMP).

Los cambios químicos que se producen en el medio durante la conservación y las fuerzas físicas a las que se someten los CP durante el fraccionamiento pueden producir la activación plaquetaria, que se caracteriza por múltiples cambios que serían indicativos de lesión derivada del almacenamiento. La activación produce un cambio morfológico, pasando de ser las plaquetas discoides a esféricas, emitiendo pseudópodos. Asociado a la activación, se producen cambios en la expresión de proteínas a nivel de la superficie de la membrana como el aumento de P-selectina o de glicoproteínas (GP). Asimismo, otro fenómeno que se produce es la degranulación plaquetaria. La concentración de moléculas como el factor plaquetario 4 o RANTES, entre otros, son indicadores del estado de los CP durante el almacenamiento (39).

1.2.3.1 Impacto del almacenamiento en el proteoma de los concentrados

En los últimos años varios investigadores se han centrado en el análisis de los diferentes factores que influyen en las lesiones de almacenamiento, pero a nivel bioquímico/proteico. Esto permite comprender los mecanismos mediante los cuales los concentrados se ven afectados tras el procesamiento y conservación, contribuyendo a la búsqueda de marcadores de lesiones de almacenamiento.

La ausencia de núcleo en los eritrocitos y las plaquetas ha permitido estudiar la composición de las proteínas y lípidos de membrana de estas células mediante técnicas proteómicas. Los estudios realizados en CH examinaron principalmente el factor del tiempo sobre el metabolismo y el proteoma de los eritrocitos. Las especies reactivas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de oxígeno se acumulan durante el almacenamiento y provocan cambios en proteínas estructurales como ankirina o espectrina (40) funcionales como la proteína banda 3 (41) o la hemoglobina (42) y enzimas glicolíticas (42, 43).

En el caso de los CP los estudios se centraron en el análisis del impacto de las distintas metodologías de reducción de patógenos sobre el proteoma de las plaquetas. Schubert y colaboradores analizaron el impacto de la tecnología Mirasol en CP durante el almacenamiento aplicando varias aproximaciones proteómicas y encontrando cambios en la expresión de proteínas citoesqueléticas, como la actina, y otras proteínas relacionadas con el tráfico de vesículas (44). Estos cambios a nivel de la organización del citoesqueleto y de proteínas asociadas a estrés oxidativo también se encontraron en CP tratados con la tecnología Intercept (45, 46). Además, se ha confirmado que el tiempo de almacenamiento también tiene un impacto sobre el proteoma plaquetario (47-50) y que a veces los cambios que provoca no se pueden diferenciar de los producidos por las tecnologías de reducción de patógenos (51).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

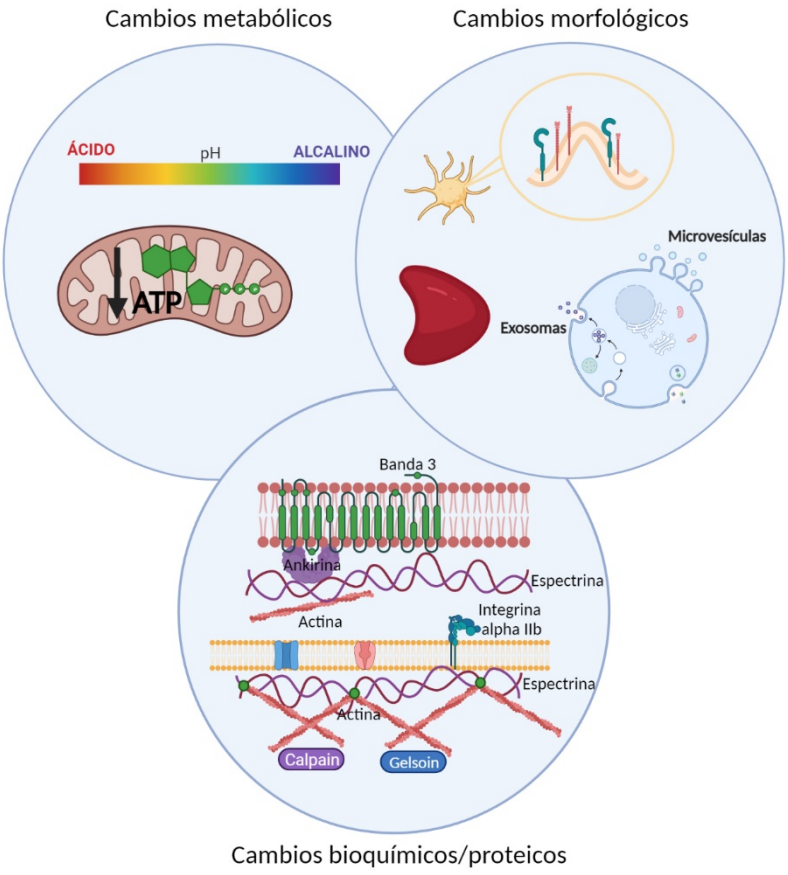


Figura 4. Lesiones derivadas del almacenamiento: Cambios a nivel metabólico, morfológico y bioquímico. Imagen elaborada por la doctoranda con el programa Biorender.

1.2.3.2 Evaluación de las lesiones derivadas del almacenamiento en los concentrados

Actualmente, los centros de transfusión realizan una batería de pruebas que permite evaluar la calidad de los productos tras el almacenamiento. El recuento celular y el volumen del concentrado ayudan a conocer el posible grado de lisis celular que se ha producido durante la conservación. El grado de hemólisis es un parámetro importante puesto que si es elevado podría derivar en reacciones adversas (23). Además,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

es conveniente hacer un recuento de leucocitos residuales debido a que su presencia también puede dar lugar a reacciones adversas, sobre todo en el caso de la transfusión de CP.

Los cultivos microbiológicos son otra prueba a superar, aunque en el caso de los productos irradiados el grado de contaminación es muy bajo. El pH, indicador del metabolismo e indirectamente de la morfología celular, también se analiza al igual que los niveles de O_2, CO_2, glucosa, lactato y bicarbonato. En el caso concreto de los CH se cuantifica el hematocrito y la concentración de hemoglobina. En los CP se evalúa la pérdida del efecto remolino o *swirling* y el aumento de la expresión de p-selectina y fosfatidilserina en la membrana de la plaqueta a través de citometría de flujo.

La presencia de VEs y su concentración es otro parámetro que está empezando a adquirir especial relevancia a día de hoy porque, como se ha comentado anteriormente, estas se liberan en ambos concentrados como consecuencia de cambios morfológicos de las células de las que derivan.

1.2.4 Vesículas extracelulares: Interés de su estudio en concentrados celulares destinados a transfusión

Las VEs fueron descritas con el término polvo plaquetario por Peter Wolf en el año 1967. En la actualidad se definen como partículas delimitadas por una bicapa lipídica liberadas por las células y que no poseen la capacidad de replicarse. Contienen una mezcla de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas bioactivas que indican el estado de la célula de origen. Todos los tipos celulares liberan vesículas y estas pueden encontrarse en la mayoría de fluidos biológicos.

Con los años se descubrió que el polvo plaquetario era más complejo de lo que parecía en un primer momento y las VEs se clasificaron acorde a su tamaño, composición bioquímica y origen celular. La nomenclatura tradicional las clasifica en tres grupos: exosomas, microvesículas (MVs) y cuerpos apoptóticos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los exosomas son el grupo más pequeño con un tamaño entre los 30 y los 100 nm, y se forman en el interior de la célula en los cuerpos multivesiculares. Estos permanecen almacenados en el citoplasma y son liberados como respuesta a diferentes estímulos. La membrana de los cuerpos multivesiculares se fusiona con la membrana plasmática para liberar los exosomas al medio extracelular (52). Las MVs tienen un tamaño mayor que los exosomas (100-1000 nm) y se liberación por gemación de la membrana plasmática (Figura 5). Los cuerpos apoptóticos son los de mayor tamaño (1-5 µm) y son generados como consecuencia de la apoptosis celular (53, 54).

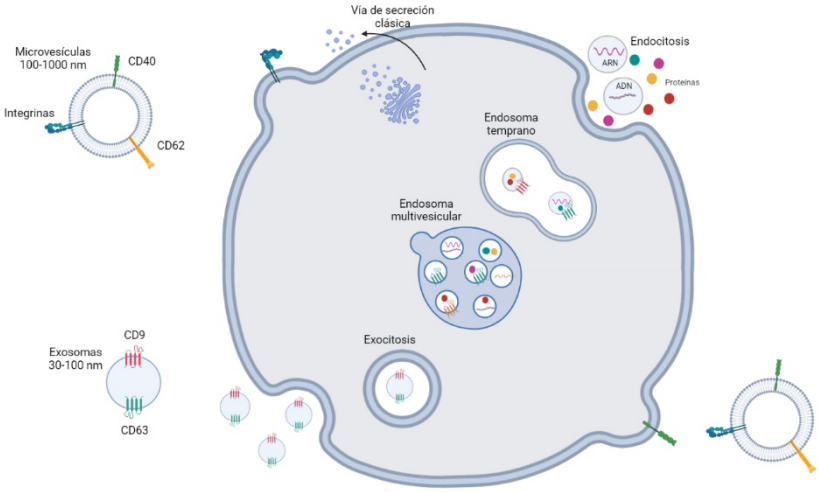


Figura 5. Biogénesis y secreción de VEs. Imagen elaborada por la doctoranda con el programa Biorender.

Sin embargo, actualmente la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, en inglés) apoya el uso de términos como "VEs pequeñas" (<100nm o <200nm) y "VE medianas / grandes" (> 200 nm) cuando el origen de las mismas es incierto. Además, recomienda el uso del término VEs como término genérico para referirnos a todas las partículas liberadas por las células rodeadas por una bicapa lipídica y que no tengan capacidad de replicarse (55).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Independientemente del término que utilicemos para referirnos a ellas, el interés de las VEs radica en su relación directa en la comunicación célula-célula, en la activación celular, la inflamación y la hemostasis (56, 57). Además, en los últimos años se han postulado como fuente de biomarcadores para diagnóstico, pronóstico y tratamiento de distintas patologías.

Como se especificó anteriormente, las VEs tienen distintos orígenes celulares y están presentes en la mayoría de fluidos biológicos. Concretamente en el plasma la mayoría de VEs presentes (70-90%) provienen de plaquetas. Esto hace que adquieran especial relevancia en el contexto transfusional y que haya aumentado el número de estudios que cuantifican la presencia de VEs en los CP (58-64) y los CH (65-69). Además, la liberación de VEs también representa un tipo de lesión por almacenamiento y su estudio permite conocer en detalle el estado de los concentrados durante la conservación. Pero no solo la presencia es importante, sino también su contenido, pues es este el que nos indica en qué estado se encuentra la célula de la que deriva y en el contexto transfusional nos indica si su contenido podría dar lugar a reacciones adversas en el receptor.

Existen varios estudios que analizaron el proteoma de las VEs derivadas de CH encontrando un enriquecimiento de proteínas como la banda 3, estomatina y hemoglobina en las VEs comparadas con la membrana del eritrocito (70-72). Además, existe la hipótesis de que los eritrocitos liberan VEs durante el almacenamiento para prevenir su eliminación de la circulación tras la transfusión cuando todavía son funcionales (73). Esta teoría fue reforzada tras el descubrimiento de residuos oxidados específicos de la hemoglobina en VEs durante el almacenamiento (74). Por otro lado, muchas investigaciones han confirmado la actividad procoagulante de las VEs derivadas de CH (75-77) y han identificado proteínas Rhesus y otros antígenos (Kell o Lutheran) que podrían desencadenar reacciones adversas por desarrollo de aloanticuerpos en el receptor (70, 78).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sin embargo, en el caso de los CP solamente Pienimaeki-Roemer y colaboradores (79) han analizado el proteoma de VEs liberadas tras 5 días de almacenamiento encontrando que existe una expresión diferencial de algunas proteínas específicas en cada subpoblación de VEs a pesar del alto grado de solapamiento.

De todas maneras, no se debe olvidar que las VEs no son la única fuente de degranulación plaquetaria. Existe la vía clásica de secreción que engloba diferentes tipos de gránulos, delimitados por una membrana y que se diferencian por su contenido específico: los gránulos α, los gránulos densos y los lisosomas:

Los gránulos α son exclusivos de plaquetas y los más abundantes. Poseen en su interior una gran diversidad de proteínas, de las cuales muchas son específicas de la plaqueta, como PF4, β-tromboglobulina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Otras proteínas solubles como fibrinógeno, factor de von Willebrand o la trombospondina también se encuentran en el interior de estos gránulos. Estas moléculas participan sobre todo en la hemostasia, estimulando la adhesión y la agregación plaquetaria (80).

Los gránulos densos, más pequeños que los α y mucho menos abundantes, contienen mediadores de la función plaquetaria como ATP, ADP y serotonina (81).

Los lisosomas se caracterizan por su contenido en enzimas hidrolíticas entre las que destacan catepsinas, elastasas y colagenasas, encargadas de la degradación proteica (82).

El análisis del contenido de las VEs derivadas de las lesiones de almacenamiento podría ser un instrumento útil en la medicina transfusional permitiendo su consideración como potenciales predictores de reacciones postransfusionales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 AUTOTRANSFUSIÓN: PRODUCTOS SANGUÍNEOS NO DESTINADOS A USO TRANSFUSIONAL

Según el Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión, se entiende por autotransfusión la transfusión en la que el donante y receptor son la misma persona y en la que se emplea sangre y componentes sanguíneos depositados previamente (83).

Existen en la actualidad derivados sanguíneos que se aplican en el ámbito clínico, cuyo donante y receptor son la misma persona solo que tras la recolección de la sangre y su procesamiento, se procede a la aplicación directa del derivado sin ningún paso de almacenamiento o conservación. En esta categoría especial se encuentran CP, distintos a los descritos en el apartado 1.2.1, concretamente el PRP. Debido a que actualmente la legislación no recoge unas normas específicas para el empleo de estos productos, ha sido la Agencia Española del Medicamento (AEMPS) la que ha procedido a regularlos. La resolución publicada en mayo de 2013 por la AEMPS, establece el uso terapéutico del plasma autólogo y sus fracciones componentes o derivados como medicamento de uso humano para atender necesidades especiales (84).

1.3.1 Plasma autólogo: Fracciones componentes o derivados

El plasma autólogo y sus fracciones componentes o derivados son por tanto un medicamento con fines terapéuticos. El plasma procede de la sangre, pero dependiendo de los protocolos y sistemas que se utilicen para su procesamiento, se obtienen distintos concentrados ricos en plaquetas (CRP) que difieren en el número de células o en la cantidad de factores de crecimiento presentes.

Entre las variaciones en los protocolos para obtener los CRP se encuentran el tipo de tubo que se utiliza para la extracción de la sangre (con anticoagulante o no), la velocidad y el tiempo de centrifugación. Varias casas comerciales han diseñado kits de sistemas cerrados que permiten obtener directamente el producto deseado. Sin embargo, si se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

utilizan sistemas abiertos se puede obtener el producto en forma líquida y según el lugar de aplicación a veces es necesario la adición de factores como calcio o trombina para completar el proceso y obtenerlo en forma de red de fibrina (Figura 6).

Lo común a todos los preparados utilizados en el ámbito clínico es la gran concentración de plaquetas presentes, que finalmente son las responsables de los buenos resultados obtenidos tras su aplicación. Como se describió en el apartado 1.1 las plaquetas son las células sanguíneas más pequeñas y su principal función es mantener la integridad vascular y la hemostasia. Sin embargo, también se ha descrito que participan en otros muchos procesos como la inflamación, la inmunidad o el cierre de heridas. Por esta razón se empezaron a aplicar los CRP en distintas patologías que serán mencionadas con detalle más adelante.

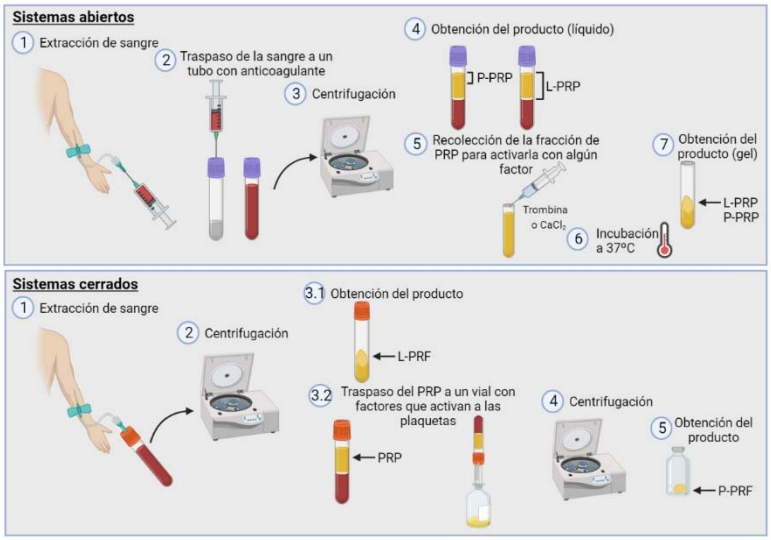


Figura 6. Pasos a seguir para la producción de los distintos tipos de CRP. Los sistemas para su obtención se clasifican en abiertos o cerrados según el dispositivo empleado. Los cerrados son aquellos que impiden la transferencia de contaminantes ambientales al producto, así como su salida accidental. Imagen elaborada por la doctoranda con el programa Biorender.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A pesar de las múltiples variables que pueden intervenir en la obtención de los CRP, estos se pueden clasificar en cuatro grupos según la densidad de la red de fibrina y la presencia o ausencia de leucocitos (85):

- *Pure Plaletel Rich Plasma* (P-PRP): PRP puro o también conocido como PRP pobre en leucocitos. Son productos que carecen de leucocitos y la red de fibrina tiene una baja densidad tras su activación. Por definición, todos los productos de esta familia pueden usarse en forma líquida mediante inyección o si se activa pueden usarse en forma de gel, colocándolo sobre una herida o puesto a modo de sutura.
- *Leukocyte Platelet Rich Plasma* (L-PRP): Estas preparaciones son similares a la anterior con la excepción de que esta contiene leucocitos. Al igual que los P-PRP pueden utilizarse en forma líquida o activarse para utilizarse en forma de gel.
- *Pure Platelet Rich Fibrin* (P-PRF): Estos productos forman una red de fibrina de alta densidad, pero no contienen leucocitos. Por su estructura, solamente existen bajo la formulación de gel y por tanto no pueden ser inyectados o empleados como los pegamentos de fibrina convencionales. No obstante, debido a que la matriz de fibrina es lo suficientemente fuerte puede ser manipulada como si fuera un material sólido.
- *Leukocyte Platelet Rich Fibrin* (L-PRF): Estas mallas de fibrina de alta densidad presentan leucocitos en su interior. Al igual que el producto anterior, estos solo existen en forma de gel, pero la matriz también es lo suficientemente fuerte para manipularse sin problemas de rotura.

Diferentes compañías han comercializado kits para la generación de los distintos tipos de CRP. A pesar de ello, solamente el kit comercializado bajo el nombre de Intra-Spin L-PRF cuenta con el marcado CE y la aprobación de la FDA. Precisamente, el L-PRF es el más empleado en cirugía oral y maxilofacial porque su arquitectura permite utilizarlo en forma de membrana o coágulo adaptándose bien a las actuales técnicas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

quirúrgicas. Este preparado no solamente se ha limitado al ámbito odontológico, sino que también se ha probado en la medicina deportiva y la ortopédica obteniendo resultados prometedores. Sin embargo, en estos últimos es más común utilizar los CRP que puedan ser inyectables por la facilidad de aplicación debido a la zona a tratar.

Cabe destacar el gran número de publicaciones científicas que reportan los buenos resultados clínicos obtenidos con los CRP en distintas ramas clínicas. En el tratamiento de diferentes patologías como la fascitis plantar, tendinitis y osteoartritis de rodilla se han observado buenos resultados, a pesar de ser necesario mayor número de estudios para llegar a conclusiones más robustas. Concretamente, en la fascitis plantar se redujo el dolor en un 90% de los casos y aumentó la funcionalidad (86). La aplicación de CRP en tendinitis y osteoartritis mostraron mejores resultados que los tratamientos convencionales con corticoides (87) o ácido hialurónico (88), respectivamente. Para el tratamiento de la osteoartritis algunos autores recomiendan el uso de concentrados de plaquetas pobres en leucocitos por existir la posibilidad de un potenciamiento del efecto proinflamatorio. El tratamiento de lesiones musculares en medicina deportiva demostró una recuperación más rápida y por tanto una reducción del tiempo de reincorporación de los deportistas a la competición (88).

En Odontología y cirugía oral y maxilofacial se ha constatado una mejora de la regeneración ósea (89-91), reducción de dolor e inflamación y cicatrización de los tejidos blandos (92, 93) además de la mejora en la reconstrucción de fracturas mandibulares (91, 94, 95) tras la aplicación de estos CRP. No obstante, en este campo hay mayor controversia sobre el tipo de concentrado a utilizar debido a las diferentes concentraciones de los factores de crecimiento que pueden influir de manera muy significativa en el resultado obtenido.

La dermatología es otra rama donde la aplicación de estos concentrados ha mostrado resultados prometedores, sobre todo en el tratamiento de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

úlceras diabéticas y por presión acelerando el cierre de las mismas y disminuyendo el dolor (96, 97).

Por último, otro de los campos de aplicación que también gana adeptos es la oftalmología. Se observaron efectos positivos tras la aplicación de estos derivados autólogos en patologías oculares concretas como úlceras corneales o queratoconjuntivitis (98, 99).

El uso de CRP en la clínica es cada vez más elevado y el éxito de sus resultados se debe al contenido de los gránulos que las plaquetas liberan entre los que se encuentran una gran variedad de moléculas bioactivas, especificadas en el apartado 1.1. Entre ellas destacan, por sus funciones, los factores de crecimiento lo que ha llevado a diversos grupos de investigación a medirlos en los CRP (100-103). A su vez, algunos de ellos los han cuantificado entre los diferentes tipos de CRP y también han seguido su cinética de liberación. Existen contradicciones entre los resultados obtenidos por los distintos grupos, debido principalmente a las diferencias en los protocolos de preparación de los concentrados, además de la metodología empleada para la cuantificación de los factores.

Si bien los factores de crecimiento son las proteínas más estudiadas por parte de los investigadores, no son las únicas liberadas por los concentrados. En este sentido, otros trabajos han examinado el conjunto de proteínas secretadas mediante técnicas proteómicas, identificando entre otras, albúmina e inmunoglobulinas debido a la procedencia de la muestra (104-106). La heterogeneidad en los protocolos, y por tanto en el concentrado que se obtiene, dificulta la comparación entre resultados obtenidos por distintos grupos. Además, las diferencias en el diseño experimental y en las aproximaciones proteómicas empleadas hacen todavía más complejo el análisis de los datos.

1.3.2 Aplicación de derivados sanguíneos con fines regenerativos: Etapas de curación de heridas y fracturas

El ámbito de aplicación de los CRP por sus potenciales efectos regenerativos es muy amplio y variado, como ya se especificó

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

anteriormente. Los factores de crecimiento liberados por las plaquetas se unen a los receptores transmembrana de las células adyacentes en el lugar de la lesión cuando esta ocurre. Estos factores favorecen el crecimiento celular, la mitogénesis y la quimiotaxis dando lugar a la proliferación y a la formación de matriz extracelular y por tanto a la reparación y regeneración tisular. Sin embargo, existen ciertos tipos celulares que responden mejor a estos factores de crecimiento como son las células mesenquimales de linaje osteoblástico, los fibroblastos, las células endoteliales y las epidérmicas (107, 108).

Todos ellos intervienen en procesos de regeneración tisular cuando se produce una lesión. Las fases por las que pasa una herida hasta su completa resolución son cuatro (coagulación, inflamación, proliferación y maduración) y estas se solapan y están interconectadas (Figura 7).

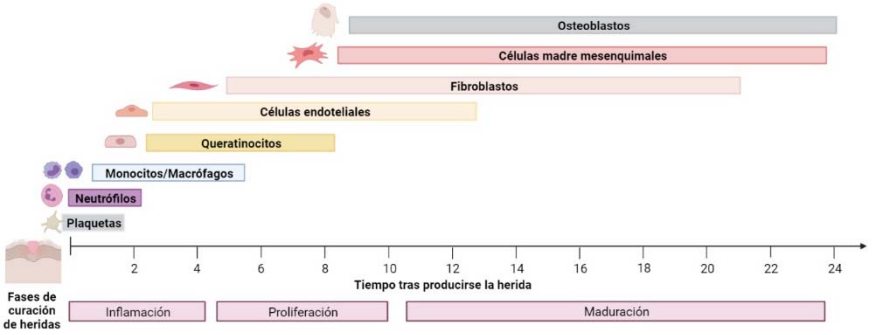


Figura 7. Fases de curación de una herida y tipos celulares que participan. Imagen elaborada por la doctoranda con el programa Biorender.

1.3.2.1 Etapas de curación de heridas

Tras producirse una lesión y alterarse la integridad vascular del tejido, las células sanguíneas migran hasta la zona para desencadenar el proceso de coagulación y formar el tapón hemostático para detener la hemorragia. A su vez este tapón de fibrina sirve de andamiaje para otros tipos celulares que acuden a la zona de la herida para continuar con la fase inflamatoria (109).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La fase inflamatoria se solapa con la de coagulación y dura desde el inicio de la lesión hasta el tercer o cuarto día. En esta etapa las plaquetas liberan múltiples moléculas activas, entre ellas PDGF, bFGF y TNF-α y β, que atraen a neutrófilos y macrófagos hasta la zona de la herida para limpiarla y desinfectarla. Los neutrófilos actúan predominantemente entre las primeras 24-48 h y lo hacen limpiando la herida, eliminando las bacterias y el tejido lesionado (110). Los monocitos atraídos evolucionan a macrófagos que mediante la fagocitosis contribuyen también a la limpieza de la herida. Además, estos segregan una serie de citoquinas proinflamatorias (IL-1) y factores de crecimiento (IGF-1, TGFβ) que estimulan la proliferación de fibroblastos, la producción de colágeno y la formación de tejido de granulación (110). El óxido nítrico producido en esta fase con fines antiibacterianos, también estimula la proliferación y migración de queratinocitos (109). De este modo la herida entra en la fase proliferativa (entre el quinto y séptimo día) en la que los fibroblastos son el tipo celular predominante.

En la fase de proliferativa, los fibroblastos migran y proliferan gracias a la citoquinas producidas por plaquetas y macrófagos (IGF-1, EGF, TNF-α y β y PDGFBB), así como a la estimulación autocrina de los propios fibroblastos (110). Estas células de la dermis sintetizan una nueva matriz extracelular formada por colágeno III, colágeno I, fibronectina y proteoglucanos. Los distintos componentes de la matriz junto con las metaloproteinasas liberadas por los fibroblastos, facilitan la migración y proliferación de las células para la reparación del tejido (111, 112). La matriz actúa también como un reservorio de factores de crecimiento y de moléculas que limitan la proliferación de los fibroblastos y también la síntesis de colágeno. Por tanto existe interacción entre la matriz celular y los fibroblastos, de tal forma que estos participan en la síntesis y remodelación de la matriz extracelular mediante la modulación de esta sobre las funciones de ellos (110).

En la etapa proliferativa también se produce la migración de células endoteliales de vasos sanos próximos. Los nuevos capilares invaden la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

matriz gracias a la interacción de las células endoteliales y las citoquinas angiogénicas sintetizadas por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales (bFGF, TGFβ y VEGF). La angiogénesis da lugar a la formación de una red vascular que queda cubierta por el tejido de granulación a medida que se sintetiza más colágeno y la herida se aproxima a la cicatrización (110).

La contracción de la herida contribuye a su cierre y se debe a la transformación de los fibroblastos en miofibroblastos que son capaces de contraerse y acercar los bordes de la herida (110). A continuación, los queratinocitos migran sobre los componentes de la matriz, orientándose sobre las fibras de colágeno dando lugar a la epitelización. Cuando la herida está cerrada por una monocapa de queratinocitos estos dejan de migrar y se multiplican y diferencian. Los factores de crecimiento EGF, KGF y los TGF α y β son los que estimulan la epitelización y migración de los queratinocitos, así como la unión dermoepidérmica (110).

Por último, sucede la fase de maduración, donde se produce la remodelación de la matriz extracelular que puede prolongarse hasta dos años tras una lesión. En esta etapa se produce la apoptosis de los fibroblastos, aparece una estructura más densa de colágeno y la red vascular se organiza. La contracción de la herida se alcanza a los 21 días y en este momento el contenido de colágeno es máximo, aunque la resistencia de la cicatriz al estiramiento es todavía muy débil (110). Tras 6 semanas la fibronectina y el ácido hialurónico, necesarios para la migración y proliferación celular, son sustituidos por proteoglicanos y glusosaminoglucanos y que junto con el colágeno tipo I forman una matriz más resistente a las fuerzas de tracción.

1.3.2.2 Etapas de curación de fracturas

Cuando se produce una fractura, el proceso de regeneración varía un poco porque aparecen otros tipos celulares específicos que intervienen en la reparación del hueso. Al igual que en la curación de heridas, tras una fractura las primeras etapas son la formación de un coágulo para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

detener la hemorragia y la inflamación donde las plaquetas ancladas a la membrana de fibrina liberan su contenido y atraen a neutrófilos y macrófagos para limpiar y desinfectar la zona.

En la fase proliferativa se produce la migración de células endoteliales, fibroblastos y en este caso también de células madre mesenquimales (MSC). En esta etapa se produce la angiogénsis y la formación de vasos *de novo* procedentes de células progenitoras endoteliales en la zona de la fractura gracias al VEGF producido por muchas de las células inflamatorias, mesenquimales, osteoblastos y condrocitos (113).

Otras citoquinas liberadas en la zona de la fractura son las responsables de reclutar MSC procedentes del periostio (capa más externa del hueso) o de la médula ósea local. Estas células son multipotentes y tienen la capacidad de diferenciarse a varios tipos (osteoblastos, condrocitos, fibroblastos, miocitos y adipocitos) (114) aunque en el caso de la reparación de las fracturas óseas inician su desarrollo hacia células progenitoras de tipo osteocondral.

Para iniciar la etapa de formación del hueso, las células del periostio proliferan rápidamente, buscando la unión de los fragmentos de la fractura, formando un manguito perióstico que envuelve el callo blando.

Las MSC del periostio son bipotentes pudiendo diferenciarse a osteoblasto o condrocito mediante procesos de osificación diferencial según el microambiente (113). La diferenciación osteogénica de MSC del periostio da lugar a la formación de hueso intramembranoso local (que no implica cartílago) a lo largo de superficies óseas adyacentes a la fractura. Por otro lado, las mismas células del periostio migran al espacio de la fractura para producir condrogénesis (113). Las células del endostio (capa interna del hueso) solamente se diferencian a osteoblastos y son las responsables de formar un puente rápido a través de la cavidad medular (115).

La condrogénesis a partir de MSC del periostio da lugar a la osificación endocondral. El cartílago producido por los condrocitos une la fractura

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y la estabiliza. El cartílago se transforma en hueso a través de un proceso de maduración de los condrocitos donde estos alcanzan un estado proliferativo hipertrófico gracias a los factores de crecimiento presentes en la zona de la fractura (116). En este momento los condrocitos comienzan a perder sus marcadores típicos y expresan marcadores de hueso como la fosfatasa alcalina, la osteopontina y la osteocalcina. Esto da lugar a la calcificación de la matriz cartilaginosa lo cual proporciona rigidez a la fractura.

La última fase de la reparación de una fractura es la remodelación del hueso. En esta etapa los osteoclastos degradan el hueso provisional producido que se reemplaza por hueso maduro por la acción de los osteoblastos. Las células madre hematopoyéticas monocito/macrófago migran a la zona de la herida y se diferencian a osteoclastos gracias al factor MSCF, al ligando del receptor activador nuclear kappa β (RANKL) que se une a su receptor RANK (117). Tras diferenciación y maduración de los osteoclastos estos reabsorben el hueso dando lugar a una cavidad donde migran los osteoblastos para formar la matriz orgánica (osteoide) que mineralizará pasados 15 días.

1.3.3.3 Aplicación de derivados sanguíneos in vitro e in vivo con fines regenerativos

Los diferentes tipos celulares que intervienen en las etapas de regeneración de heridas o fracturas se ven atraídos/estimulados por los factores de crecimiento liberados por plaquetas y leucocitos en la zona de la lesión. Los CRP empleados en la práctica clínica concentran un gran contenido de esos factores los cuales mejoran el tratamiento de las lesiones. Por ello, distintos grupos han evaluado el efecto *in vitro* de los CRP sobre los diferentes tipos celulares que intervienen en la regeneración tisular.

Varios grupos han estudiado el efecto de los CRP sobre los fibroblastos ya que estos contribuyen a la regeneración tisular mediante el depósito de colágeno y la formación de la matriz extracelular. Algunos han analizado el efecto de la concentración de PRP sobre la proliferación de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los fibroblastos procedentes de distintas localizaciones (dermales (118, 119) o sobre fibroblastos del ligamento periodontal (120-122) o gingivales (123, 124) y también su migración (124, 125). A pesar de que no existir un consenso sobre la concentración óptima debido a las diferencias en los protocolos de obtención de los concentrados, al diseño experimental y a la metodología empleada por cada grupo, todos encontraron un efecto positivo tras la aplicación de los CRP sobre los fibroblastos.

El objetivo de otros grupos fue más específico y estudiaron el papel de los leucocitos presentes en los CRP (126) o de algún factor de crecimiento concreto (127) sobre la proliferación y migración de los fibroblastos. Incluso algunos analizaron más en detalle el papel de los concentrados sobre la vía de señalización a través de la cual podían ejercer sus efectos en los fibroblastos (128) y el proceso de diferenciación a miofibroblastos mediante la detección de la expresión de marcadores específicos (127).

En los osteoblastos varios grupos también evaluaron distintas concentraciones de PRP sobre la proliferación (121, 123, 129, 130) y migración (131, 132). Además, otros analizaron la mineralización y la liberación de citoquinas por parte de los osteoblastos tras añadir PRP (133, 134). Algunos profundizaron más en el mecanismo a través del cual el PRP provocaba su efecto en la migración y proliferación. Al igual que ocurría con los estudios en fibroblastos también hubo discrepancias entre los resultados obtenidos por unos grupos y otros y esto puede deberse a la preparación de cada concentrado, al diseño experimental, así como el origen de los osteoblastos. En este sentido también se han llevado a cabo ensayos preclínicos in vivo. Entre los estudios hay variabilidad en el CRP utilizado, el modelo animal, el procedimiento y la lesión entre otros, pero la gran mayoría mostraron mejoras y efectos positivos en el grupo tratado con respecto al control a nivel radiográfico e histopatológico (135).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con el fin de investigar los efectos de los concentrados en los tratamientos de fracturas, incluso se han realizado ensayos clínicos en humanos para el tratamiento de lesiones óseas. El tipo de fractura tratada, el concentrado empleado, el procedimiento llevado a cabo entre otras muchas variables hacen complejo la comparativa entre estudios. Sin embargo, los resultados mostraron efectos positivos a nivel de evaluación radiográfica, además de una disminución del tiempo de regeneración de la fractura (135).

La regeneración ósea también depende de las células mesenquimales que se pueden diferenciar a distintos linajes osteogénicos y por tanto contribuir a remodelar la fractura. Como se ha detallado en la Tabla 1, muchos de los factores secretados por las plaquetas tienen la capacidad de atraer a células mesenquimales y por tanto los investigadores han estudiado las propiedades moduladoras de los concentrados sobre ellas debido a su gran potencial en la medicina regenerativa.

El análisis de los cambios biológicos que los CRP producen en las MSC, especialmente las propiedades moduladoras de diferenciación a distintos linajes, todavía son controvertidos. Algunos grupos apuntan que si produce diferenciación osteogénica (136) mientras que otros han observado lo contrario (137). Sobre la regeneración condrogénica todavía hay pocos resultados (138), pero son positivos y prometedores ya que el cartílago articular y por tanto la formación de hueso endocondral es extremadamente difícil de regenerar cuando una lesión causa la pérdida de aporte sanguíneo.

Respecto al contenido de leucocitos por parte de los CRP y sus efectos en la diferenciación de MSC tampoco hay consenso. Ciertos grupos han encontrado que CRP ricos en leucocitos estimulan la diferenciación osteogénica y la proliferación de MSC humanas in vitro de forma dosis dependiente. Sin embargo, también se ha sugerido que altas concentraciones de leucocitos inducen inflamación y por tanto retrasan la regeneración ósea (139, 140).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los ensayos in vivo muestran mejoras en la reparación de las fracturas en el grupo tratado con CRP comparado con el grupo control, aumentando la curación de la fractura, la diferenciación y una mejora cualitativa de la regeneración ósea. No obstante, existen algunos estudios que no muestran un beneficio significante tras la aplicación de los CRP (141).

La discrepancia entre grupos indica la necesidad de seguir investigando para determinar las propiedades de estos concentrados sobre los distintos tipos celulares que participan en la regeneración de lesiones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los objetivos generales planteados en la presente tesis doctoral son:

1. Analizar el contenido de las VEs liberadas por los CP durante el almacenamiento con el fin de identificar marcadores de lesión plaquetaria derivados de la conservación.
2. Estudiar el perfil proteico del secretoma de las membranas L-PRF que se emplean en regeneración.
3. Evaluar el efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre distintos tipos celulares para entender de qué manera su aplicación interviene en la curación de heridas.

De estos objetivos generales se derivan los siguientes específicos:

1. Analizar cambios en el proteoma de las VEs derivadas de CP durante su almacenamiento con el propósito de identificar marcadores de lesión plaquetaria que puedan dar lugar a reacciones adversas postransfusionales.
2. Caracterizar el contenido proteico del secretoma liberado por las membranas L-PRF.
3. Cuantificar las diferencias en el secretoma de las membranas L-PRF liberado a lo largo del tiempo.
4. Evaluar el efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre la proliferación y migración de fibroblastos dermales para entender su papel en la cicatrización.
5. Examinar el efecto de la proteína BMP-5 presente en el secretoma de las membranas L-PRF sobre la diferenciación osteoblástica.
6. Determinar el efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre la diferenciación osteogénica en MSC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los materiales, reactivos y equipos empleados para la realización de la presente tesis doctoral se encuentran recogidos en el Anexo I.

3.1 SELECCIÓN DE DONANTES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE VEs

El estudio de las vesículas extracelulares derivadas del almacenamiento de los Concentrados de Plaquetas fue realizado en colaboración con la *Axencia de Doazón de Órganos e Sangue*, como un control adicional de calidad de los concentrados utilizados en medicina transfusional. En ningún caso las muestras se recogieron *ex profeso* para la realización del estudio, sino que de los concentrados de plaquetas utilizados para transfundir se recogieron alícuotas para medir distintos parámetros de calidad durante el almacenamiento, entre ellos las vesículas extracelulares.

Los requisitos que tienen que cumplir las muestras de sangre para utilizarse para transfusión están recogidos en el Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre y cubiertos por la *Axencia de Doazón de Órganos e Sangue*.

La sangre total fue procesada por la *Axencia de Doazón de Órganos e Sangue* mediante la separación de los componentes y los BC procedentes de 5 donantes se agruparon y sobre ello se añadió la solución aditiva PAS III-M (la ratio final de PAS/plasma fue de 60/40) para la obtención de los CP. Las plaquetas se inactivaron con la tecnología de reducción de patógenos Mirasol y se almacenaron durante 7 días a 22ºC en agitación orbital. A día 2, 4 y 7 de almacenamiento, se recogieron de cada CP entre 10 y 12 ml de plasma, en un tubo de plástico mediante un sistema de recogida estéril.

Para este estudio se recogieron un total de 13 CP a días 2 y 7 de almacenamiento para el análisis del proteoma de las VEs a los distintos tiempos de conservación. Asimismo, se recogieron 4 CP adicionales a días 2, 4 y 7 para llevar a cabo la validación de los resultados obtenidos mediante inmunodetección.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2 SELECCIÓN DE DONANTES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DEL SECRETOMA DE LAS MEMBRANAS L-PRF

Este estudio fue realizado en colaboración con el grupo de Odontolología Médico-Quirúrgica de la Universidade de Santiago de Compostela. La línea de investigación en la que se encuadra este estudio cuenta con la aprobación del Comité Autonómico de Ética de la investigación de Galicia (Código de registro 2018/317) y la autorización de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) (Número de autorización: 2017-001068-39), debido a que las membranas L-PRF se clasifican como un medicamento de uso humano para atender necesidades especiales.

Las muestras de membranas de fibrina ricas en plaquetas y leucocitos se obtuvieron de donantes sanos y fueron recogidas en la Facultad de Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela y en la Clínica dental Blanco Ramos. Las muestras de sangre a través de las cuales se formaron las membranas de fibrina ricas en leucocitos (L-PRF) se obtuvieron por punción de la vena cubital con una aguja del calibre 21G, recogiéndose en tubos de plástico con recubrimiento de vidrio en ausencia de anticoagulantes (Intra-Spin, Intra-Lock Iberia, Madrid, España).

Inmediatamente tras la recolección de la sangre, los tubos se centrifugaron a 400 g durante 12 minutos en la centrífuga Intra-spin (Intra-Lock Iberia, Madrid, España). Tras la centrifugación, en los tubos se habían formado coágulos de fibrina que se situaron en una caja metálica que los comprimió a membranas por la fuerza de la gravedad durante 5 minutos. Las membranas obtenidas se colocaron en una placa de 6 pocillos con medio DMEM suplementado con 1% de penicilina y estreptomicina. Para todo el estudio, tanto del análisis proteómico del secretoma como sus efectos en distintos tipos celulares, se recogió sangre de 18 donantes (8 hombres y 10 mujeres con edades comprendidas entre los 23-72 años). Concretamente para los estudios proteómicos las muestras se distribuyeron diferencialmente según la aproximación llevada a cabo como se especifica en la Tabla 3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3. Distribución de muestras atendiendo al análisis realizado para caracterizar y cuantificar las proteínas presentes en el secretoma de las membranas L-PRF.

Tipo de muestra y aproximación llevada a cabo	*Pool* para perfil del secretoma	*Pool* para analizar las diferencias en el perfil del secretoma basadas mediante aproximación en gel	Muestras individuales para análisis cuantitativo de factores de crecimiento	*Pool* para análisis por SWATH	Muestras individuales para validaciones mediante inmunodetección
Número de voluntarios por estudio	4 (2 hombres y 2 mujeres, media de edad 37,3 ± SD 20,1)			4 (2 hombres y 2 mujeres, media de edad 37,3 ± SD 16)	3 (hombres, media de edad 50,3 ± SD 20,6)

3.3 AISLAMIENTO DE LAS VE

El primer paso para aislar las VE de los CP es eliminar todos los componentes celulares, principalmente plaquetas, presentes en ellos. Esto se hace siguiendo un protocolo estandarizado de centrifugaciones seriadas (142) de los CP en condiciones antiagregantes para evitar la formación de VE derivadas del procesamiento de la muestra:

A cada tubo que contiene entre 10 y 12 ml de plasma se le añade prostaciclina (PGI2) a una concentración final de 1 µM que evita la activación plaquetaria. A continuación, se somete a una primera centrifugación a baja velocidad, 200 g durante 20 minutos, en una centrífuga hematológica sin freno, para evitar cambios bruscos en la velocidad del rotor. El fin de esta primera centrifugación es precipitar en el fondo eritrocitos que todavía estaban presentes en los CP. Se recoge todo el plasma del tubo, que es la misma cantidad que antes, entre 10 y 12 ml y ahora es un plasma rico en plaquetas libre de eritrocitos (PRP).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez recogido el PRP se le vuelve a añadir PGI2 a la misma concentración final de antes, 1µM, y se centrifuga de nuevo, pero esta vez a una velocidad de 1000g durante 10 minutos. Tras esta centrifugación se obtienen dos fases, el precipitado está formado por las plaquetas y el sobrenadante es plasma pobre de plaquetas (PPP).

El PPP se trasvasa a un tubo nuevo y se centrifuga ahora a una velocidad de 1500 g durante 10 minutos para eliminar cualquier resto de plaquetas que todavía esté presente en el plasma.

Una vez terminada la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se reparte en tubos de 1,5 ml. Estos tubos se centrifugan a 15000g durante 2 minutos en una centrífuga de ángulo fijo (Eppendorf 5430 R) para acabar de eliminar cualquier posible resto celular.

Acabada esta centrifugación se obtiene el plasma libre de plaquetas (PFP, *platelet-free plasma*) que se reparte de nuevo en tubos de 1,5 ml que se almacenan a -80ºC hasta su posterior procesamiento.

El protocolo descrito por Ramacciotti y colaboradores (143), basado en ultracentrifugaciones seriadas, fue el modelo a seguir para aislar las VE, con la modificación de un lavado adicional de PBS.

Las muestras de PFP se descongelan en hielo. Tras su total descongelación, se ponen 1,2 ml de PFP en cada tubo de la ultracentrífuga (Beckman ref. 344057) y sobre ellos se añaden 3 ml de tampón HEPES. Los tubos ya llenos se colocan en los adaptadores y se enganchan al rotor correspondiente, el SW55Ti. La muestra se centrifuga a una velocidad de 200.000g durante 90 minutos a una temperatura de 4ºC.

Tras la primera ultracentrifugación, se elimina el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en 4 ml de KBr 0,25 M y se incuba en hielo durante 20 minutos. La solución de KBr solubiliza proteínas del plasma presentes en la muestra, lipoproteínas, por ejemplo. Pasado el tiempo de la incubación, las muestras se centrifugan por segunda vez siguiendo las mismas condiciones empleadas anteriormente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalizada la segunda ultracentrifugación, se vuelve a eliminar el sobrenadante y ahora el *pellet* se resuspende en PBS para acabar de lavar bien la muestra. La última centrifugación se realiza siguiendo las mismas condiciones de antes.

Terminada la última ultracentrifugación, se descarta el sobrenadante y las VE quedan en el fondo del tubo. Estas se dejan secar al aire durante unos minutos y pasado ese tiempo se solubilizan en 50 µl del tampón correspondiente según el experimento a realizar con ellas. Para la caracterización se resuspenden en PBS o glutaraldehido al 10% y para estudios proteómicos se hace en un tampón de 2D-DIGE.

3.4 CARACTERIZACIÓN DE VE

La clave del análisis de VE es conocer la muestra de partida y saber que poblaciones la componen y si esta presenta algún tipo de contaminación con proteínas plasmáticas. La ISEV (*International Society of Extracellular Vesicles*) se encarga de proponer reglas que permitan estandarizar todos los protocolos relacionados con el aislamiento, procesamiento y caracterización de VE. En lo relativo a la caracterización de las muestras, recomiendan al menos emplear dos técnicas distintas para ello (55). A continuación, se detallan las metodologías utilizadas para la caracterización, una basada en imagen (microscopía electrónica) otra basada en tamaño (*dinamic light scattering*) y la última que combina tamaño y marcadores diferenciales (citometría de flujo).

3.4.1 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión es una de las técnicas de visualización empleadas para la caracterización de las VE. La resolución de la técnica permite conocer la morfología de cada partícula y medir su tamaño.

Tras la última ultracentrifugación, el sobrenadante se descarta y el *pellet* de VE se resuspende en diferentes soluciones según el análisis al que se va a someter la muestra, en este caso se resuspende en glutaraldehido al 10%. Una gota de la muestra se deposita en una rejilla de cobre

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

revestida con una membrana de Formvar. Las rejillas se incuban con acetato de uranilo al 2% durante 1 minuto para hacer marcaje de contraste y se observan en el microscopio JEOL JEM-1011(JEOL, Inc., Peabody, MA) en la Unidad de Microscopía de Lugo (RIAIDT).

3.4.2 Dispersión dinámica de luz (DDL)

Esta técnica se emplea para la determinación del tamaño de las partículas que se encuentran en una muestra en suspensión, a través de la medida de la intensidad de la luz que estas dispersan.

Tras la última ultracentrifugación para el aislamiento de VE, el sobrenadante se descarta y el *pellet* se resuspende en 50 µl de PBS. A continuación, la muestra se diluye en 1 ml de agua ultrapura y se sitúa en una cubeta que se introduce en el equipo Zetasizer® NanoZS (Malvern Instruments (UK)) para realizar la medida. Cada muestra se mide por triplicado para obtener la media del tamaño de las VEs y conocer la distribución de las poblaciones.

3.4.3 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una metodología que combina la medida del tamaño de las partículas con la detección de proteínas presentes en las membranas permitiendo caracterizar e incluso cuantificar las VE presentes en la muestra. Debido al micrométrico tamaño de las VE, su detección se hace compleja y para ello se propuso el utilizar unas partículas de tamaño conocido que permiten fijar los límites de detección de cada equipo (144). Se analizaron un total de 8 muestras de PFP procedentes de CP a días 2 y 7 de almacenamiento.

El producto Megamix-Plus SSC (BioCytex), una mezcla de bolitas de poliestireno fluorescentes de distintos diámetros (0,1; 0,3; 0,5 y 0,9 mm), se utiliza para situar las poblaciones de VE por tamaño y fijar los parámetros del citómetro FACSCalibur (BD bioscience). En este caso, las bolitas se medían en el SSC debido a una mejor resolución de este parámetro del citómetro empleado (145). La configuración correspondiente para cada parámetro fue la siguiente: SCC: 580 log; FL1: 825 log; FL2: 646 log; FL3: 650 lin; la compensación: FL1 - 1,0%

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FL2 y FL2 - 16,5% FL1; y la localización del cuadrante: 93 (FL1), 45 (FL2).

El protocolo utilizado se basa en el trabajo multicentro para la estandarización de VE con distintas plataformas de citometría de flujo publicado por Cointe y colaboradores:

Se descongela una alícuota de 1 ml de PFP en hielo a la vez que se atemperan las bolitas *MP-Count beads* (BioCytex). Estas bolitas son una mezcla de partículas, todas ellas del mismo tamaño (3 µm de diámetro), a una concentración conocida que permite cuantificar el número de VE presentes en la muestra. Estas se preparan añadiendo 30 µl a 1 ml de PBS.

Tras la descongelación del PFP se preparan las muestras y el control negativo. En el caso del control negativo, se incuban 30 µl de PFP con 10 µl de Anexina V-FITC y 5 µl de IgG1-PE Para las muestras, se incuban 30 µl de PFP con 10 µl de Anexina V-FITC y 5 µl de CD41-PE. Las incubaciones son en todos los casos de 20 minutos en oscuridad. Pasado ese tiempo, tanto el control negativo como las muestras se diluyen en 1 ml de tampón de unión.

Todas las muestras se pasan durante 1 minuto a baja velocidad por el citómetro. Las *MP-counts beads* son las primeras en pasar para conocer la concentración de las mismas y después extrapolar el número de VE presentes en cada muestra. Las medidas de cada muestra se hacen por triplicado.

3.5 PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE RECOGIDA DEL SECRETOMA DE LAS MEMBRANAS L-PRF

Con el fin de obtener un protocolo optimizado para la recolección del secretoma de las membranas L-PRF se hicieron distintas pruebas con membranas procedentes de distintos donantes para seleccionar los parámetros más adecuados. Entre las variables a evaluar se encontraban varias soluciones de cultivo, número de lavados de las membranas para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

disminuir al máximo las proteínas mayoritarias del plasma y también los tiempos de recogida del secretoma.

En primer lugar, se evaluaron dos medios de cultivo PBS y DMEM, y el número de lavados que se le iban a aplicar a las membranas tras el comienzo del cultivo. Para ello se extrajeron 4 tubos de sangre a un donante y se formaron las membranas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2. Tras su formación, cada una se sitúa en un pocillo de una placa de 6 pocillos, y a dos de ellas se le añaden 5 ml de PBS y a las otras dos se le añaden 5 ml de DMEM (Figura 8). A las 2 horas del cultivo se reemplaza el medio (lavado) a todas las membranas, a cada una con su medio correspondiente según el esquema. A continuación, las membranas se mantienen en cultivo hasta las 24 horas donde el medio se reemplaza de nuevo por medio fresco (lavado), pero solo a las membranas situadas en los pocillos de la columna 1 (Fig. 8). Posteriormente, las membranas se mantienen en cultivo hasta el día 3 donde se recoge el medio de todos los pocillos aunque a las membranas situadas en la columna 1 se añade de nuevo medio fresco (Fig. 8). En este momento el medio recogido representa las proteínas liberadas entre el último momento que se recolectó el medio (2 o 24 h) y el día 3. El cultivo se mantiene hasta el día 7 donde el medio se recoge en los pocillos de la columna 1. El medio contiene en este momento el secretoma liberado entre el día 3 y 7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

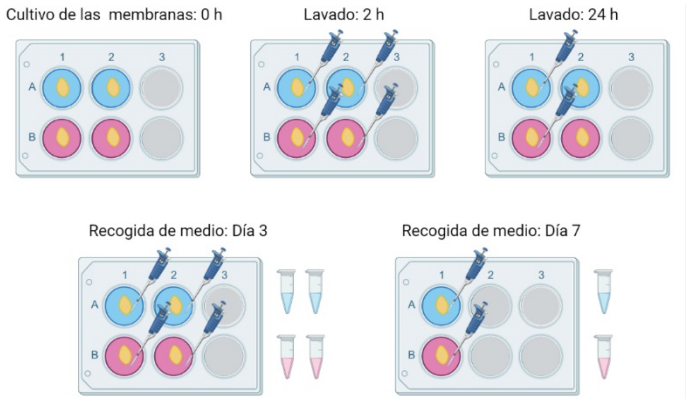


Figura 8. Diseño experimental del cultivo de las membranas L-PRF para la puesta a punto del protocolo de recogida del secretoma. Imagen elaborada por la doctoranda con el programa Biorender.

Tras la puesta a punto de los lavados y el medio de cultivo también se seleccionaron los tiempos óptimos de recogida del secretoma. Para ello se extrajeron 2 tubos de sangre de un nuevo donante y se formaron las membranas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2. Las membranas se situaron en una placa de 6 pocillos, se cubrieron con 5 ml de DMEM y se realizaron lavados a las 2 y a las 24 h del inicio del cultivo. A día 3 se recogió el medio de una de las membranas y se reemplazó por medio fresco. A día 7 se recogió el medio de ambas membranas. En este caso el medio recogido a día 7 en una de las membranas representa el secretoma liberado entre el día 3 y el 7 y en la otra membrana representa el secretoma liberado entre las 24 h y el día 7. Estas muestras se emplearán para decidir los tiempos de recogida del secretoma mediante la evaluación del perfil proteico mediante 1D-SDS-PAGE y electroforesis bidimensional.

3.6 PROTOCOLO DEFINITIVO DE CULTIVO DE LAS MEMBRANAS Y RECOGIDA DEL SECRETOMA

El protocolo definitivo para el cultivo de las membranas se definió tras ensayos previos, llevados a cabo en el laboratorio y comentados en el apartado anterior (3.5), seleccionando los tiempos y los medios adecuados para ello.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tras la obtención de las membranas, estas se sitúan en placas de 6 pocillos con 5 ml de medio de cultivo DMEM. Pasadas 2 horas de cultivo, se retira el medio y se reemplaza por otros 5 ml de medio fresco. A las 24 horas se repite este paso, de manera que se eliminan las proteínas mayoritarias del plasma.

A los 3 días, se recoge el secretoma y se añade medio fresco (5 ml). Lo mismo se hace a días 7 y 21, aunque en este último el medio solo se recoge y finaliza el cultivo de las membranas.

El secretoma recogido se centrifuga a 3000 g durante 3 minutos para eliminar posibles *debris* celulares. A continuación, los secretomas se concentran desde los 5 ml hasta un volumen de 500 µl, empleando filtros de 3 kDa de tamaño de poro Amicon Ultra-15, y se almacenan a -80ºC para su posterior procesamiento.

3.7 ESTUDIOS PROTEÓMICOS

3.7.1 Procesamiento de la muestra para estudios proteómicos

3.7.1.1 Precipitación de proteína

En el estudio del secretoma de las mebranas L-PRF se llevó a cabo la precipitación de proteína como paso previo a la cuantificación de la concentración de la misma. Para ello se empleó el protocolo que se describe a continuación:

Sobre los 500 µl de secretoma se añaden 250 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 60% en acetona fría y la muestra se somete a pulsos de utrasonidos con un sonicador Branson Sonifier® S-150D hasta descongelación. La muestra se deja reposar en hielo durante 45 minutos.

Pasado ese tiempo, la muestra se centrifuga a 10000 g durante 2 minutos y se descarta el sobrenadante.

El *pellet* se lava dos veces con 1 ml de acetona fría, aplicando pulsos de ultrasonidos para deshacerlo y centrifugando a 10000 g durante 2 minutos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tras el último lavado, la muestra de proteína precipitada se resuspende en 50 µl del tampón SDS-MS y se deja reposar 2 horas a temperatura ambiente.

Finalmente, la muestra se centrifuga otra vez a 10000 g durante 2 minutos y se recoge el sobrenadante, descartando el material que no se haya solubilizado correctamente.

3.7.1.2 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó en las muestras en las que era necesario conocer la concentración de la misma. Se emplearon distintos métodos de cuantificación atendiendo a la composición del tampón en el que se encontraban diluidas las proteínas a analizar en cada estudio.

3.7.1.2.1 Cuantificación de proteína por el método Bradford

Para la cuantificación de las muestras de VEs, resuspendidas en el tampón 2D-DIGE, se empleó el método de Bradford que utiliza el colorante Coomassie Plus para la detección de proteínas. Previo a la cuantificación de las muestras, se realiza una curva patrón de una proteína de concentración conocida para poder saber la concentración de la proteína en nuestra muestra por extrapolación.

Preparación de la recta patrón

A partir de una solución de albúmina (BSA) con una concentración de 2 mg/ml se preparan diluciones seriadas, conteniendo cada una de ellas ½ de la concentración anterior, en un volumen final de 20 µl y empleando como diluyente el tampón en el que se encuentra resuspendida la muestra. Todos los puntos de la recta patrón se preparan por duplicado.

A los 20 µl de mezcla de BSA con tampón, se le añaden 600 µl del reactivo Coomassie Plus, previamente atemperado. A continuación, las muestras se mezclan y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Pasado ese tiempo, se lee la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Genesys 20. Como blanco de la recta se emplea una mezcla de 20 µl del diluyente y 600 µl del reactivo Coomassie Plus.

Por último, se genera una recta de regresión con las medias de los valores de absorbancia obtenidos para punto.

Cuantificación de la muestra

La preparación de la muestra para su cuantificación es similar a la preparación de la recta patrón. En este caso, se añade 1 µl de muestra sobre 600 µl del reactivo Coomassie Plus y se agita e incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se mide la absorbancia a la misma longitud de onda empleada anteriormente y utilizando como blanco de la muestra una mezcla de 1 µl de diluyente en 600 µl de reactivo Coomassie Plus.

Las muestras también se preparan por duplicado y se calcula la media de los valores de absorbancia obtenidos para cada una de ellas. Las concentraciones se calculan empleando la ecuación de la recta patrón generada previamente.

3.7.1.2.2 Cuantificación de proteína por el método Pierce 660

El método Pierce 660 también es un método de cuantificación colorimétrico. A diferencia del Bradford, este es compatible con concentraciones más altas de la mayoría de detergentes empleados. Además, la mezcla con los polvos IDCR (*Ionic Detergent Compatibility Reagent*) permite aumentar la compatibilidad con otros detergentes, permitiendo la cuantificación de nuestras muestras que contienen un 2% de SDS, como es el caso de las muestras de secretoma.

El protocolo es similar al de cuantificación por el método de Bradford, pero con pequeñas variaciones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Preparación de la recta patrón

A partir de una solución de albúmina (BSA) con una concentración de 1,4 mg/ml se preparan diluciones seriadas, conteniendo cada una de ellas ½ de la concentración anterior, en un volumen final de 40 µl y empleando como diluyente el tampón en el que se encuentra resuspendida la muestra. Todos los puntos de la recta patrón se preparan por duplicado.

A la mezcla se le añaden 600 µl del reactivo Pierce 660, previamente atemperado y al que se le ha añadido 1 g de IDCR por 20 ml de reactivo. A continuación, las muestras se mezclan y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se lee a una longitud de onda de 660 nm y como blanco de la recta se emplea una mezcla de 40 µl del diluyente y 600 µl del reactivo.

Por último, se genera una recta de regresión con las medias de los valores de la absorbancia obtenida para cada punto de la recta patrón.

Cuantificación de la muestra de proteína

En este caso es necesario hacer una dilución previa de la muestra original para que los valores de absorbancia se encuentren dentro de la recta patrón.

Se hace una dilución 1:10 de la muestra (estimando que la concentración de la misma sea inferior a 1 mg/ml) y se añaden 40 µl de esta sobre 600 µl del reactivo Pierce 660. La mezcla se agita, se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 660 nm. El blanco de la muestra coincide en este caso con el blanco de la recta patrón.

Las muestras se preparan por duplicado y se calcula la media de los valores de absorbancia obtenidos para cada una de ellas. Las concentraciones se calculan empleando la ecuación de la recta patrón generada previamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.7.1.3 Identificación y cuantificación de proteínas mediante la hibridación de un array específico

Para identificar y cuantificar factores de crecimiento presentes en los secretomas de las membranas L-PRF recogidos a distintos días de cultivo, se empleó un array comercial de factores de crecimiento (QAH-GF-1, Raybiotech, Peachtree Corners, GA, USA).

Tras la concentración de los secretomas y la cuantificación de la concentración de proteína en los mismos mediante el método de Bradford (descrito en el apartado 3.7.1.2.1), se llevó a cabo la hibridación del array. Esta se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante, detalladas a continuación:

El array se descongela durante 30 minutos en la bolsa en la que viene almacenado. Pasado ese tiempo, se deja en reposo y fuera de la bolsa durante 2 horas.

Se reconstituye el vial del *standard* con 500 µl de una solución que trae el propio kit. A continuación, se preparan diluciones seriadas a partir del *standard* que se ha reconstituido siguiendo el manual del fabricante. Las muestras se diluyen hasta obtener una concentración de 500 µg/ml (esta concentración se estableció para las muestras de secretoma en base a ensayos previos llevados a cabo en el laboratorio utilizando el mismo array).

Los pocillos se bloquean añadiendo 100 µl de una solución que trae el kit y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se decanta el reactivo y se añade en cada pocillo 100 µl de la muestra correspondiente, tanto de los *standard* como las muestras y se incuba a 4ºC durante toda la noche.

Al día siguiente, se retira la muestra aspirando a vacío y se realizan 5 lavados con 150 µl de la solución de lavado A de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente y con agitación seguidos de 2 lavados con 150 µl de la solución de lavado B de 5 minutos cada uno y también a temperatura ambiente y con agitación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tras los lavados, se incuban los pocillos con 80 µl del anticuerpo biotinilado durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se decanta el líquido y se realiza el mismo número de lavados y en las mismas condiciones que en el paso anterior.

Terminados los lavados, los pocillos se incuban con 80 µl de streptavidina durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Por último, se repiten los lavados, se desmonta el sistema, se seca bien toda la superficie (evitando tocar las zonas donde se encuentran los *spots*) y se guarda a 4ºC y en oscuridad hasta su lectura.

La fluorescencia se mide en el equipo Axon GenePix 4000B a una longitud de onda de 532 nm y los datos se analizan con el software QAH-GF-1 Q-Analyzer v8.40.4 (Raybiotech, Peachtree Corners, GA, USA) seleccionando la mediana de la fluorescencia.

3.7.1.4 Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE)

La electroforesis monodimensional SDS-PAGE es una técnica que se empleó para separar por tamaño las proteínas presentes en una muestra heterogénea (tanto para estudios proteómicos como para inmunodetección) y para concentrar en el gel una muestra de proteína para su posterior digestión enzimática.

Antes de llevar a cabo la separación, las muestras se solubilizan en un tampón de carga que contiene SDS y β-mercaptoetanol para desnaturalizar y reducir las proteínas presentes. A continuación, se calientan a 100 ºC durante 5 minutos para asegurar este proceso, a excepción de aquellas muestras que se encuentren disueltas en un tampón que contenga urea o tiourea porque daría lugar a la carbamilación de las proteínas.

Las muestras se cargan en los pocillos del gel, la cantidad depende del tipo de experimento a realizar a continuación (Tabla 4), y migran por la aplicación de un voltaje (máximo 120 V) en una cubeta XCell SureLock™ Mini-Cell. Se utiliza tampón de electroforesis convencional en el caso de que los geles utilizados fueran hechos a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mano o tampón MOPS si los geles eran comerciales. Dependiendo de los siguientes pasos a realizar, la electroforesis finaliza cuando las proteínas de la muestra se han separado por completo o cuando toda la muestra se concentra en una única banda en la fase concentradora del gel.

Tabla 4. Electroforesis monodimensional

Aplicación	Cantidad de proteína
Inmunodetección	10 µg
Detección de proteína mediante tinción Sypro	10 µg
Concentración de banda para proteómica	50 µg
Patrón de bandas para cortar para proteómica	50 µg

3.7.1.5 Electroforesis bidemensional

La electroforesis bidimensional es una técnica que se empleó para separar por punto isoeléctrico y tamaño las proteínas presentes en una muestra compleja para poner a punto el protocolo de cultivo de las membranas L-PRF.

En esta técnica las proteínas se separan en dos dimensiones, primero en base a su punto isoeléctrico y después según su tamaño.

El primer paso consiste en rehidratar una tira IPG (*immobilized pH gradients*) con la muestra (50-80 µg). La muestra se coloca en una bandeja de rehidratación y sobre ella se sitúa la tira de pH (de 7 cm y de un rango de pH de 4-7 porque es en este en el que se encuentran la gran mayoría de proteínas de plaquetas). Para evitar que la muestra se evapore, la tira se cubre con aceite mineral DryStrip Cover Fluid y se deja hidratando entre 14 y 16 horas.

Tras la hidratación de la tira, esta se coloca en el equipo Etthan IPGphor 3 (GE Healthcare) para llevar a cabo el isoelectroenfoque (IEF). En los bordes de las tiras se colocan unos pequeños fragmentos de *electrode*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

wicks, previamente humedecidos, para que pase la corriente a la tira y se absorban posibles sales que queden en la muestra. A continuación, las tiras se cubren con aceite mineral, se colocan los electrodos, se selecciona el voltaje y el tiempo **(Tabla 5)** y se procede a la separación de las proteínas mediante su punto isoeléctrico.

Tabla 5. Programa de IEF para muestras en tiras IPG de 7 cm.

Fase	Voltaje (V)	Amperaje (mA)	Tiempo
1	200	3	5 min
2	3500	10	1 h 30 min
3	3500	10	1 h 40 min

Al terminar el isoelectroenfoque, las tiras se sitúan en una bandeja y se añade el tampón de equilibrado que contiene como agente reductor DTT que se incuba durante 15 minutos en agitación. Pasado ese tiempo, las tiras se alquilan con iodoacetamida también durante 15 minutos y en agitación. En estos pasos las proteínas se cargan negativamente con SDS para que puedan moverse en la segunda dimensión. Además, las proteínas se reducen para evitar la formación de enlaces disulfuro manteniéndolas desnaturalizadas y se alquilan para prevenir la oxidación de residuos sulfhidrilo.

Por último, las tiras se sitúan sobre geles de poliacrilamida y se lleva a cabo la electroforesis para separar ahora las proteínas por peso molecular. Se utiliza el mismo tampón de electroforesis convencional que en las monodimensionales.

3.7.1.6 Tinción de geles de poliacrilamida y escisión de bandas

Al finalizar la electroforesis (tanto mono como bidimensional), los geles se pueden teñir para visualizar el perfil de las proteínas de la muestra y además, si fuera necesario, cortar bandas para su posterior identificación por espectrometría de masas. Otra alterativa tras la electroforesis es la inmunodetección que se describe en el apartado 3.7.3. La tinción fluorescente SYPRO Ruby fue la utilizada para detectar las proteínas mediante la aplicación de luz ultravioleta.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Antes de la tinción, los geles se lavan con agua destilada durante 10 minutos en agitación y después se fijan durante 1 hora a temperatura ambiente con 50 ml de solución de fijación.

A continuación, los geles se tiñen con 50 ml de tinción SYPRO Ruby (Invitrogen) durante toda la noche y en agitación.

Al día siguiente, los geles se lavan de nuevo con agua destilada durante 10 minutos y en agitación.

Por último, se captura la imagen del gel teñido con el equipo Gel Doc XR (Bio Rad), utilizando en filtro 630BP30 62 nm.

En el caso de que fuera necesario escindir bandas del gel, este se coloca sobre un transiluminador Dark Reader® DR45M, y las bandas se cortan utilizando una hoja de bisturí nº 15.

3.7.2 Identificación de proteínas: Espectrometría de masas

La espectrometría de masas permite la identificación de proteínas en una muestra compleja. En la presente tesis doctoral esta metodología se empleó para la identificación de las proteínas presentes en las VEs derivadas de CP y en los secretomas de las membranas L-PRF.

Las muestras de VEs estaban resuspendidas en un tampón de 2D-DIGE y por ello la concentración de la muestra se midió por el método de Bradford. Para el análisis de estas muestras se hicieron 3 *pools* de 3 CP por condición (cada muestra de CP a días 2 y 7 de almacenamiento). Con el objetivo de concentrar la proteína en una única banda en un gel SDS-PAGE al 10% se cargaron 100 µg de proteína por *pool* disueltos en el tampón en el que estaban y suplementados con Laemmli.

En el estudio del secretoma de las membranas L-PRF las muestras de secretoma están resuspendidas en el tampón SDS-MS y por tanto la cuantificación se realizó por el método Pierce 660. Para el análisis del perfil del secretoma a día 3 y el análisis diferencial 1D-SDS-PAGE se hizo un *pool* por condición (días 3 y 7) de las muestras de secretoma de 4 donantes. Para el análisis cualitativo y cuantitativo también se hizo un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pool por condición (días 3,7 y 21) de muestras de secretoma de otros 4 donantes distintos.

3.7.2.1 Digestión en gel: Digestión tríptica

Para poder identificar las proteínas presentes en la muestra es necesario un paso previo de digestión. En nuestro caso se realizó un procedimiento de digestión tríptica manual en gel siguiendo el protocolo propuesto por Shevchenko y cols. (146) con algunas modificaciones.

Las bandas del gel donde se encuentran las proteínas, se cortan y se centrifugan a 600 rpm durante 1 minuto. Tras la centrifugación, se elimina el sobrenadante.

A continuación, se realizan 3 lavados con 190 µl de una solución de bicarbonato amónico 50 mM en metanol 50%. Todos los lavados se realizan a temperatura ambiente a una velocidad de 600 rpm y durante 20 minutos.

Tras eliminar el sobrenadante después del último lavado, las muestras se deshidratan mediante una incubación de 10 minutos con 100 µl de acetonitrilo.

Se elimina el sobrenadante por centrifugación a 600 rmp durante 10 minutos y las muestras se secan a vacío en un concentrador SavantTM SPD121P SpeedVacTM durante 10 minutos en modo manual.

Las proteínas embebidas en el gel se someten a un paso de reducción mediante la incubación con 50 µl de DTT 10 mM en bicarbonato amónico 50 mM durante 30 minutos a 56ºC.

Tras la reducción, se realizan de nuevo los pasos indicados anteriormente, 3 lavados con bicarbonato amónico, seguidos de la deshidratación con acetonitrilo y el secado de las muestras a vacío.

En el siguiente paso las muestras se alquilan mediante la incubación de las mismas con 50 µl de yodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM durante 20 minutos en oscuridad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Acabada la alquilación, se repiten de nuevo los mismos pasos de lavado, deshidratación y secado de las muestras a vacío.

Para llevar a cabo la digestión, se añaden 4 µl de trispina porcina modificada a una concentración de 20 ng/µl en bicarbonato amónico 20 mM. Sobre ello se añaden 8 µl de bicarbonato amónico 20 mM para cubrir las muestras y se incuba toda la noche a 37ºC.

Tras la tripsinización y previos al proceso de extracción de los péptidos, las muestras se centrifugan 1 minuto a 600 rpm y se dejan reposar 15 minutos.

A continuación, los péptidos se extraen mediante 3 incubaciones seriadas de 20 minutos y en agitación (1400 rpm) alternando entre 40 y 50 µl de una solución que contiene 60% acetonitrilo y 0.5 % de ácido fórmico. Por último, las muestras se secan a vacío en modo automático durante el tiempo que sea necesario, aproximadamente 150 minutos, y se almacenan a -20ºC.

3.7.2.2 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas Triple TOF

La detección de las proteínas presentes en la muestra se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Tripe TOF siguiendo el protocolo descrito:

Se inyectan 4 µl de los péptidos digeridos de cada muestra en un sistema de cromatografía líquida (Eksigent Technologies nanoLC 400, SCIEX) que utiliza un gradiente en fase reversa y que está acoplado a un espectrómetro de masas Triple TOF 6600 (SCIEX).

Los péptidos se inyectan en una precolumna YMC-TRIART C18 de 3 mm de tamaño de partícula y 120 Å de tamaño de poro (YMC Technologies, Teknokroma Analítica, Barcelona, Spain) acoplada en línea a una columna analítica de sílica YMC-TRIART C18 150 × 0.30 mm con los mismos tamaños de poro y partícula que la precolumna. La bomba genera un caudal de 5 µl/min y opera bajo unas condiciones de gradiente de elución donde se emplea una fase móvil A, compuesta de 0,1% ácido fórmico en agua, y una fase móvil B que contiene 0,1% de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ácido fórmico en acetonitrilo. La separación de los péptidos se realiza empleando un gradiente de 2 a 90 % de fase móvil B durante 90 minutos.

La adquisición de datos se realiza bajo un flujo de trabajo DDA (*data dependent acqusition*) en un sistema TripleTOF 6600 empleando los siguientes parámetros de fuente e interfaz: voltaje de pulverización de iones (*ionspray voltaje floating*, ISVF) de 5500 V, gas cortina (*curtain gas*, CUR) 25, energía de colisión (*collision energy*, CE) 10 y fuente de iones de gas 1 (*ion source gas 1*, GS1) 25.

El equipo se maneja con el software Analyst TF 1.7.1 (SCIEX, USA). El criterio de selección de iones se establece en una fracción masa/carga (m/s) superior a 350 e inferior a 1400, con una carga entre 2-5, una tolerancia de masa de 250 ppm y un umbral de abundancia superior a 200 cuentas. La exclusión dinámica empleada fue de 15 s.

Para el procesado de los espectros se utiliza el software Protein Pilot (versión 5.0.1, Sciex) que emplea el algoritmo Paragon^{TM} para la búsqueda en bases de datos y Progroup^{TM} para el agrupamiento de los datos. Para las búsquedas se emplea la base de datos Uniprot Human (2018_01) aplicando un método no lineal de coincidencia para el cálculo del *false discovery rate* (FDR). Este se fija en un máximo de 1% para la aceptación de las identificaciones obtenidas tanto para péptidos como para proteínas.

3.7.2.3 Creación de la librería para la cuantificación relativa mediante la adquisición por SWATH

Previo a la cuantificación de proteínas mediante SWATH, es necesario crear una librería a través del análisis de péptidos mediante la adquisición de los mismos por cromatografía líquida (LC) acoplada a masas en tándem (MS/MS) siguiendo un flujo de trabajo DDA.

Para ello, se prepara un *pool* de cada condición a analizar en el que todas las muestras se encuentran en la misma proporción, de esta

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

manera se obtiene una buena representación de todos los péptidos y proteínas presentes en las muestras.

Para la separación de los péptidos, se inyectan 4 µl de cada *pool* en un sistema micro-LC Ekspert nLC425 (Eksigen, Dublin, CA, USA) con una columna YCM-TriartC18 (YMC CO.Japan) con las mismas características que la columna analítica del apartado 3.7.2.2 y con un caudal de 5 µl/min. El gradiente de elución que se emplea es fase móvil B en un rango de 5 a 95 % durante 30 minutos, 90% fase móvil B durante 5 minutos y por último 5% de fase móvil B durante otros 5 minutos.

Tras la elución de los péptidos del cromatógrafo, estos se inyectan directamente a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo Triple TOF aplicando 2600 V. El análisis de los datos sigue un flujo de trabajo DDA. Los iones precursores se adquirieren mediante el escaneo en un rango de 400 a 1250 masa/carga durante 250 ms. Esto va seguido por un segundo escaneo en un rango de 100 a 1500 masa/carga durante 25 ms de los 65 primeros iones precursores del primer escaneo durante un ciclo total de 2,8 s. La exclusión dinámica utilizada fue de 15 s.

Para la identificación de los péptidos a partir de los espectros de masas/masas se utilizó el Software PeakView MS/MSALL (versión 2.2, Sciex, Redwood City, CA, USA) con la aplicación SWATH Acquisition (versión 2.0, Sciex).

Los péptidos y proteínas identificados se analizaron con el software Protein Pilot (versión 5.0.1, Sciex) buscando en la base de datos de Human Uniprot especificando alquilación de cisteínas. El FDR se fijó en 1 para péptidos y proteínas. Los péptidos obtenidos de la base de datos Protein Pilot con una puntuación de confianza superior al 99% fueron incluidos en la librería.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.7.2.4 Cuantificación relativa mediante la adquisición por SWATH

Las muestras se analizaron mediante el método de adquisición SWATH-MS llevado a cabo en un espectrómetro TripleTOF 6600 acoplado a un sistema de cromatografía líquida (AB Sciex) mediante un flujo de trabajo *data-independent acqusition* (DIA). Las muestras tanto de VEs (3 *pools* de 3 CP por condición) como de secretoma de membranas L-PRF (un *pool* por condición de muestras de secretoma de 4 donantes) se analizaron mediante *data-independent acquisition* (DIA) haciendo 3 replicados técnicos por muestra.

Se inyectaron 4 µl de cada muestra en el cromatógrafo que operó bajo las mismas condiciones que las descritas para la creación de la librería. Tras la elución de los péptidos, estos se inyectaron en el espectrómetro TripleTOF que en este caso empleó el método de adquisición SWATH-MS. El método se basa en una repetición de ciclos que consiste en la adquisición de 65 lecturas TOF MS/MS (en un rango de 400 a 1500 masa/carga en modo de alta sensibilidad durante 50 ms) de ventanas solapantes de aislamiento de precursores secuenciales (solapamiento 1 masa/carga) cubriendo el rango de 400 a 1250 masa/carga con una lectura TOF MS previa (400 a 1500 m/z, durante 50 ms) para cada ciclo. El tiempo total del ciclo fue de 6,3 s. Para cada condición, el ancho de las ventanas de las 65 lecturas fue optimizado acorde a la densidad de ion encontrada en los análisis DDA utilizando la calculadora SWATH de Sciex.

Para la extracción de los datos de se utilizó el software PeakView (versión 2.2) que utiliza la aplicación *SWATH acquisition* (versión 2.0). Esta aplicación procesa los datos utilizando la librería de espectros creada de los datos dirigidos. Se seleccionaron más de 10 péptidos por proteína y 7 fragmentos por péptido basados en la intensidad de la señal, aquellos péptidos compartidos o modificados fueron excluidos del análisis. Para la extracción de los cromatogramas de iones se seleccionaron ventanas de 5 minutos y de 30 ppm ancho y la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cuantificación SWATH se realizó para todas las proteínas identificadas en la librería por ProteinPilot con un FDR inferior al 1%.

Los cromatogramas de ion se generaron para cada fragmento y las áreas de los picos de los péptidos se obtuvieron mediante el sumatorio de las áreas de los picos de los iones fragmentos correspondientes. PeakView calculó el FDR y una puntuación para cada péptido acorde a los cromatogramas y los espectros y solo aquellos con FDR por debajo de 5% fueron seleccionados para la cuantificación de proteínas. La cuantificación de proteínas se calculó sumando las áreas de los picos de los péptidos correspondientes.

Las áreas integradas de cada pico se exportaron directamente al software MarkerView (AB Sciex) para la cuantificación relativa aplicando la t de Student. Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para comparar la distribución de las muestras.

3.7.3 Inmunodetección

Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos específicos contra las proteínas de interés para su detección. En la presente tesis doctoral esta metodología se empleó para validar, en cohortes independientes, los resultados obtenidos por espectrometría de masas en ambos estudios.

Al finalizar la electroforesis, las proteínas se transfieren del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), empleando el sistema húmedo XCell II™ Blot Module acoplado a la cubeta XCell SureLock™ Mini-Cell siguiendo los pasos descritos a continuación:

Los geles se sumergen en tampón de transferencia para eliminar los restos del tampón de electroforesis y la membrana de PVDF se activa con metanol durante 30 segundos. El sistema XCell II™ Blot Module se monta siguiendo el manual del fabricante y la transferencia se realiza a 200 mA durante 2 horas a 4ºC.

Una vez finalizada la transferencia, las proteínas se encuentran en la membrana y esta se lava con TBS-T durante 10 minutos en agitación y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

se bloquea a 4ºC durante toda la noche con una solución de bloqueo que contiene 5% de BSA.

Al día siguiente, la membrana se incuba con el anticuerpo primario correspondiente a una dilución adecuada, preparada en la misma solución de bloqueo, a temperatura ambiente durante 60-90 minutos dependiendo del anticuerpo. En la Tabla 6 se recoge la información relativa a los anticuerpos utilizados.

Terminada la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lava 3 veces durante 10 minutos y en agitación con TBS-T y a continuación se incuba con el anticuerpo secundario correspondiente (conjugado con peroxidasa de rábano), a una dilución 1:5000 en TBS-T, durante 60 minutos en agitación y a temperatura ambiente.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lava de nuevo 3 veces al igual que en el paso anterior.

Al terminar el último lavado, se elimina el líquido restante y se añaden 2 ml de la mezcla (en una proporción 1:1) de los reactivos de detección I y II del sustrato Pierce ECL Western Blotting a la membrana y se incuba durante 2 minutos.

Pasado ese tiempo, la señal quimioluminiscente de la membrana se detecta con placas radiográficas Amersham Hyperfilm ECL utilizando líquidos de revelado y fijación Agfa.

Por último, se mide la intensidad de las bandas presentes en las placas radiográficas utilizando el programa ImageJ.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Anticuerpos empleados para inmunodetección.

Anticuerpo primario	Casa comercial	Referencia	Dilución	IgG (Isotipo)
Actina	Merck Millipore	MAB1501	1:1000	Monoclonal ratón
Integrina alpha IIb	Santa Cruz Biotechnology	sc-15328	1:500	Policlonal conejo
CD9	Santa Cruz Biotechnology	sc-9148	1:1000	Policlonal conejo
MMP9	Cell Signaling Technology	3852	1:1000	Policlonal conejo
TSP-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-73158	1:300	Monoclonal ratón
Fibrinógeno	Santa Cruz Biotechnology	sc-69775	1:1000	Monoclonal ratón
C3	Santa Cruz Biotechnology	sc-28294	1:500	Monoclonal ratón
CATS	Santa Cruz Biotechnology	sc-271619	1:500	Monoclonal ratón
RANKL	Santa Cruz Biotechnology	sc-377079	1:500	Monoclonal ratón
OPG	Abcam	ab-73400	1:1000	Policlonal conejo
GAPDH	Merck	G9545	1:500	Policlonal conejo
IgG anti-conejo	Pierce (Thermo Scientific)	31460	1:5000	Policlonal cabra
IgG anti-ratón	Pierce (Thermo Scientific)	31430	1:5000	Policlonal cabra

3.7.4 Inmunodetección mediante tecnología multiplex

La inmunodetección mediante tecnología multiplex se basa en un ensayo de inmunodetección que permite detectar y cuantificar múltiples proteínas secretadas a la vez gracias al uso de microesferas magnéticas del mismo tamaño pero que se caracterizan por presentar una proporción diferente de fluoróforos rojos e infrarrojos. La conjugación de un anticuerpo distinto a una microesfera permite la detección y el análisis de múltiples proteínas en un mismo pocillo.

Se utilizaron los kits de detección de factores de crecimiento y citoquinas de la casa Millipore para cuantificar distintas proteínas en las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

muestras. El protocolo que se detalla a continuación es el proporcionado por el fabricante:

En primer lugar, se reconstituye el vial del standard con 250 µl de agua desionizada y se preparan las diluciones seriadas del mismo empleando una solución que trae el propio kit.

A continuación, los pocillos de la placa se bloquean añadiendo 200 µl de una solución de ensayo que trae el kit y se incuba en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se decanta el reactivo y se añaden 25 µl de cada solución estándar por pocillo y sobre ellos se añaden 25 µl de matrix solution proporcionada por el fabricante. En el resto de pocillos se añaden 25 µl de la solución de ensayo y 25 µl de cada muestra. Por último, se añaden 25 µl de las microesferas en todos los pocillos y se incuba la placa en oscuridad y agitación a 4ºC durante toda la noche.

Al día siguiente, la placa se coloca sobre un soporte magnético y se retira la muestra por decantación. A continuación, se realizan 3 lavados con 200 µl de la solución de lavado de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente y en agitación.

Tras los lavados, se añade a cada pocillo 50 µl del anticuerpo de detección y se incuba durante 30 minutos en agitación, oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se añaden 50 µl de estreptavidina-ficoeritrina a cada pocillo y se incuba la placa de nuevo 30 minutos en agitación, oscuridad y a temperatura ambiente.

Terminada la incubación con estreptavidina, la placa se coloca de nuevo sobre el soporte magnético y se decanta el contenido de los pocillos. A continuación, se realizan 3 lavados con 200 µl de la solución de lavado de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente y en agitación.

Tras el último lavado, se añaden 100 µl de Sheath Fluid a cada pocillo para resuspender las microesferas y se incuba durante 5 minutos en agitación y oscuridad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por último, se mide la fluorescencia en el equipo Luminex 200 TM. La intensidad media de la fluorescencia (MFI) se analizó utilizando un método de ajuste de línea-curva logística de 5 parámetros para calcular las concentraciones de analito en las muestras mediante el software xPONENT 3.1 (Luminex).

3.8 ENSAYOS CELULARES

3.8.1 Cultivos celulares

En este trabajo se emplearon diferentes líneas celulares para evaluar el efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre los mismos. Todos los tipos celulares empleados se cultivaron en condiciones estériles y se mantuvieron en condiciones controladas de presión de CO_2 (5%), temperatura (37ºC) y humedad relativa (95%).

3.8.1.1 Descongelación celular

Las células se encuentran almacenadas en viales criogénicos en un tanque de nitrógeno líquido. Para descongelarlas, se retira el vial criogénico del tanque de nitrógeno líquido y se pone en hielo para que descongele lentamente. Sobre el vial se añade 1 ml del medio atemperado correspondiente según el tipo celular y la suspensión celular se siembra en una placa de 100 mm de diámetro, donde previamente se han añadido 10 ml de medio de cultivo. Pasadas 24 horas de la descongelación, se realiza un cambio de medio para eliminar los restos de DMSO que contenía el medio de congelación.

3.8.1.2 Expansión celular

Cuando las células alcanzan un 80-90% de confluencia, dependiendo del tipo celular, se realiza la expansión celular con el fin de obtener un mayor número de células. Se elimina el medio de la placa y se realizan 2 lavados con PBS para eliminar posibles restos de FBS presentes en el medio. A continuación, se añade 0,05 % tripsina-EDTA y se incuba alrededor de 5 minutos para romper los enlaces entre células y con la placa. Cuando las células se han despegado se detiene la reacción añadiendo medio de cultivo con 10% de FBS y la mezcla se siembra en varias placas de 100 mm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.8.1.3 Congelación celular

Con el fin de guardar alícuotas de células en pases bajos para posteriores experimentos, tras detener la tripsinización, las células se centrifugan a 1000 g durante 10 min. A continuación, se retira el medio y el *pellet* se resuspende en el medio de cultivo con una concentración de FBS diferente según el tipo celular y con un 5% de DMSO.

3.8.1.4 Siembra celular

Dependiendo del experimento a realizar las células se siembran en placas de 24, 48 o 96 pocillos. Tras detener la tripsinización, se recoge una alícuota de células para el contaje y el resto se traspasa a un tubo de 15 ml y se centrifugan a 1000 g durante 10 min. La concentración de células por mililitro se determina empleando una cámara de Neubauer. Al terminar la centrifugación, el sedimento celular se resuspende en un volumen de medio adecuado para sembrar las células a la densidad requerida por pocillo según el experimento.

3.8.1.5 Fijación celular

Con el objetivo de conservar la arquitectura y morfología, las células se fijan tras el fin de algún ensayo con el propósito de analizar algún otro parámetro en el futuro. Tras terminar el experimento, el medio se retira de cada pocillo y este se lava con PBS frío durante 5 minutos. A continuación, las células se fijan durante 20 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4%. Pasado ese tiempo, el paraformaldehído se elimina y los pocillos se lavan con PBS durante 5 minutos. Las células ahora ya están fijadas y se sustituye el PBS del lavado por fresco y se guarda la placa a 4ºC para evitar que las células se sequen.

3.8.1.6 Lisis celular

La lisis celular permite obtener las proteínas citosólicas celulares para analizar cambios a este nivel. Tras terminar eliminar el medio, las células se lavan con PBS y se lisan añadiendo tampón de lisis. A continuación, se raspa la placa para despegar las células y el lisado celular se recoge y mantiene en hielo durante 30 minutos. Pasado ese

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tiempo se centrifuga a 15000 g durante 10 minutos a 4ºC. Por último, el lisado se transfiere a un nuevo tubo y se almacena a -80ºC.

3.8.2 Ensayos celulares con fibroblastos

Los fibroblastos empleados NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblast*) son fibroblastos humanos adultos aislados de la piel del abdomen de una donante mujer de 36 años de edad y adquiridos a la casa comercial Promocell. Estas células se cultivaron en un medio DMEM alto en glucosa con FBS al 10%, Glutamax a 1x y penicilina-estreptomicina al 1%. Todos los experimentos llevados a cabo con fibroblastos, estos se encontraban entre el pase 4-10.

3.8.3 Ensayos celulares con osteoblastos

Los osteoblastos empleados NHO (*Normal Human Osteoblast*) son osteoblastos humanos procedentes del fémur de un donante varón de 13 años de edad y adquiridos a la casa comercial Lonza. Estas células se cultivaron en *Osteoblast Growth Media* (Promocell) conteniendo *SupplementMix* (Promocell) mezclados en la proporción indicada por el fabricante, de forma que la concentración final de FBS en el medio era del 10% y 1% de penicilina-estreptomicina. En el momento de la realización de los experimentos los osteoblastos se encontraban en pase 6.

Con el fin de analizar el efecto del secretoma sobre la viabilidad y la capacidad osteogénica de los osteoblastos, tras levantar y contar las células estas se resuspenden en un volumen adecuado del medio de mantenimiento para sembrar 25000 células por pocillo en una placa multipocillo de 24. Cuando el cultivo alcanza la confluencia, el medio se reemplaza por los tratamientos y las células se mantienen en cultivo durante 14 días y el medio se recoge y se reemplaza por medio fresco los días 2, 9 y 14 de cultivo.

El medio recogido en los distintos momentos se emplea para medir citotoxicidad de los tratamientos y también distintos marcadores de diferenciación osteogénica.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En este caso se evaluaron 4 condiciones: Control negativo (*Osteoblast Growth Media + SupplementMix),* Control BMP-5 0,1 ng/ml (*Osteoblast Growth Media + SupplementMix* + 0,1 ng/ml BMP-5), Tratamientos con secretoma a días 3 y 7 (*Osteoblast Growth Media + SupplementMix* + secretoma día 3 o 7 a 0,1 ng/ml de BMP-5).

3.8.4 Ensayos celulares con células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales empleadas hMSC (*human Mesenchymal Stem Cells*) son células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea de un varón de 31 años de edad. Estas células se cultivaron en un medio α-MEM alto en glucosa con FBS al 10%, Glutamax a 1x y penicilina-estreptomicina al 1%. En el momento de la realización de los experimentos las células madre mesenquimales se encontraban en pase 4.

Con el objetivo de analizar el efecto del secretoma sobre la capacidad de diferenciación de estas células a líneas osteogénicas, tras tripsinizar y contar las células, estas se resuspenden en un volumen adecuado del mismo medio utilizado en el mantenimiento para sembrar 30000 células por pocillo en una placa multipocillo de 24. Cuando las células alcanzan la confluencia, el medio se reemplaza por los tratamientos y se mantienen en cultivo durante 21 días. Tras este periodo, el medio reemplaza cada 2-3 días por medio fresco y se recoge los días 2, 7, 14 y 21 de cultivo.

En este caso se evaluaron 4 condiciones: Control negativo (α-MEM + 10% FBS + 1% penicilina/estreptomicina), Tratamiento con secretoma día 3 (α-MEM + 10%FBS + 1% penicilina/estreptomicina + 3% muestra secretoma día 3), Tratamiento con secretoma día 7 α-MEM + 10% FBS + 1% penicilina/estreptomicina + 3% muestra secretoma día 7) y Control positivo (α-MEM + 10% FBS + 1% penicilina/estreptomicina + 50 µl/ml ácido ascórbico, 200 nM hidrocortisona 21 hemisuccinato + 10 mM β-glicerolfosfato).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.8.5 Ensayo de proliferación celular por el método MTT

La proliferación celular es un proceso por el cual una célula crece y se divide para dar lugar a dos células hijas. El método empleado para medir este parámetro fue desarrollado por Mosmann (147) en 1983 y modificado posteriormente por Francois Denizot y Rita Lang (148).

Este ensayo se basa en la reducción del metil tiazol tetrazolium (MTT), un compuesto de color amarillo, por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color violáceo (Formazan).

El protocolo que se siguió para llevar este ensayo se detalla a continuación:

Una vez levantados los fibroblastos y tras hacer el recuento celular, estos se resuspenden en el volumen del mismo medio utilizado para la expansión adecuado para sembrarlos a 10000 células por pocillo en una placa multipocillo de 96.

Tras la siembra, las células se cultivaron hasta alcanzar el 50% de confluencia (entre 24 y 48 horas) y seguidamente se añade a cada pocillo el estímulo correspondiente. A continuación, las placas se cultivaron durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Pasado ese tiempo, se añadieron 10 µl de MTT (5 mg/ml) por pocillo para que quede a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incuba durante 4 horas a 37ºC y 5% de CO_2.

Pasadas las 4 horas se añaden 100 µl de una solución SDS al 10% en 0,01M de HCl y se incuba entre 14-16 h a 37ºC y 5% de CO_2. Por último, se mide la absorbancia a 595 nm.

3.8.6 Ensayo de cierre de herida

Cuando se produce una herida las células migran para cerrarla. Este ensayo se basa en generar una "herida" artificial y medir la velocidad de migración de las células empleando el protocolo que se describe a continuación:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez tripsinizados los fibroblastos y tras su recuento, se resuspenden en un volumen del mismo medio empleado para la expansión para sembrar 40000 células por pocillo en una placa multipocillo de 48. Las células se cultivan hasta alcanzar la confluencia en el pocillo (entre 48 y 72 horas) y cuando esto ocurre se sustituye el medio por otro que contiene 1% de FBS y en este se incuba durante 24 horas a 37ºC y 5% de CO_2. Reduciendo la concentración de suero presente en el medio, se consigue detener el ciclo celular y así observar solamente la migración celular. Pasadas 24 h, se realiza la herida en cada pocillo utilizando una punta de pipeta p200 estéril. Posteriormente, se elimina el medio, se hacen dos lavados con PBS y se añade el tratamiento a cada pocillo.

A continuación, la placa se coloca sobre la platina del microscopio (Leica DMI6000 B, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) para realizar las fotografías de la herida a tiempo 0 empleando el objetivo de 4x. La platina del microscopio se encuentra rodeada por una cámara de metacrilato que permite mantener las condiciones de CO_2 y temperatura durante todo el experimento. Tras enfocar en cada pocillo la zona de la herida, y realizar la fotografía, se selecciona en el software LASX la posición donde la herida se encuentra y se configura para que realice fotografías cada 2 horas en cada posición seleccionada durante 48-72 horas.

Al finalizar la captura de las imágenes, estas se analizan con el Software de análisis de imagen FijiImageJ empleando la herramienta MRI_Wound_Healing_Tool.

3.8.7 Ensayo de citotoxicidad mediante la medida de la lactato deshidrogenasa (LDH)

Este ensayo desarrollado por Decker y Lohmann-Matthes (149) en 1988 consiste en la medida de la actividad de la enzima LDH, una enzima citoplasmática que se libera al exterior cuando se rompe la integridad de la membrana plasmática de las células.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para medir la actividad de esta enzima se emplea el kit *Cytotoxicity Detection* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) siguiendo las instrucciones detalladas por el fabricante:

En primer lugar, se colocan 100 µl de muestra (medio recogido a distintos momentos del cultivo) por pocillo en una placa mutipocillo de 96 de fondo plano.

A continuación, se prepara la mezcla del catalizador y el *dye,* siguiendo las indicaciones del fabricante. Sobre la muestra se añaden 100 µl de la mezcla y se incuba durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se mide la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 490 nm.

3.8.8 Medida de la actividad de la fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima que está presente en varios tejidos, entre ellos el hueso. La actividad de esta enzima se determina mediante un ensayo colorimétrico que emplea como sustrato de la fosfatasa el p-nitrofenilfosfato. La fosfatasa alcalina cataliza este sustrato danto lugar al p-nitrofenil, un compuesto no coloreado, pero que a pH básico se desprotona dando lugar a p-nitrofenolato, una molécula con una coloración amarilla característica. Los pasos a seguir para la realización de este ensayo se detallan a continuación:

Se incuban 25 µl de muestra (medio recogido a distintos momentos del cultivo) con 100 µl de p-nitrofenilfosfato durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se detiene la reacción añadiendo 50 µl de NaOH 3 M por pocillo y se mide la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 405 nm.

3.8.9 Ensayo de determinación de depósitos de calcio

Para determinar la mineralización se emplea una técnica que permite teñir los depósitos de calcio con Rojo Alizarina. Este compuesto quela el calcio provocando la formación de un precipitado. El protocolo empleado se describe seguidamente:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tras fijar las células y el lavado posterior con PBS, este se retira por completo y se añade 1 ml de Rojo Alizarina por pocillo y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

A continuación, se elimina el tinte y se lava cada pocillo 5 veces con agua destilada. Posteriormente, se añaden 200 µl por pocillo de *Cetylpyridinium chloride* al 10% y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Por último, se trasvasa el volumen a una placa multipocillo de 96 con fondo plano y se mide la absorbancia a 562 nm.

3.9 ANÁLISIS DE DATOS

3.9.1 Análisis de biología de sistemas

Con el objetivo de procesar el gran número de identificaciones derivadas de los análisis proteómicos se emplearon diferentes programas de biología de sistemas. Los softwares Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systemas, CA, USA) (150), String (151) y Reactome (152) fueron los empleados para conocer los diferentes procesos biológicos en los que participan las proteínas identificadas. Además, también se utilizó el programa FunRich (153) para conocer los sitios de expresión de las proteínas expresadas diferencialmente entre condiciones. Específicamente, la combinación del software Cytoscape junto con la herramienta Wikipathway se empleó para analizar potenciales vías de señalización alteradas en el estudio del proteoma de las VEs derivadas de CP.

La base de datos Uniprot® se empleó para consultar la información disponible relativa a la función, localización y expresión, entre otras, de las proteínas identificadas. Particularmente, la base de datos Vesiclepedia (154) se utilizó en el estudio del proteoma de las VEs derivadas de CP para buscar información sobre su identificación en otros estudios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.9.2 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 7 (GraphPadSoftware, La Jolla, CA, EEUU). Antes de realizar los análisis comparativos entre grupos se llevó a cabo un análisis de normalidad aplicando el test D´Agostino para conocer si los datos se ajustan a una distribución Gaussiana. En el caso de comparación de dos grupos que se ajusten a una distribución normal se aplica la t de Student. Si por el contrario no cumplen el requisito de la distribución normal o la n es muy pequeña, se aplica el test de Wilcoxon.

Para la comparación de más de dos grupos se emplea el análisis de la varianza *One way Anova* aplicando el test correspondiente según si las muestras son o no pareadas y se ajustan o no a una distribución Gaussiana. En el caso de ser muestras pareadas, pero que no se ajusten a una distribución normal se aplica el test de Friedman con el análisis post hoc Dunn´s. Por el contrario, si las muestras son no pareadas y tampoco se ajustan a una distribución no paramétrica el test que se utiliza es el Kruskal-Wallis. En el caso de que las muestras no sean pareadas, pero si se ajusten a una distribución normal el test que se emplea es el Holm-Sidak.

Por último, para la comparación de más de una variable entre dos o más grupos se emplea el análisis de la varianza *Two way Anova*. En el caso de que los datos no se ajusten a una distribución normal, pero el objetivo sea comparar la media de cada condición con la media de las otras condiciones, se emplea el test Bonferroni. Por el contrario, el objetivo es comparar la media de cada condición con la media de una condición determinada, un control, por ejemplo, se utiliza el test de Dunnett.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1 Estudio del contenido de las VEs liberadas por los CP tratados con Mirasol durante el almacenamiento

Las VEs almacenan en su interior proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas bioactivas que participan en la comunicación célula-célula desencadenando procesos de inmunidad, inflamación o hemostasia. A consecuencia de ello, el papel del cargo de las vesículas como fuente de biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diferentes patologías ha despertado la curiosidad en la comunidad científica. Las VEs son liberadas por múltiples tipos celulares, siendo las plaquetas una fuente importante de ellas cuando estas se activan. La necesidad de tener disponibles unidades de plaquetas en los bancos de sangre para situaciones en las que sea necesaria su aplicación, hace necesario el almacenamiento de las mismas dando lugar a la liberación de VEs. Su contenido puede ser relevante a nivel de posibles reacciones adversas que se desencadenan en el receptor tras una transfusión. Por ello, el objetivo principal de esta primera parte de la tesis doctoral fue el análisis del contenido de las VEs liberadas por los CP durante el almacenamiento con el fin de identificar marcadores de lesión plaquetaria derivados de la conservación que pueden dar lugar a reacciones adversas en el receptor.

4.1.1 Caracterización de las VEs

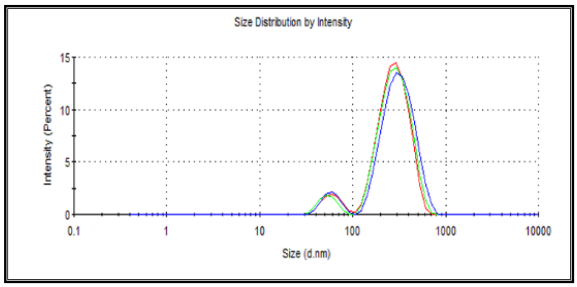
Las VEs presentes en los CP fueron aisladas siguiendo un protocolo estandarizado de centrifugaciones seriadas que no permite separar las diferentes subpoblaciones presentes en la muestra, como ya se detalló en el apartado 3.3. Por ello, tal y como recomienda la ISEV, se emplearon técnicas de microscopía electrónica de barrido y análisis de dispersión de luz para, en primer lugar, caracterizar las poblaciones de VEs presentes en las muestras tras el aislamiento.

Mediante distribución de luz (DDL), se detectaron dos poblaciones, una con un tamaño de partícula entre los 10-100 nm que corresponde a los exosomas y otra entre los 100-1000 nm que corresponde a las microvesículas (Figura 9A). A su vez, estos tipos de vesículas también se observaron mediante microscopía electrónica de barrido en muestras

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de VEs procedentes de los CP almacenados a distintos tiempos (día 2 y 7). Se observan vesículas con tamaños inferiores a los 100 nm, con un tamaño medio de unos 60 nm y unas vesículas con un tamaño superior alrededor de los 100 nm (Figura 9B). Esto confirma que el protocolo empleado permite aislar ambas poblaciones de VEs.

A)



B)

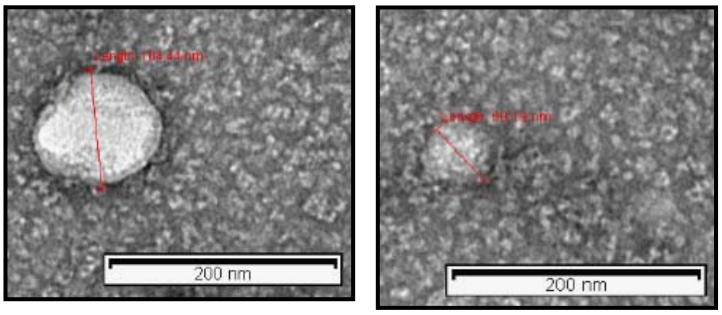


Figura 9. Caracterización de las subpoblaciones de VEs derivadas de CP: MVs y exosomas. A) Distribución de partículas por tamaño mediante el análisis de la distribución de luz (DDL). Se identificaron dos poblaciones, los exosomas entre 30-100 nm y las MVs entre 100-1000 nm. Las líneas azul roja y verde representan triplicados. **B)** Caracterización por microscopía electrónica de transmisión: MVs (tamaño >100 nm) y exosomas (alrededor de los 60 nm). Se muestran imágenes ampliadas y representativas de MVs y exosomas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.2 Análisis cualitativo del proteoma de las VEs presentes a distintos días de almacenamiento en CP tratados con la tecnología Mirasol

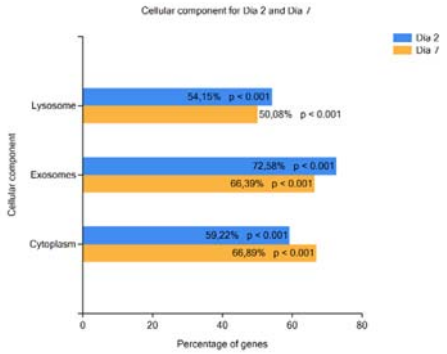
En cuanto al análisis proteómico, en primer lugar, se llevó a cabo un análisis cualitativo de las muestras para conocer el proteoma de las VEs derivadas de las plaquetas durante el almacenamiento. Para este análisis se emplearon 9 muestras de VEs aisladas de CP recogidos a días 2 y 7 de almacenamiento. Dado que la cantidad de proteína era limitante, se hicieron 6 *pools*, (3 para día 2 y 3 para día 7) con 3 muestras de VEs cada uno y se analizaron individualmente mediante LC-MS/MS.

Tras el análisis se identificaron un total de 785 proteínas únicas, 535 proteínas identificadas en las muestras de VEs pertenecientes al día 2 de almacenamiento y 709 identificadas a día 7. Debido a que las muestras pertenecen a los mismos CP, solo que recogidas a distintos tiempos, era de esperar un gran solapamiento de las proteínas identificadas entre condiciones y que en este caso correspondieron a 459. La lista completa de las proteínas identificadas está detallada en la Tabla suplementaria 1.

El análisis detallado de las identificaciones, mediante biología de sistemas utilizando el software FunRich, mostró que el componente celular principal al que estaban asociadas las proteínas identificadas en ambas condiciones eran los exosomas, confirmando por tanto la presencia de muchas de las proteínas relacionadas con esta subpoblación de VEs en los CP. Concretamente, un 72,6 % de las proteínas identificadas a día 2 se encuentran en esta localización subcelular frente a las 66,4% presentes a día 7 (Fig. 10A) Atendiendo a las proteínas que están implicadas en las distintas vías biológicas, encontramos que la hemostasia, la cascada del complemento y la activación y señalización plaquetaria son las rutas principales donde participan la mayoría de proteínas identificadas en ambas condiciones (Fig. 10B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A)



B)

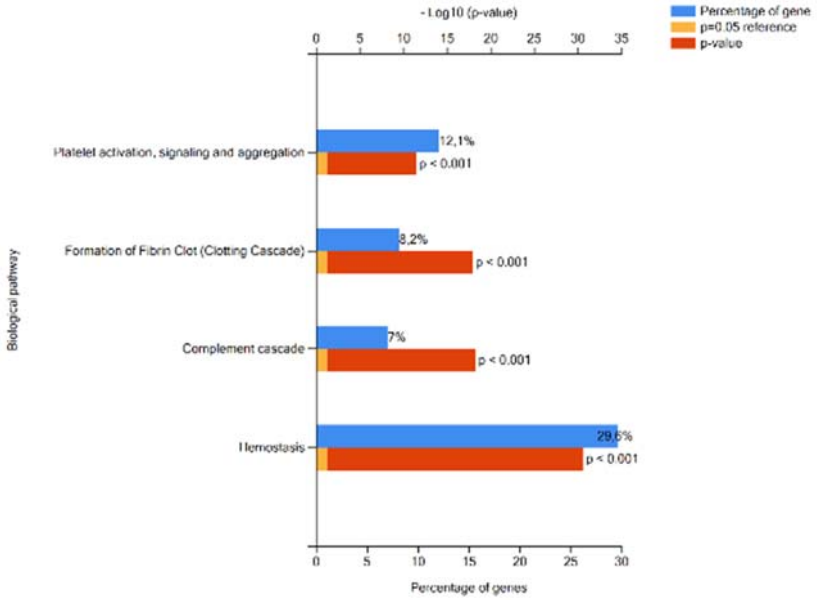


Figura 10. Análisis de biología de sistemas (FunRich) de las proteínas identificadas en las muestras de VEs aisladas a días 2 y 7 de almacenamiento de los CP. A) Representación de los principales componentes celulares donde se encuentran las proteínas identificadas en las muestras de VEs a día 2 (azul) y 7 (amarillo) de almacenamiento. **B)** Representación de las principales rutas biológicas en las que participan las proteínas identificadas en las VEs a día 2 y 7 de almacenamiento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A pesar del gran solapamiento encontrado entre condiciones, cabe destacar la presencia de alguna proteína concreta como es el caso de la proteína S100A9, solamente identificada en las VEs liberadas en los CP en el segundo día de almacenamiento, y que se postuló recientemente como un marcador de plaquetas jóvenes. Sin embargo, uno de los principales receptores de colágeno presente en las plaquetas, la glicoproteína VI (GPVI), solamente se identificó en las VEs procedentes de los CP almacenados durante 7 días.

Una gran parte de las proteínas encontradas solamente en la condición de día 2 de almacenamiento son inmunoglobulinas y proteínas del sistema HLA, siendo por tanto el sistema inmunitario la principal ruta biológica donde se engloban estas identificaciones. Sin embargo, la activación, señalización y agregación plaquetaria fue la ruta principal donde participaban la gran mayoría de proteínas identificadas solamente en la condición de día 7, indicando que existe una alteración de la función plaquetaria en ese momento.

4.1.3 Análisis cuantitativo del proteoma de las VEs presentes a distintos días de almacenamiento en CP tratado con la tecnología Mirasol

Para conocer con mayor precisión las diferencias entre las proteínas expresadas en las VEs liberadas por los CP a distintos tiempos de almacenamiento, se llevó a cabo la cuantificación relativa, en las mismas muestras empleadas para el análisis cualitativo, mediante el método de adquisición SWATH-MS siguiendo un flujo de trabajo DIA y empleando el software MarkerView para realizar la cuantificación.

El análisis de componentes principales mostró que no existía gran variabilidad en la distribución de las muestras entre condiciones y replicados (Fig. suplementaria 1). En el análisis diferencial se identificaron un total de 415 proteínas, pero aquellas con un p-valor inferior a 0,05 y un *fold change* igual o superior a 2 fueron seleccionadas como las más relevantes. Atendiendo a los parámetros fijados, se obtuvieron 151 proteínas aumentadas y 3 disminuidas en las VEs derivadas de CP almacenadas durante 7 días.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El análisis de las proteínas aumentadas con el software de biología de sistemas Reactome permitió descubrir las rutas biológicas en las que participan las proteínas expresadas diferencialmente. Algunas están relacionadas con el estado fisiológico de las plaquetas presentes en los CP (activación plaquetaria, metabolismo de carbohidratos y respuesta celular al estrés) y otras podrían estar asociadas a posibles reacciones adversas postransfusionales como alteraciones en la hemostasia y el sistema inmunitario. Relacionada con la respuesta inmunitaria se encuentra la proteína CCL5, también conocida como RANTES, que fue la identificada con el mayor valor de *fold change*, 10. Esta proteína es liberada por las plaquetas tras su activación, junto con otras como PF4 y numerosas glicoproteínas que también se encontraron aumentadas en las VEs liberadas por los CP a día 7 (Tabla 7), lo que sugiere un estado de hiperactivación plaquetaria en ese momento del almacenamiento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Selección de proteínas aumentadas en las VEs a día 7 de almacenamiento versus día 2 (*fold change* ≥2).

Código Uniprot	Nombre de la proteína	*Fold change*
Proteínas de señalización, secretadas y receptores plaquetarias		
CCL5_HUMAN	*C-C motif chemokine 5*	10
ITB3_HUMAN	*Integrin beta-3*	4,2
ITA2B_HUMAN	*Integrin alpha-IIb*	4,2
GP1BB_HUMAN	*Platelet glycoprotein Ib beta chain*	3,8
GPIX_HUMAN	*Platelet glycoprotein IX*	3,8
CLC1B_HUMAN	*C-type lectin domain family 1 member B*	3,6
ITA6_HUMAN	*Integrin alpha-6*	3,6
SCRB1_HUMAN	*Scavenger receptor class B member 1*	3,3
LYN_HUMAN	*Tyrosine-protein kinase Lyn*	2,7
ITA2_HUMAN	*Integrin alpha-2*	2,6
ITB1_HUMAN	*Integrin beta-1*	2,5
CSK_HUMAN	*Tyrosine-protein kinase CSK*	2,4
PLF4_HUMAN	*Platelet factor 4*	2,3
GP1BA_HUMAN	*Platelet glycoprotein Ib alpha chain*	2,0
Proteínas relacionadas con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno		
PRDX6_HUMAN	*Peroxiredoxin-6*	4,2
GSTP1_HUMAN	*Glutathione S-transferase P*	3,9
GSTO1_HUMAN	*Glutathione S-transferase omega-1*	3,9
Proteínas citoesqueléticas		
DEST_HUMAN	*Destrin*	7,2
COF1_HUMAN	*Cofilin-1*	6,8
VINC_HUMAN	*Vinculin*	4,5
TLN1_HUMAN	*Talin-1*	4,2
CAN1_HUMAN	*Calpain-1 catalytic subunit*	3,1
FLNA_HUMAN	*Filamin-A*	2,7
ACTN1_HUMAN	*Alpha-actinin-1*	2,6
GELS_HUMAN	*Gelsolin*	2,6
MOES_HUMAN	*Moesin*	2,1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la Tabla 7 aparecen otras proteínas aumentadas a día 7 de almacenamiento y que son indicativas del gran estrés celular que están sufriendo las plaquetas en ese momento. Estas son proteínas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, concretamente con la glicólisis, que resulta ser la principal ruta afectada en este caso. Entre ellas destacan canales transportadores de glucosa al interior de las células (SLC2A3) y enzimas que regulan las últimas reacciones de la producción de lactato (Fig. 11). Incluso a nivel mitocondrial las plaquetas se ven afectadas y esto se refleja en la expresión diferencial de proteínas que participan en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, como es el caso de la enzima glutatión, también aumentada a día 7.

Además, muchas proteínas citoesqueléticas fueron encontradas sobreexpresadas día 7 (Tabla 7), por ejemplo, DSTN y CFL1, con valores de *fold change* de 7,2 y 6,8, respectivamente. Estas proteínas, concretamente, están relacionadas con la formación de microvesículas a través de la despolimerización de la actina y la integrina αIIb.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

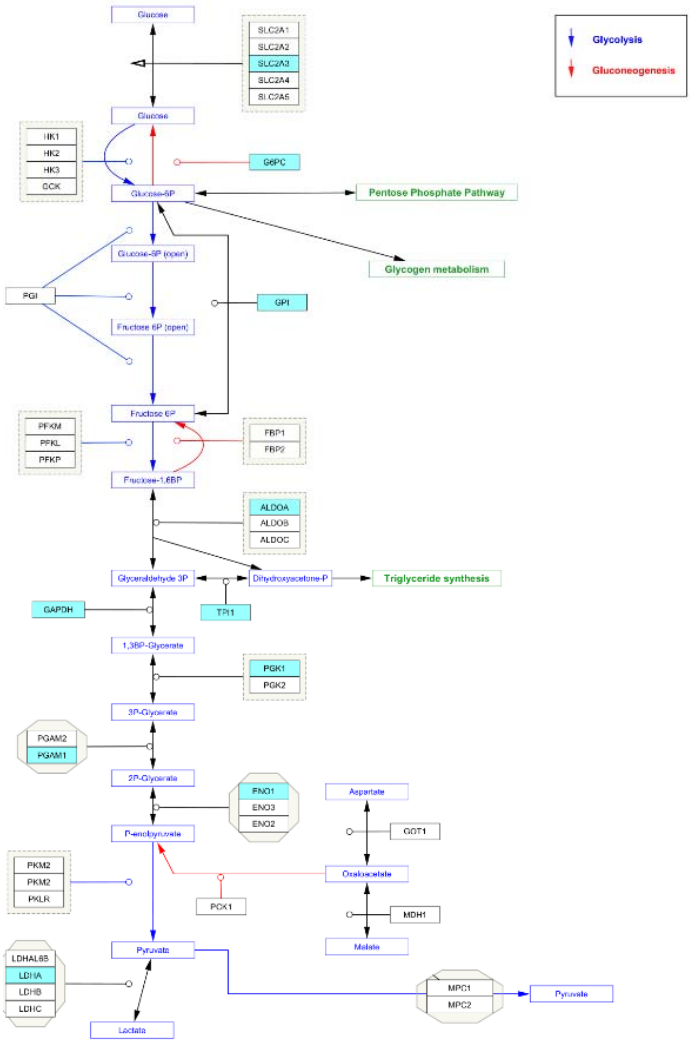


Figura 11. Análisis de las proteínas aumentadas a día 7 de almacenamiento que participan en en la ruta de la glicólisis mediante biología de sistemas con Cytoscape-Wikipathway: Algunas de las proteínas identificadas están implicadas en la glicólisis y gluconeogénesis, indicando el estado metabólico de las plaquetas durante el almacenamiento. Muchas proteínas forman parte de esta vía y fueron encontradas aumentadas a en las VEs a día 7 de almacenamiento (azul), especialmente enzimas que regulan las últimas reacciones para la producción de lactato.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.4 El número de MVs está afectado por la variabilidad inter-individual

Puesto que la gran mayoría de proteínas presentes en las VEs derivadas de CP se encuentran enriquecidas a día 7 de almacenamiento, se planteó si esto podría ser debido a un mayor número de VEs en esta condición. Para ello se cuantificaron los niveles de MVs superiores a 160 nm y doble positivas para Anexina V y CD41 en el PFP procedente de 7 CP, 3 de ellos empleados en el análisis proteómico y los 4 restantes utilizados en las validaciones.

El resultado obtenido indica que existe una gran variabilidad en el número de MVs por microlitro (MVs/µl) entre las muestras analizadas a distintos tiempos de almacenamiento (Fig. 12), derivado probablemente de la variabilidad inter-individual entre los donantes que conforman cada CP. Por tanto, el enriquecimiento de las proteínas a día 7 no presenta relación con el número de MVs. Sin embargo, cabe resaltar que la metodología empleada no permitía la detección de los exosomas debido a su pequeño tamaño.

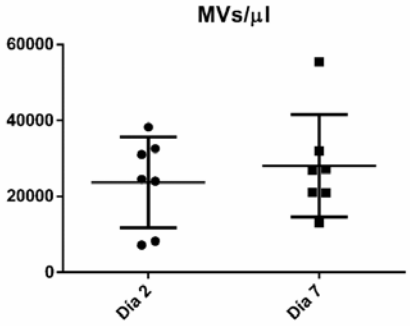


Figura 12. El análisis de citometría de flujo confirma la variabilidad en el número de MVs liberadas por las plaquetas entre las muestras y el tiempo de almacenamiento. Se muestra el número de MVs por microlitro, doble positivas para CD41 y Anexina V a diferentes días de almacenamiento. Los datos representan la media ± SD del número de MVs de las 7 muestras analizadas por condición.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.5 Validaciones de los resultados mediante inmunodetección: Aumento de los niveles de CD9, ACTN1 e ITA2B con el tiempo de almacenamiento

Con el fin de validar los resultados obtenidos, se realizó un ensayo de inmunodetección en una cohorte independiente de muestras contra algunas de las proteínas aumentadas a día 7 en el análisis cuantitativo. Además, se incluyeron muestras recogidas a un punto intermedio (día 4). Entre las proteínas a validar se seleccionó la ACTN1, puesto que es una proteína que se une a la actina, el componente más importante del citoesqueleto, CD9 (como marcador de exosomas) e ITA2B (receptor plaquetario esencial para agregación y marcador de VEs derivadas de plaquetas).

Las proteínas se validaron en muestras de VEs derivadas de cuatro CP independientes y de manera individual. El resultado obtenido es indicativo de que existe un aumento en la expresión de esas proteínas a día 7 con respecto a día 2 (Fig. 13A), confirmando los resultados obtenidos previamente por espectrometría de masas. Además, se analizaron otros cuatro CP, también de forma individual, incluyendo un punto intermedio de análisis (día 4), reafirmando que el enriquecimiento de estas proteínas en las VEs se produce a medida que se prolonga el tiempo de almacenamiento siendo esta diferencia estadísticamente significativa entre los días 2 y 7 (Fig. 13B-C)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

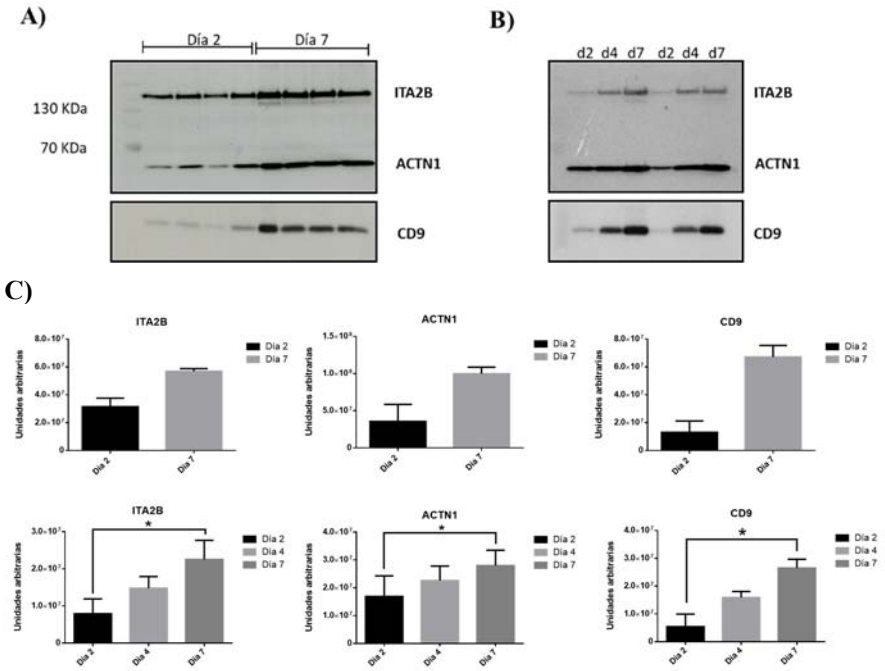


Figura 13. Confirmación del aumento de los niveles de CD9, ACTN1 e ITA2B en las VEs liberadas por los CP a días 4 y 7 de almacenamiento. A) Validación de los resultados obtenidos por SWATH en una nueva cohorte de 4 muestras de CP independientes analizadas a días 2 y 7; **B)** Imagen representativa de la validación en una cohorte independiente de muestras de CP incluyendo un punto intermedio de almacenamiento, día 4. "d" significa día. **C)** Resultados obtenidos mediante densitometría de las bandas detectadas por inmunodetección. En el caso de dos condiciones las barras representan la media ± SD de 4 donantes y se empleó el test de Wilcoxon. En el caso de tres condiciones las barras representan la media ± SD de 3 donantes y se utilizó *one way anova* empleando el test de Friedman con el análisis post hoc de Dunn´s. *p<0,05

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2 Estudio de caracterización del perfil proteómico del secretoma de las membranas L-PRF

Muchas son las ramas de la medicina que a día de hoy están empleando distintos concentrados de plaquetas para la mejora y el tratamiento de distintas patologías, observando efectos beneficiosos en el paciente. Se ha descrito que tienen relevancia a nivel molecular reduciendo el dolor y la inflamación y acelerando el cierre de heridas en muchos casos cronificadas. Las moléculas liberadas por las plaquetas y los leucocitos presentes en las membranas L-PRF son las responsables de los efectos positivos tras su aplicación. Por ello, el objetivo de este capítulo es conocer el perfil proteico del secretoma de las membranas y cuantificar su liberación a distintos tiempos de cultivo de las membranas.

4.2.1 Puesta a punto del procedimiento: Selección de las condiciones de recogida del secretoma de las membranas L-PRF

Previamente a la realización del estudio fue necesario seleccionar el medio sobre el que se cultivarían las membranas, el número de lavados que se aplicarían y los tiempos de recogida del secretoma.

En relación al medio a emplear se seleccionaron PBS y medio de cultivo DMEM para obtener el secretoma liberado por las membranas. El número de lavados necesarios para eliminar al máximo proteínas abundantes del plasma como la albúmina también se analizó en esta puesta a punto. Para ello, se recolectaron 4 membranas del mismo donante y cada una se cultivó siguiendo un protocolo específico detallado en el apartado 3.5.

Para corroborar cómo afectaban los lavados y los medios al perfil del secretoma obtenido, las proteínas se precipitaron y se corrieron en un gel monodimensional que se tiñó con SYPRO Ruby para la visualización del perfil de proteínas en cada condición.

Atendiendo a la cantidad de proteína obtenida tras la precipitación, esta siempre era mayor en los secretomas a los que solamente se le había aplicado un lavado. Al analizar el perfil de todas las condiciones se descubrió que en aquellas en las que se emplea DMEM como medio de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cultivo la cantidad de albúmina presente en el secretoma es mucho menor, tanto en el secretoma recogido a día 3 como a día 7, siendo en este último más evidente. Además, se corroboró que el número de lavados tiene un impacto importante sobre la cantidad de albúmina presente, disminuyendo a medida que aumenta el número de lavados sin afectar aparentemente al resto de las proteínas (Fig. 14).

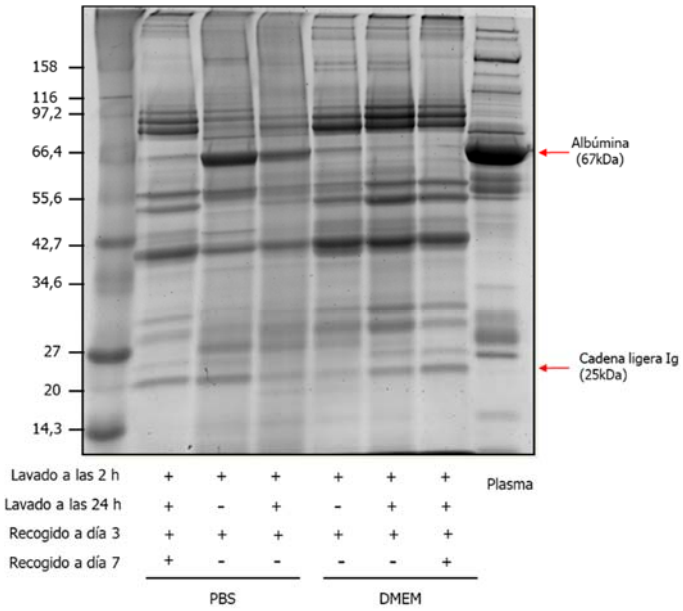


Figura 14. Selección de las condiciones adecuadas de recogida del secretoma de las membranas L-PRF. Las condiciones analizadas fueron el medio a emplear (PBS o DMEM), el número de lavados adecuados (1 lavado (a las 2 horas) o 2 lavados (a las 2 horas y otro a las 24 horas). Además, el secretoma también fue recogido en distintos momentos, a día 3 o a días 3 y 7, siempre contando desde el día de formación de la membrana.

Una vez seleccionados el medio de cultivo (DMEM) y el número de lavados adecuados para eliminar las proteínas mayoritarias del plasma, que fueron dos, se quiso evaluar si había diferencias en el perfil del secretoma si se recogía a tiempo final o si se recogía previamente a un tiempo intermedio. Para evaluarlo, se obtuvieron 2 membranas de un mismo donante y se cultivaron en medio DMEM siguiendo el protocolo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de lavados estipulados (a las 2 y a las 24 horas del cultivo de las membranas). A día 3 a una de las membranas se le recogió el medio y se le repuso por medio fresco que se recogió a día 7. Sin embargo, el medio de la otra membrana se recolectó simplemente a día 7.

Una vez recogidos los secretomas la proteína se precipitó y los perfiles de las muestras recogidos a distintos momentos se analizaron mediante electroforesis mono y bidemensional.

A priori, en el análisis monodimensional no se observaron diferencias en los perfiles de los secretomas recogidos a día 7, a pesar de que uno de ellos represente las proteínas liberadas hasta ese momento y la otra condición recoge las secretadas entre los días 3 y 7 de cultivo (Figura 15). En cambio, en el análisis bidemensional, sí se aprecian cambios en el perfil, principalmente en las proteínas de mayor peso molecular (Figura 16). Esto indica que las proteínas que se liberan inicialmente no se acumulan hasta tiempo final sino que se van degradando si el secretoma no se recoge en puntos intermedios. Además, se apreciaron un menor número y expresión de proteínas en la muestra recogida solamente a día 7 comparado con la muestra recogida a día 7 pero que representa el secretoma liberado entre los días 3 y 7.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

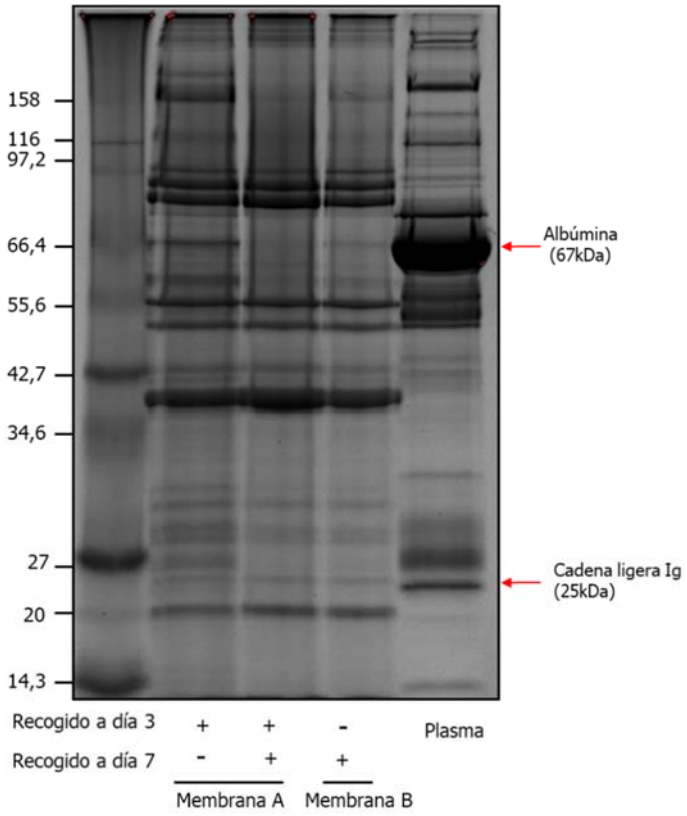


Figura 15. Selección de los tiempos de recogida del secretoma de las membranas L-PRF. Electroforesis monodimensional del secretoma de 2 membranas L-PRF recogido a distintos tiempos para comparar el perfil proteico.

Las diferencias entre las proteínas liberadas hasta el día 3 de cultivo y de ahí hasta el día 7 se apreciaron en el perfil bidemensional en distintos rangos de peso molecular y pH (Fig.17). Concretamente el perfil monodimensional indicó que hay diferencias evidentes en proteínas con un peso molecular alrededor de 158 kDa, entre 55 y 70 kDa y por debajo 33 kDa (Fig.15).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

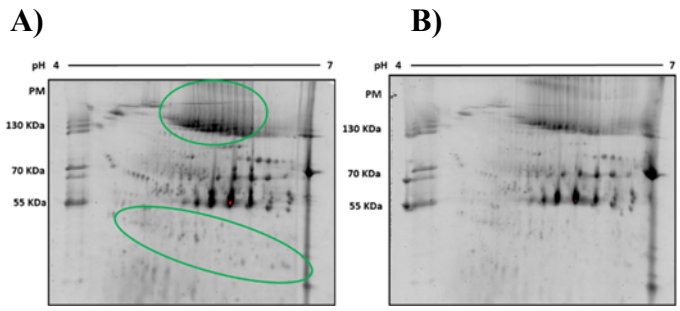


Figura 16. Electroforesis bidimensional de las proteínas liberadas por las membranas L-PRF recogidas a día 7. A) Secretoma recogido a día 7 que representa las proteínas liberadas entre el día 3 y 7 de cultivo. **B)** Secretoma recogido a día 7 que recoge las proteínas secretadas entre las 24 h y el día 7. PM: peso molecular; kDa: Kilodalton

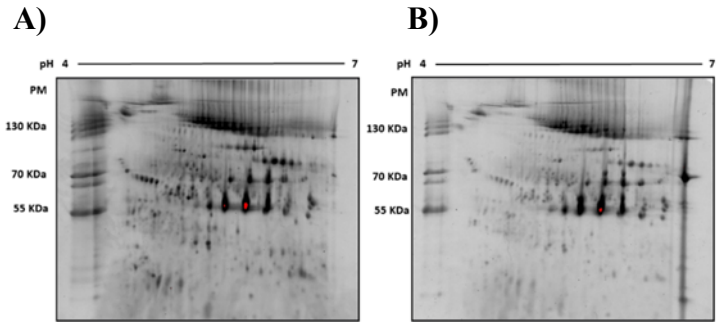


Figura 17. Electroforesis bidimensional de las proteínas liberadas por las membranas L-PRF según el momento de la recogida del secretoma. A) Secretoma recogido a día 3 que representa las proteínas liberadas entre las 24 h y el día 3. **B)** Secretoma recogido a día 7 que recoge las proteínas secretadas entre las 24 h y el día 7.

4.2.2 Análisis cualitativo y cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF

Para este análisis se recogió sangre de un total de 11 donantes, 6 hombres y 5 mujeres; las características de los mismos y en que experimento se incluyó cada uno de ellos están especificados en la Tabla 3 en el apartado 3.2. El protocolo que se siguió para el cultivo de las membranas está detallado en el apartado 3.6.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.2.1 Análisis cualitativo del perfil del secretoma de las membranas L-PRF a día 3 de cultivo

Con el fin de conocer la composición del perfil proteico de las membranas L-PRF a día 3 de cultivo, se recogieron muestras a día 3 de cuatro donantes que se agruparon en un *pool*. Este se analizó empleando dos aproximaciones proteómicas complementarias basadas en gel para hacer el análisis más completo.

Una de las aproximaciones consistió en concentrar la proteína en una única banda mediante electroforesis monodimensional SDS-PAGE. La otra se basó en correr una electroforesis completa y cortar todas las bandas del perfil proteico (Fig. suplementaria 2). Las bandas escindidas se digirieron con tripsina y las proteínas se analizaron mediante LC-MS/MS.

El número total de proteínas identificadas mediante la combinación de aproximaciones fueron 705. Entre las aproximaciones se produjo cierto grado de solapamiento, 235 proteínas, aunque muchas de ellas fueron exclusivamente identificadas en una de las metodologías. Concretamente, se identificaron 169 proteínas únicas mediante la metodología de concentración del proteoma en una banda, entre las que se encontraban los factores de crecimiento TFGβ1 y LTBP. Por otro lado, entre las 301 proteínas exclusivas de la aproximación de separación del proteoma por SDS-PAGE se identificaron los factores de crecimiento PDGFA, EGF y HDGF.

Entre las proteínas comunes se encontraron las distintas isoformas del fibrinógeno (FINC, FIBG, FIBA) relacionadas con el sistema de coagulación y la respuesta de fase aguda, otras proteínas implicadas en la endocitosis mediada por clatrina (AP2A1, EPN4, ITB1, RAB7A) y CD36, involucrada en la activación del sistema de receptores hepáticos (LXR/RXR). La lista completa de las proteínas identificadas por ambas aproximaciones está detallada en la Tabla suplementaria 3.

El análisis de biología de sistemas del total de las proteínas identificadas por ambas metodologías mostró que las principales rutas en las que

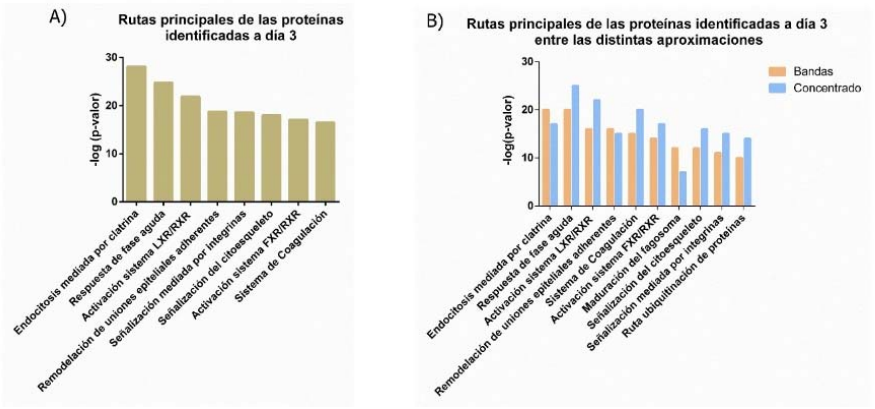
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

participan las proteínas identificadas a día 3 son: endocitosis mediada por clatrina, señalización en respuesta a fase aguda y activación del sistema de receptores hepáticos (LXR/RXR) entre otras (Fig. 18A). En los análisis de cada aproximación por separado también se detectaron las mismas rutas, pero en distintas posiciones en la lista debido al gran número de identificaciones obtenidas a través de la separación de proteínas por SDS-PAGE y a las proteínas específicas identificadas en cada metodología (Fig. 18B).

Un análisis complementario de los datos con el software String destacó la exocitosis y el transporte y la secreción mediada por vesículas como las rutas biológicas principales en las que participan las proteínas encontradas a día 3.

La identificación de proteínas relacionadas con VEs derivadas de neutrófilos (CAP7, PERM, BPI, CATG, MMP9) y plaquetas (CD9, ITA2B) indica que forman parte de estas estructuras liberadas por las células y además destaca por ser la principal. Sin embargo, esto no significa que las proteínas identificadas solamente estén presentes en las VEs derivadas de plaquetas y neutrófilos, ya que el análisis con FunRich reveló que provenían también de monocitos y linfocitos B y CD4 (Fig. 18C)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



C)

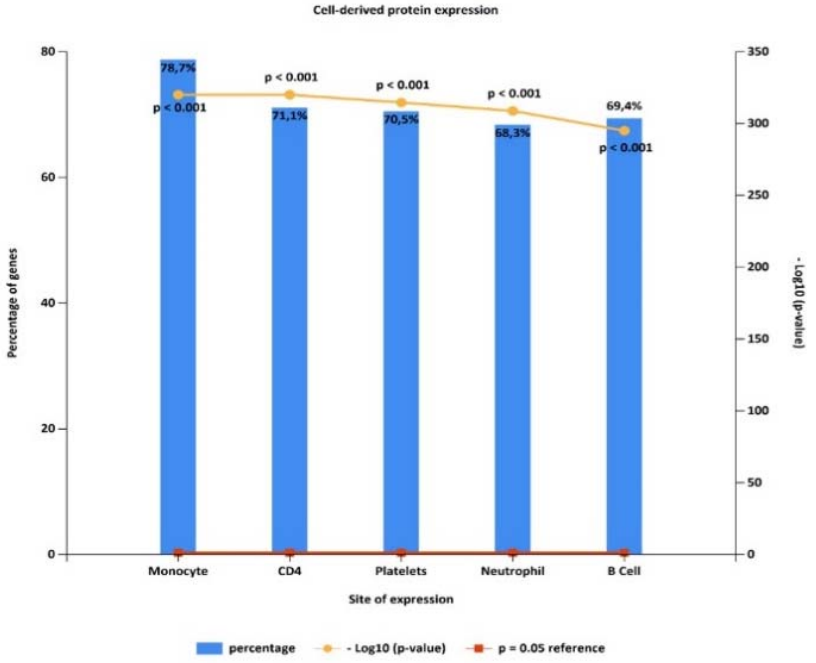


Figura 18. Análisis de biología de sistemas del secretoma de las membranas L-PRF. A) Representación de las rutas canónicas más relevantes en las que participan las proteínas identificadas a día 3. **B)** Representación de las principales rutas canónicas relacionadas con las proteínas identificadas a día 3 comparando las dos aproximaciones en gel llevadas a cabo. **C)** Tipos celulares principales de expresión de las proteínas identificadas a día 3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.2.2 Análisis diferencial 1D-SDS-PAGE del perfil del secretoma recogido a días 3 y 7

Tras descifrar el proteoma de las membranas L-PRF a día 3, se realizó un análisis diferencial inicial a distintos tiempos de recogida del secretoma. En una prueba piloto (Fig. 15), se había observado que a priori el proteoma era muy similar entre días y solo había pequeñas variaciones correspondientes a unos rangos de peso molecular bien claros y definidos. Por ello, el objetivo fue identificar las proteínas diferenciales que se observaban tras someter a las muestras a una electroforesis monodimensional SDS-PAGE completa.

Para ello, las muestras de proteínas (de los secretomas recogidos a días 3 y 7, habiéndose recogido previamente a día 3) de 4 donantes se agruparon en un *pool* y se cargaron en un gel al 11% de bis-tris acrilamida. Tras terminar la electroforesis, el gel se tiñó con SYPRO RUBY y se identificaron cuatro bandas principales donde la diferencia de intensidad entre condiciones era evidente (Fig. suplementaria 3). Las 4 bandas diferenciales se cortaron, digirieron con tripsina y se analizaron por espectrometría de masas.

El número total de proteínas identificadas en las 4 bandas a día 3 fue 371 frente a las 292 identificadas a día 7. Como era de esperar, más de la mitad de las identificaciones (259) se encontraban en ambas condiciones y la gran mayoría de ellas pertenecían a rutas de secreción identificándose las proteínas CD9, ITA2B y CAP7, CATG relacionadas con VEs derivadas de plaquetas y neutrófilos, respectivamente.

Al centrar la atención en proteínas que se encontraron presentes en una de las condiciones, destacan los factores de crecimiento EGF y FBLN3, solo identificados a día 3. En cambio, proteínas de adhesión leucocitaria (ICAM3, MYL6) solo fueron encontradas a día 7. La lista completa con las identificaciones del análisis diferencial de las bandas a ambos días se detalla en la Tabla suplementaria 4.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.2.3 Análisis cuantitativo de factores de crecimiento mediante ELISA

A raíz de la identificación de factores de crecimiento en el secretoma y considerando su impacto a nivel de cierre de herida, se realizó un análisis cuantitativo tipo ELISA de factores de crecimiento para complementar los datos proteómicos obtenidos.

Se cuantificaron 40 factores de crecimiento en los secretomas recogidos a día 3 y 7 de 4 donantes de manera individual. Los factores de crecimiento evaluados se muestran en la Tabla 8.

Se observó una gran variabilidad entre donantes (Fig. 19) por lo que solamente los factores encontrados en al menos 3 de 4 donantes fueron considerados para el análisis. Siguiendo este criterio, 21 factores de crecimiento presentaban mayor concentración a día 3 versus día 7 (BDNF, FGF2, EGF, SOMA, HGF, IBP1, INS, TR11B, PDGFA, KDR, FLT4, BMP7, NGF, FGF7, IBP2, IBP4, IBP6, CSF1R, NTF3, KIT, TGFB1). Solamente el factor de crecimiento GDF-15 presentaba mayor concentración a día 7 en todos los donantes.

Tabla 8. Factores de crecimiento cuantificados en los secretomas de las membranas L-PRF a días 3 y 7. El color verde indica mayor concentración a día 3, en rojo indica mayor concentración a día 7.

Factores de crecimiento analizados				
AREG	BDNF	FGF2	BMP4	BMP5
BMP7	NGF	EGF	EGFR	PROK1
FGF4	FGF7	GDF15	GDNF	SOMA
HBEGF	HGF	IBP1	IBP2	IBP3
IBP4	IBP6	IGF1	INS	CSF1R
TNR16	NTF3	NTF4	TR11B	PDGFA
PLGF	KITLG	KIT	TGFA	TGFB1
TGFB3	VEGFA	VEGFR2	VEGFR3	VEGF-D

Algunos de los factores de crecimiento evaluados en el *array* habían sido previamente identificados por espectrometría de masas en el análisis del secretoma a día 3, como es el caso de EGF, PDGFA y TGFβ1. Concretamente esos factores primeramente identificados en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

análisis proteómico fueron los que presentaron mayor concentración en el análisis cuantitativo tipo ELISA, mostrando correlación entre ambas técnicas.

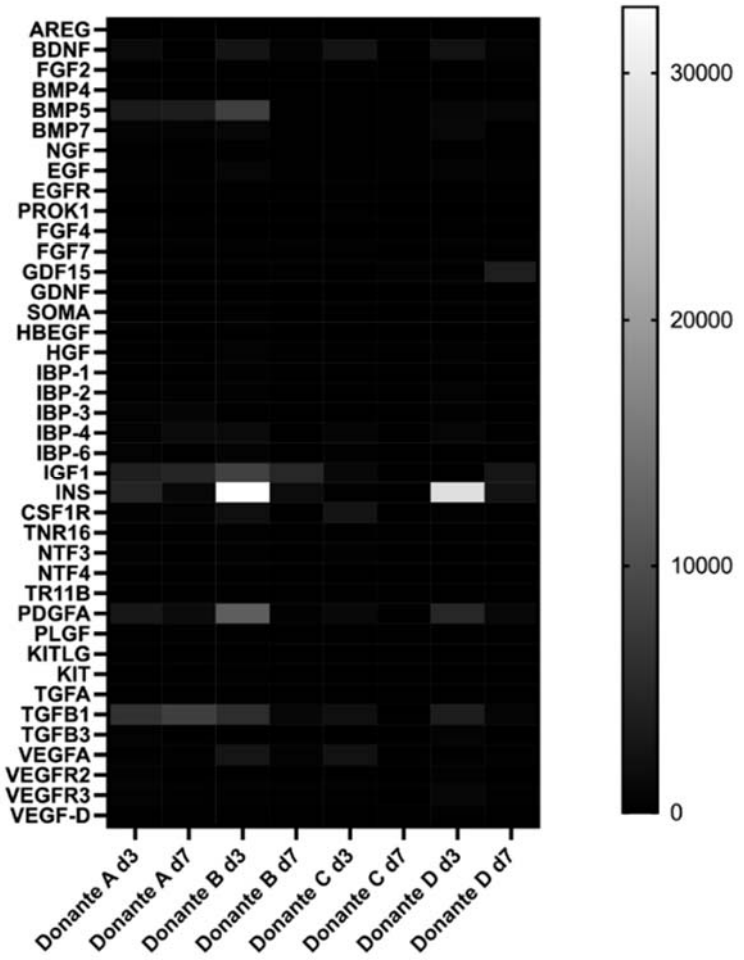


Figura 19. Análisis cuantitativo de factores de crecimiento en los secretomas de las membranas L-PRF a días 3 y 7. El heatmap muestra la expresión diferencial de 40 factores de crecimiento en el secretoma de las membranas L-PRF de 4 donantes (A, B, C y D) a día 3 (d3) y 7 (d7). El código de color indica las concentraciones de los factores de crecimiento expresadas en pg/ml, el rango va de negro (baja concentración) a blanco (alta concentración).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.2.4 Análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF mediante SWATH-MS: Enriquecimiento proteico a día 3 de cultivo

Con el fin de complementar el análisis diferencial inicial del perfil proteómico detallado en el apartado 4.2.2.2, se recogieron muestras nuevas (siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.6) provenientes de una cohorte independiente de donantes para el análisis cuantitativo mediante espectrometría de masas basada en SWATH de las diferencias en el secretoma de las membranas L-PRF a días 3, 7 y 21 de cultivo.

Para ello, las muestras de proteína de 4 donantes fueron agrupadas en las mismas cantidades en las distintas condiciones. La librería previa al análisis se generó a partir de un *pool* con una cantidad equitativa de todas las muestras a analizar. Las muestras fueron cuantificadas por triplicado empleando el método de adquisición SWATH. El análisis de componentes mostró que no existía gran variabilidad en la distribución de las muestras entre condiciones y replicados (Fig. suplementaria 4).

Se encontraron un total de 202 proteínas expresadas diferencialmente entre condiciones (p-valor < 0,05). Concretamente, 187 de estas proteínas se entraban sobreexpresadas a día 3 y su expresión disminuía a lo largo del tiempo. Este es el caso de muchas proteínas relacionadas con degranulación y activación plaquetaria como TSP1, TGFβ1, precursores del complemento (CO3, CO4A y COA4B), CD9 y LYAM3 (Tabla 9). Otras proteínas identificadas que disminuían con el tiempo estaban relacionadas con la degranulación neutrófila, como por ejemplo algunas histonas, MMP9, TRFL, PERM, CAP7, DEF3 y con procesos de hemostasia como GP1BB y GPV. A pesar de que la gran mayoría de las identificaciones estaban sobreexpresadas a día 3, no ocurre con todas ellas. Concretamente, cuatro proteínas CAH1, FIBA, PRDX2 y CATD aumentaban sus niveles a medida que pasaba el tiempo en todas las condiciones analizadas (Tabla 9), a diferencia de otras proteínas identificadas que aumentaban sus niveles a lo largo del tiempo en 2 de las 3 condiciones analizadas como alguna de las isoformas de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fibrinógeno (FIBB y FIBG) o de hemoglobina (HBD, HBB y HBA) y otro tipo de catepsina (CATS). La lista completa de las identificaciones por SWATH se muestra en las Tablas suplementarias 5, 6 y 7.

Muchas de las proteínas cuantificadas por SWATH habían sido previamente identificadas en ambas condiciones (día 3 y 7) en el análisis diferencial 1D-SDS-PAGE (TSP1, CO3, CO4A, CD9, MMP9, CAP7, FIBA, PRDX2, CATS). Por el contrario, GPV y CAH1, solo se habían identificado en el análisis 1D-SDS-PAGE a día 3 y 7, respectivamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 9. Selección de proteínas encontradas diferencialmente expresadas en los secretomas de las membranas L-PRF comparando los días 3, 7 y 21 (d3, d7, d21) por SWATH (p-valor<0,05). *Fold change* superior a 1 entre condiciones A vs B indica que la variación es favorable a la condición A.

Código Uniprot	Nombre de la proteína	*Fold change* d3 vs d7	*Fold change* d3 vs d21	*Fold change* d7 vs d21
TSP1_HUMAN	*Thrombospondin-1 (Glycoprotein G)*	4,51	19,78	4,39
TGFB1_HUMAN	*Transforming growth factor beta-1 proprotein*	4,10	12,97	3,16
CO3_HUMAN	*Complement C3*	2,96	5,41	1,82
CO4A_HUMAN	*Complement C4-A*	1,96	1,91	1,58
CO4B_HUMAN	*Complement C4-B*	1,84	2,91	
CD9_HUMAN	*CD9 antigen*	4,56	85,95	18,83
LYAM3_HUMAN	*P-selectin*	5,50	34,74	6,31
MMP9_HUMAN	*Matrix metalloproteinase-9*	2,00	3,80	1,91
TRFL_HUMAN	*Lactotransferrin*	3,20	11,50	3,59
PERM_HUMAN	*Myeloperoxidase*	3,27	50,40	15,41
CAP7_HUMAN	*Azurocidin*	4,02	18,64	4,64
DEF3_HUMAN	*Neutrophil defensin 3*	2,34	4,48	1,91
GP1BB_HUMAN	*Platelet glycoprotein Ib beta chain*	1,64	3,22	1,97
GPV_HUMAN	*Platelet glycoprotein V*	6,69	62,86	9,39
CAH1_HUMAN	*Carbonic anhydrase*	0,30	0,16	0,54
FIBA_HUMAN	*Fibrinogen alpha chain*	0,63	0,50	0,80
PRDX2_HUMAN	*Peroxiredoxin-2*	0,43	0,22	0,52
CATD_HUMAN	*Cathepsin D*	0,05	0,01	0,16
FIBB_HUMAN	*Fibrinogen beta chain*	0,59	0,55	
FIBG_HUMAN	*Fibrinogen gamma chain*	0,63	0,56	
CATS_HUMAN	*Cathepsin S*	0,57	0,51	
HBD_HUMAN	*Hemoglobin subunit delta*	0,43		1,76
HBB_HUMAN	*Hemoglobin subunit beta*	0,43		2,04
HBA_HUMAN	*Hemoglobin subunit alpha*	0,46		2,69

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

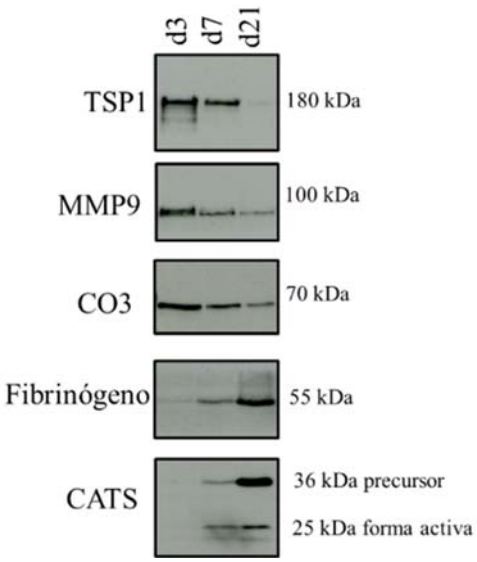
4.2.2.5 MMP9, TSP1 y CO3 están aumentadas y fibrinógeno y CATS están disminuidas en el secretoma recogido a día 3 de cultivo

Los resultados obtenidos por proteómica cuantitativa fueron validados por inmunodetección en una cohorte independiente de muestras de secretoma procedentes de 3 donantes. Se seleccionaron tres proteínas que disminuían (MMP9, TSP1 y CO3) y dos que aumentaban sus niveles con el paso del tiempo (Fibrinógeno y CATS) para los estudios de validación. La elección de estas proteínas se hizo en base a su relevancia funcional y a que habían sido previamente identificadas en el análisis diferencial basado en 1D-SDS-PAGE. Además, las proteínas enriquecidas a día 3 están relacionadas con dos de los principales procesos biológicos que ocurren en las membranas L-PRF, la degranulación neutrófila y plaquetaria en la que también participan CATS y fibrinógeno, respectivamente. A su vez, el incremento de los niveles de fibrinógeno y CATS a lo largo del tiempo podría indicar apoptosis celular.

El análisis por inmunodetección confirmó el enriquecimiento de MMP9, TSP1 y CO3 a día 3 y la disminución de sus concentraciones con el paso de los días, siendo estadísticamente significativa esta diferencia entre día 3 y 21 en todas ellas (Fig. 20). Al contrario que fibrinógeno y CATS que elevan sus niveles con el paso del tiempo, alcanzando su máximo a día 21 (Fig. 20). Estos resultados siguen la línea de lo obtenido por el análisis proteómico cuantitativo.

A)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



B)

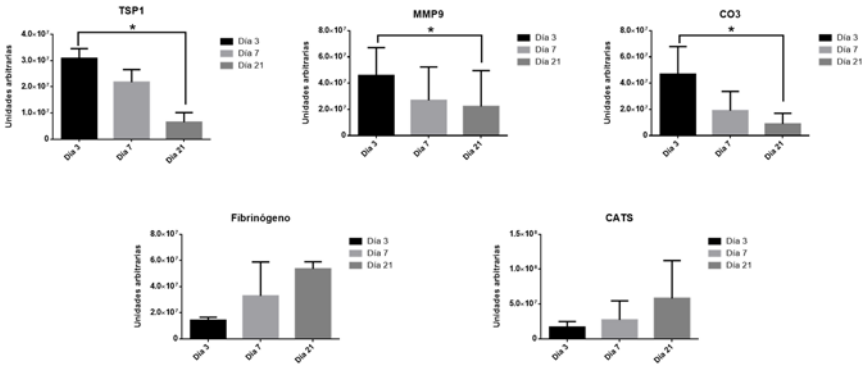


Figura 20. Inmunodetección de varias proteínas expresadas diferencialmente en los secretomas de las membranas L-PRF recogidos a distintos tiempos. A) Imagen representativa de la inmunodetección de TSP1, MMP9, CO3, Fibrinógeno y CATS en muestras de secretoma de membranas L-PRF recogidas a distintos tiempos, días 3, 7 y 21 (d3, d7, d21) PM: peso molecular. **B)** Resultados obtenidos mediante densitometría de las bandas detectadas por inmunodetección. Las barras representan la media ± SD de 3 donantes. El test empleado fue *one way anova* empleando el test de Friedman con el análisis post hoc de Dunn´s. *p<0,05

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre diferentes tipos celulares

4.3.1 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre fibroblastos

Los fibroblastos son un tipo celular relacionado con varias etapas del cierre de una herida. Estos favorecen el cierre de la misma por el depósito de colágeno que finalmente da lugar a la cicatrización. La aplicación de las membranas L-PRF permite acelerar el cierre y la cicatrización de heridas disminuyendo además la posibilidad de infección. Con el proteoma de las membranas L-PRF descifrado y cuantificado a distintos días, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre fibroblastos dermales para entender de qué manera su aplicación favorece la cicatrización/regeneración/curación de heridas.

4.3.1.1 Puesta a punto de los ensayos de proliferación y migración celular: Evaluación de la concentración de FBS y su interacción con el secretoma

Los fibroblastos contribuyen al cierre de la herida por proliferación y migración hacia la zona lesionada; ambos procesos fueron evaluados para analizar la influencia del secretoma sobre ellos. Antes de realizar estos ensayos, fue necesario seleccionar una concentración de secretoma adecuada y además tener en cuenta la concentración de suero empleado en el medio de cultivo, puesto que este podría enmascarar la acción del secretoma.

Atendiendo a la literatura (155), se seleccionó para los primeros ensayos la concentración de 10 ng/ml de secretoma puesto que esta es la concentración estándar que se emplea en ensayos *in vitro* para evaluar los factores de crecimiento FGF y EGF que son los que contribuyen a la migración y proliferación de fibroblastos.

Para la realización de estos ensayos se prepararon medios control, donde cada uno contenía distintas concentraciones de FBS (10, 1 y 0%), y medios tratados que son lo mismo que los medios controles a los que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

se le añadió secretoma a la concentración seleccionada (10 ng/ml). El objetivo fue analizar el efecto del secretoma con distintas concentraciones de los factores de crecimiento presentes en el suero y si las bajas cantidades de FBS no comprometían la viabilidad celular. Para analizar todo ello se llevaron a cabo ensayos de proliferación y migración celular.

El tratamiento con el secretoma parece aumentar ligeramente la proliferación de los fibroblastos en todos los casos (Fig. 21). La diferencia entre control y tratado tiende a ser mayor en la condición de 10% FBS. Además, la concentración de FBS 10% también muestra una pequeña tendencia a superar en proliferación a las condiciones tratadas con secretoma a concentraciones menores de FBS. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre control y tratado, ni entre las distintas concentraciones de FBS evaluadas.

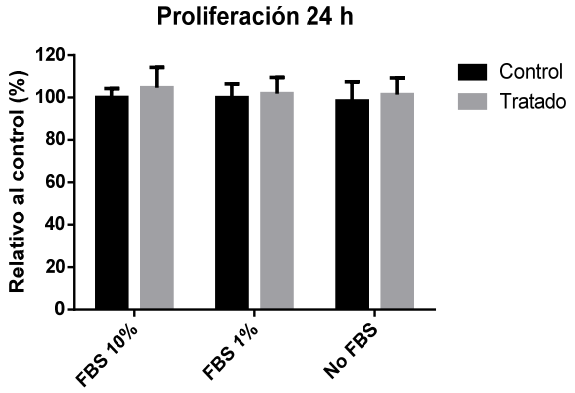


Figura 21. Evaluación de distintas concentraciones de FBS sobre la proliferación celular a las 24 h. Los fibroblastos se cultivaron en medios control, que cada uno contiene distintas concentraciones de FBS (10, 1 y 0%), y en medios tratados, que son lo mismo que los medios control a los que se le añadió secretoma a 10 ng/ml de una membrana L-PRF recogido a día 3. Los datos están representados relativos al control (%) en cada caso. Las barras representan la media ± SD. Este ensayo se hizo por duplicado y con 3 replicados técnicos. El método estadístico empleado fue el *two way anova* empleando el test de Bonferroni.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el ensayo de migración, la condición de 10% de FBS fue la única que consiguió cerrar la herida tras 72 horas de tratamiento (Fig 22C). A pesar de ello, la condición tratada con secretoma no logró superar al control, algo que parecía ocurrir en la concentración de 1% de FBS sobre todo en la franja entre 36-48 h (Fig. 22A). Sin embargo, en ausencia de FBS, ambas condiciones presentaron valores similares de cierre de herida a todos los tiempos evaluados (Fig. 22B).

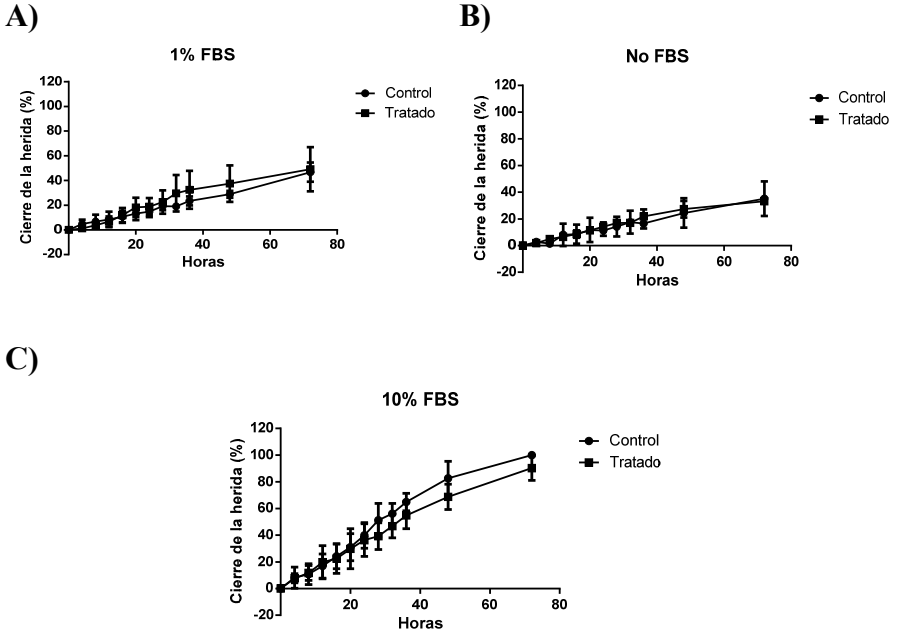


Figura 22. Evaluación de distintas concentraciones de FBS sobre la migración celular. Los fibroblastos se cultivaron en medios control, que cada uno contiene distintas concentraciones de FBS (10, 1 y 0%), y en medios tratados, que son lo mismo que los medios control a los que se le añadió secretoma a 10 ng/ml de una membrana L-PRF recogido a día 3. Los datos están representados en base al tiempo 0 del experimento, donde el cierre de la herida era del 0%. Cada punto representa la media de los datos por duplicado y las barras la desviación estándar. Este ensayo se realizó por duplicado.

El cierre de la herida a las 24 h fue superior en la condición tratada con secretoma respecto al control en ausencia de FBS y 1% de FBS, pero al revés en la condición de 10% aunque en ningún caso estas diferencias entre control y tratado fueron significativas (Fig. 23A). Sin embargo, si

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

se observaron diferencias significativas entre las medias de las distintas concentraciones de FBS evaluadas, siendo la condición de 10% de FBS la que mayor porcentaje de cierre de herida presentó a las 24 horas (Fig. 23A).

A las 72 horas cada concentración de FBS presentó menor diferencia entre los valores de migración entre control y tratado que a las 24 h (Fig. 23B). Las diferencias significativas se encontraron de nuevo en las medias de las distintas concentraciones de FBS (Fig. 23B), donde la concentración de 10% consiguió cerrar la herida superando incluso a los resultados obtenidos en la misma muestra tratada con secretoma.

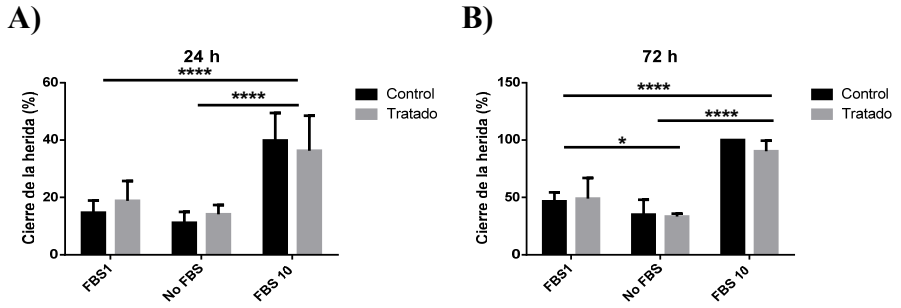


Figura 23. Evaluación de distintas concentraciones de FBS sobre la migración celular a las 24 (A) y 72 horas (B). Los fibroblastos se cultivaron en medios con distintas concentraciones de FBS (10, 1 y 0%) y con 10 ng/ml de secretoma de una membrana L-PRF recogido a día 3. Los datos están representados relativo al control (%) en cada caso. Las barras representan la media ± SD. Este ensayo se hizo por duplicado y con 2 replicados técnicos. El método estadístico empleado fue el two way anova empleando el test de Bonferroni. *p<0,05; ****p<0,0001

4.3.1.2 Puesta a punto de los ensayos de proliferación y migración celular: Evaluación de la concentración de secretoma

Como se observó anteriormente, la concentración de secretoma empleada fue demasiado pequeña quedando su efecto enmascarado por los factores de crecimiento presentes en el FBS a altas concentraciones del mismo. Por ello y tras consultar la bibliografía (120, 123, 124), se decidieron realizar nuevos ensayos en los que el secretoma se añadió para obtener un porcentaje volumen- volumen en el medio de cultivo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con el fin de encontrar la cantidad óptima de secretoma, se evaluaron distintas concentraciones en ensayos de proliferación y migración.

El rango de concentraciones de secretoma seleccionado abarcó del 1 al 20 % y todas las condiciones se evaluaban en un medio que ya contenía un 10% de FBS. El control positivo también tenía 10% de FBS y el control negativo carecía de FBS. En el caso de la proliferación, se añadió una condición adicional, donde al medio sin FBS se le añadió el secretoma al 10%.

La proliferación aumentó a medida que se incrementó la concentración de secretoma hasta alcanzar el máximo a la concentración de 10 % (Fig. 24A). A partir de ahí la proliferación disminuyó hasta valores similares al control negativo, como fue el caso de la concentración de 20% secretoma (Fig. 24A).

El análisis estadístico indicó que existen diferencias significativas entre las medias de todas las condiciones evaluadas ($p=0,0160$), aunque no se encontraron diferencias significativas entre ninguna concentración de secretoma respecto al control positivo.

No obstante, sí se observó que suplementar el medio con secretoma al 10% aumentó la proliferación celular tanto en un medio ausente de FBS como en un medio que contenía 10% de FBS (Fig. 24B) y que además esta diferencia en el tratamiento fue significativa ($p=0,0153$), es decir, el tratamiento con secretoma tuvo un efecto a nivel de la proliferación sin tener en cuenta la concentración de FBS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

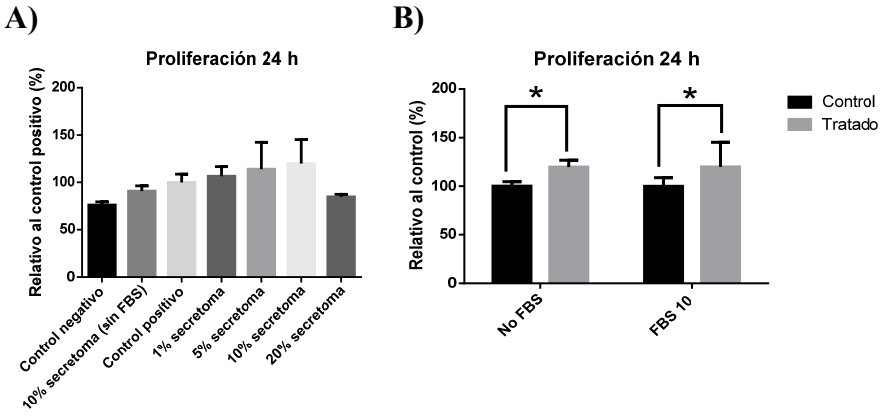


Figura 24. Evaluación de distintas concentraciones de secretoma sobre la proliferación celular a las 24 h. Los fibroblastos se cultivaron en un medio con 10% FBS y con distintas concentraciones secretoma (1, 5, 10 y 20%) de una membrana L-PRF recogido a día 3. Hay dos controles negativos, ninguno contiene FBS, pero uno de ellos se le añadió secretoma al 10%. **A)** Proliferación celular a las 24 h de las distintas condiciones evaluadas. Los datos están representados relativo al control positivo (%). Las barras representan la media ± SD. Este ensayo se hizo con 3 replicados técnicos. El test estadístico empleado fue el one way anova siguiendo la prueba de Kruskal-Wallis. **B)** Representación de la proliferación celular a las 24 h de los controles negativo y positivo frente al tratamiento con secretoma al 10%. Los datos están representados relativos al control (%) en cada caso. Las barras representan la media ± SD. Este ensayo se hizo con 3 replicados técnicos. El método estadístico empleado fue el *two way anova* empleando el test de Bonferroni. *p<0,05

En cuanto al ensayo de migración, las concentraciones bajas de secretoma (1 y 5%) progresaron de forma paralela al control positivo en el cierre de la herida, aunque en el caso de 5% un poco por debajo a tiempos cortos. Las concentraciones más altas evaluadas, 10 y 20% de secretoma, producían un cierre de herida más rápido a las primeras horas (13,8 ± 0,1% y 18,44 ± 5,8 %, respectivamente, a las 2 h frente a una media de 5,6 ± 4,6% para el resto de condiciones) (Fig. 25A). Sin embargo, el análisis del cierre de la herida a las 12 h mostró valores similares de cierre de la herida a las concentraciones de 1 y 20 % que superaban ligeramente al control positivo. Esta tendencia era más visible a la concentración de 10 % de secretoma, con alrededor de un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

20% más de migración con respecto al control, a pesar de que ninguna de las diferencias fuera significativas (Fig. 25B).

A las 24 h todas las condiciones, incluida el control positivo, cerraron casi la herida por completo, con valores entre el 80 y 100 %, siendo menor en este caso las diferencias entre control y las distintas concentraciones de secretoma (Fig. 25B). A pesar de ello las concentraciones de 1, 10 y 20% de secretoma superaron también ligeramente en este momento los valores de migración del control. Aunque no existían diferencias significativas entre las distintas condiciones evaluadas a cada tiempo en concreto, si hubo diferencia significativa entre las medias a los distintos tiempos evaluados ($p < 0,0001$) (Fig. 25B).

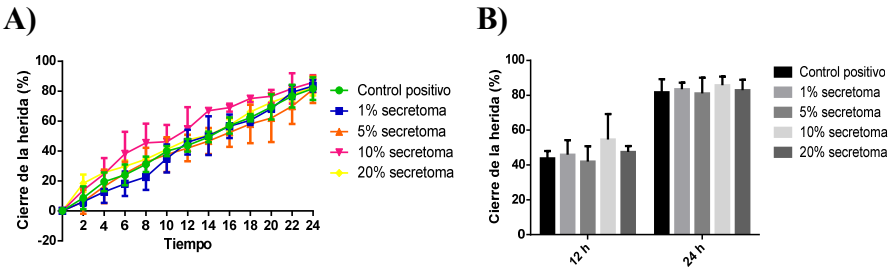


Figura 25. Evaluación de distintas concentraciones de secretoma sobre la migración celular. Los fibroblastos se cultivaron en un medio con 10% FBS y con distintas concentraciones secretoma (1, 5, 10 y 20%) de una membrana L-PRF recogido a día 3. **A)** Migración de los fibroblastos a las concentraciones 1, 5, 10 y 20% de secretoma. **B)** Representación de la migración a las 12 y 24 h de las concentraciones 1, 5, 10 y 20% de secretoma. En todos los casos los datos están representados en base al tiempo 0 del experimento, donde el cierre de la herida era del 0%. Además, se realizaron en todos los casos 3 replicados técnicos por condición. En la gráfica A cada punto representa la media y las barras la desviación estándar. En la gráfica B las barras representan la media ± SD y el método estadístico empleado fue *two way anova* empleando el test de Bonferroni.

Tras la realización de los ensayos, pudo determinarse que la concentración de 20% de secretoma afectó negativamente a la proliferación, aunque no fue así en la migración.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.1.3 Puesta a punto de los ensayos de proliferación y migración celular: Evaluación de bajas concentraciones de secretoma

Debido a que a altas concentraciones de secretoma se veía comprometida la viabilidad en los ensayos de proliferación, se decidió testar un rango más amplio de concentraciones bajas de secretoma.

Para estos ensayos se empleó una muestra de secretoma procedente de una membrana L-PRF de otro donante distinto y a unas concentraciones de 1, 3, 5, 7 y 10%. Al igual que en el caso anterior, el control positivo contenía 10% de FBS y el control negativo carecía de FBS.

En el ensayo de proliferación celular se observó una tendencia al aumento en las concentraciones de 1, 3 y 5% con respecto al control positivo (Fig. 26). La primera y la última lo hacían con una diferencia de un 10% y la del medio (3%) con un valor de un 20% (Fig. 26). Mostrando valores similares al control positivo estaba la concentración de 10%, quedando la de 7% por debajo. La diferencia de las medias entre grupos fue estadísticamente significativa (p=0,0257) aunque no lo fue entre ninguna condición de secretoma y el control positivo.

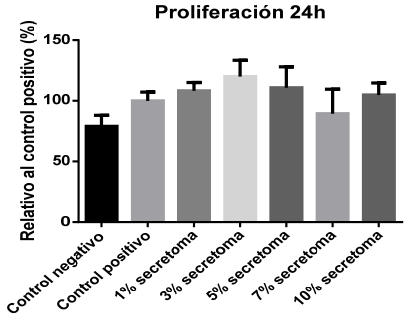


Figura 26. Evaluación de un rango bajo de concentraciones de secretoma sobre la proliferación celular a las 24 h. Los fibroblastos se cultivaron en un medio con 10% FBS y con distintas concentraciones de secretoma (1, 3, 5, 7 y 10%) de una membrana L-PRF recogido a día 3. El control negativo no contiene FBS. Los datos están representados relativo al control positivo (%). Las barras representan la media ± SD. Este ensayo se hizo con 3 replicados técnicos. El método estadístico empleado fue el one way anova con el test de Kruskal-Wallis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el ensayo de migración todas las concentraciones evaluadas mostraron valores de cierre de herida similares o superiores al control positivo en todos los tiempos evaluados (Fig. 27A).

Tras 12 horas del inicio del ensayo, todas las concentraciones presentaron valores de migración similares al control positivo, destacando las concentraciones de 5 y 10% que mostraron una tendencia superior (Fig. 27B). A las 24 horas, todas las condiciones aumentaron el cierre de la herida de forma significativa ($p < 0,0001$) con respecto a las 12 horas y todas lo hicieron con valores superiores a los del control positivo (Fig. 27B). Concretamente, la concentración de 10% de secretoma mostró un valor de cierre de herida estadísticamente significativo ($p=0,0133$) respecto al control positivo. Además, la interacción entre variables (tratamiento y tiempo) fue estadísticamente significativa ($p=0,0325$) indicando que las diferencias entre concentraciones son consistentes para los tiempos analizados (Fig. 27B).

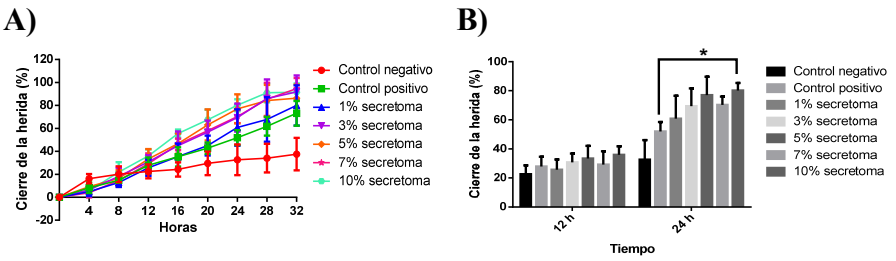


Figura 27. Evaluación de un rango bajo de concentraciones de secretoma sobre la migración celular. Los fibroblastos se cultivaron en un medio con 10% FBS y con distintas concentraciones secretoma (1, 3, 5, 7 y 10%) de una membrana L-PRF recogido a día 3. **A)** Migración de los fibroblastos de todas las condiciones evaluadas. **B)** Representación de la migración a las 12 y 24 h de todas las condiciones. En ambos casos los datos están representados en base al tiempo 0 del experimento, donde el cierre de la herida era del 0%. En la gráfica A cada punto representa la media de los datos por triplicado y las barras el error estándar. En la gráfica B las barras representan la media ± SD. El test realizado fue *two way anova* empleando el test de Bonferroni. *p<0,05

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.1.4 Efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre la proliferación y migración celular

Tras la disparidad observada entre los resultados de proliferación y migración presentados anteriormente, se decidió seleccionar dos concentraciones de secretoma, la concentración de 3% porque presentó mejor proliferación y la de 10% porque presentó mayor migración.

Para llevar a cabo los ensayos se recogieron muestras de secretoma a días 3 y 7 de 8 membranas L-PRF, cada una procedente de un donante distinto.

El ensayo de proliferación mostró una ligera tendencia al aumento de la viabilidad de los fibroblastos tratados con la concentración 3% de secretoma recogida a día 3 respecto al control positivo (Fig. 28). Sin embargo, el tratamiento con la muestra recogida al mismo día, pero a una concentración del 10 % mostró un mínimo incremento con respecto al control positivo. Las muestras de secretoma recogidas a día 7 mostraron valores inferiores de proliferación respecto a las muestras de secretoma recogidas a día 3, siendo solamente la proliferación un 2-3 % superior al control positivo. Sin embargo, existió diferencia significativa entre las medias de cada condición ($p<0,0001$), indicando que cada tratamiento genera un efecto diferente sobre la proliferación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

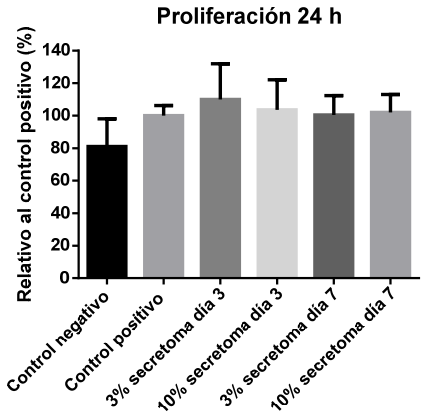


Figura 28. Efecto del secretoma a distintas concentraciones y recogido a distintos tiempos sobre la proliferación celular a las 24 h. Los fibroblastos se cultivaron en un medio con 10% FBS y con distintas concentraciones de secretoma (3 y 10%) de 8 membranas L-PRF recogido a días 3 y 7. El control negativo no contiene FBS. Los datos están representados relativo al control positivo (%). Las barras representan la media ± SD. Este ensayo se hizo con 4 replicados técnicos por condición. El test estadístico empleado fue el one way anova siguiendo el test Kruskal-Wallis.

En cuanto a los ensayos de migración celular todas las condiciones analizadas mostraron valores próximos al control positivo, principalmente en los primeros momentos del cierre de la herida (Fig. 29A). A partir de las 20 horas algunas de las muestras superaron al control positivo en cierre de herida alcanzado algunas de estas diferencias valores estadísticamente significativos a las 24 h (Fig. 29B).

La concentración de 10% de secretoma recogida a día 7 y la de 3% recogida a día 3 aumentaron la proliferación de forma significativa con respecto al control a las 24 h (p=0,0174 y p=0,4580, respectivamente) (Fig. 29B). La concentración de 10% recogida a día 3 y la de 3% recogida a día 7 parecen favorecer la migración respecto al control positivo, pero solamente en un 3 y un 5%, respectivamente (Fig. 29B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

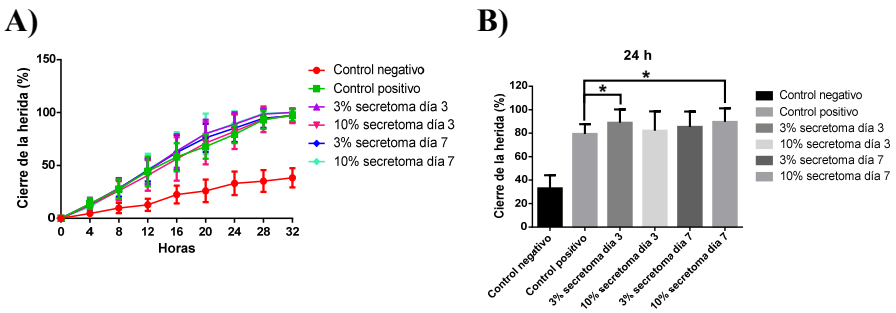


Figura 29. Efecto del secretoma a distintas concentraciones y recogido a distintos tiempos sobre la migración celular. Los fibroblastos se cultivaron en un medio con 10% FBS y con distintas concentraciones secretoma (3 y 10%) de 8 membranas L-PRF recogido a días 3 y 7. El control negativo carece de FBS. **A)** Migración de los fibroblastos en todas las muestras evaluadas. **B)** Representación de la migración a las 24 h de todas las muestras. En ambos casos los datos están representados en base al tiempo 0 del experimento, donde el cierre de la herida era del 0%. En la gráfica A cada punto representa la media de los datos por triplicado y las barras el error estándar. En la gráfica B las barras representan la media ± SD. El método estadístico empleado fue *one way anova* siguiendo el test de Holm-Sidak. *p<0,05

Los resultados obtenidos mostraron que todas las muestras de secretoma recogidas a distintos tiempos y ensayadas a distintas concentraciones aumentan la proliferación y migración celular respecto al control positivo. La muestra de secretoma recogida a día 3 y evaluada al 3% presentó mejores resultados de proliferación y migración frente a la misma muestra, pero evaluada a una concentración de 10%. Por el contrario, la muestra de secretoma recogida a día 7 a la concentración de 10% presentó niveles más altos en proliferación y también en migración celular comparada con la misma muestra evaluada al 3%.

4.3.2 Estudio del efecto de la proteína BMP-5 presente en el secretoma de las membranas L-PRF sobre los osteoblastos

Los osteoblastos son células encargadas de sintetizar hueso y también participan en procesos de regeneración y remodelación de fracturas gracias a la acción de proteínas liberadas por plaquetas y leucocitos en la zona de la lesión. Algunas de las proteínas que tienen su efecto en los osteoblastos pertenecen a la familia de las BMPs. Concretamente, la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

isoforma 5 de esta familia se detectó en la mitad de los donantes analizados en el array de proteínas en el estudio cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF de la presente tesis doctoral. Por su participación en el proceso de remodelado, se decidió analizar el papel de BMP-5 sobre la diferenciación osteoblástica evaluando marcadores específicos de diferenciación en el medio de cultivo. En este estudio piloto, se empleó una de las muestras de secretoma analizadas en el array de proteínas y de la cual se conocía la concentración de BMP-5. Además, se empleó una condición tratada con BMP-5 como control positivo y una condición no tratada con el fin de comparar si el secretoma producía diferenciación osteogénica.

4.3.2.1 Efecto de BMP-5 y secretoma sobre la citotoxicidad celular

Con el fin de conocer si alguna de las condiciones afectaba a la viabilidad celular se llevó a cabo la medida de la enzima lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo a días 2, 9 y 14. El análisis mostró un pequeño aumento a días 2 y 14 en el medio de cultivo de los osteoblastos tratados con secretoma, especialmente en el tratado con secretoma recogido a día 3 (Fig. 30). Sin embargo, ninguna de las condiciones analizadas causó un incremento muy elevado en la actividad de la lactato deshidrogenasa comparada con el no tratado.

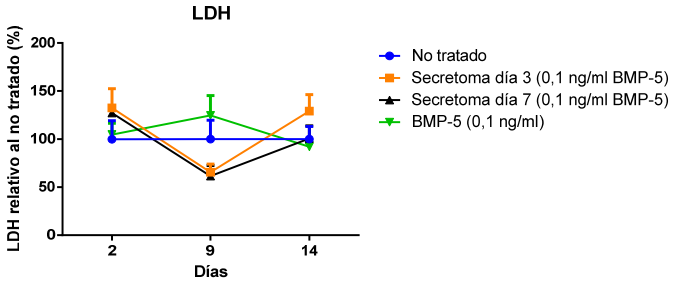


Figura 30. Evaluación de la citotoxicidad celular en el medio de osteoblastos tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF. Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo de los osteoblastos tratados con secretoma recogido a días 3 y 7 de cultivo a la concentración de 0,1 ng/ml de BMP-5. Los valores representan la media ± SD relativo en % a la condición no tratada a días 2, 9 y 14 de cultivo de cuatro réplicas técnicas por condición.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.2.2 Efecto de BMP-5 y secretoma en la diferenciación osteogénica (Actividad de la fosfatasa alcalina, proteínas solubles)

Para entender los efectos del secretoma en los osteoblastos, se midió en el medio de cultivo a días 2, 9 y 14 la actividad de la fosfatasa alcalina.

La muestra de secretoma recogida a día 7 aumentó la actividad de la fosfatasa alcalina en todos los puntos analizados. Concretamente, esta condición estimuló de forma significativa la actividad de esta enzima a día 2 (Fig. 31). Por el contrario, la muestra de secretoma recogida a día 3 mostró valores similares al grupo control en todos los momentos analizados. El control positivo mostró niveles más elevados de este marcador de diferenciación osteoblástica temprana a día 9 (Fig. 31).

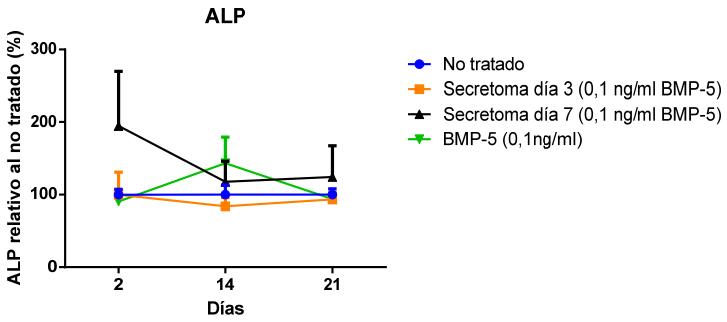


Figura 31. Evaluación de la fosfatasa alcalina en el medio de osteoblastos tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF. Niveles de la fosfatasa alcalina en el medio de cultivo de los osteoblastos tratados con secretoma recogido a días 3 y 7 de cultivo a la concentración de 0,1 ng/ml de BMP-5. Los valores representan la media ± SD relativo en % a la condición no tratada a días 2, 9 y 14 de cultivo de cuatro réplicas técnicas por condición.

En el medio de cultivo también se cuantificó un panel de proteínas relacionadas con el metabolismo del hueso y la diferenciación osteogénica a días 2, 9 y 14. Se midieron marcadores de formación de hueso (DKK1 y SOST), otros de diferenciación y mineralización (OPN, OPG y OC) y citoquinas proinflamatorias.

Las proteínas SOST y DKK1 son proteínas relacionadas con la formación de hueso, específicamente con la inhibición de la osteoblastogénesis. En el caso de DKK1 no hubo diferencias

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

apreciables entre días y condiciones (Fig. 32A). Sin embargo, si se encontraron variaciones en la secreción de SOST entre condiciones a lo largo del tiempo (Fig. 32B).

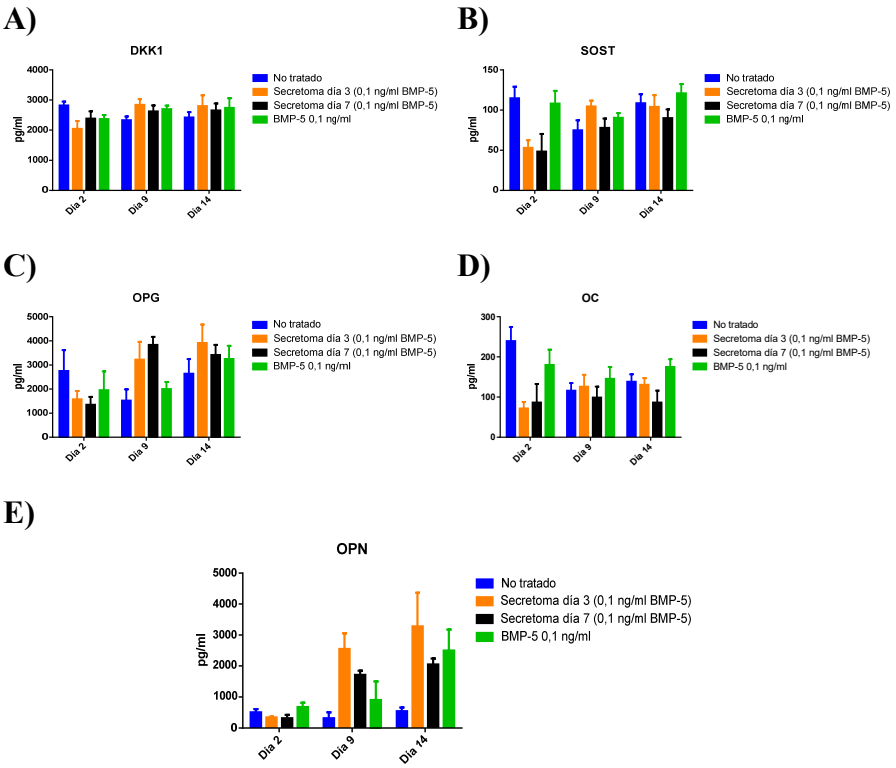


Figura 32. Evaluación de proteínas relacionadas con la formación de hueso en el medio de osteoblastos tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF. Las proteínas DKK1, SOST, OPG, OC y OPN se cuantificaron en el medio de cultivo de los osteoblastos tratados con BMP-5 y secretoma recogido a días 3 y 7 de cultivo a la concentración de 0,1 ng/ml de BMP-5. Las barras representan la media ± SD de cuatro réplicas técnicas por condición a días 2, 9 y 14.

Las proteínas OPG, OC y OPN son marcadores temprano y tardíos de diferenciación osteoblástica respectivamente. La concentración de OPG fue similar en el medio de las células tratadas con el secretoma recogido a días 3 y 7 y sus niveles aumentaron a partir del día 9 superando al no tratado y a la condición con BMP-5 (Fig. 32C). La

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

secreción de OC aumentó con el paso del tiempo en las condiciones de secretoma, pero estas no consiguieron superar en ningún momento los niveles de la condición tratada con 0,1 ng/ml de BMP-5 (Fig. 32D).

La concentración de OPN se incrementó con el paso del tiempo en los osteoblastos tratados con secretoma (Fig. 32E). No obstante, las células tratadas con secretoma recogido a día 3 mostraron niveles más elevados de esta proteína en el medio que las tratadas con secretoma recogido a día 7.

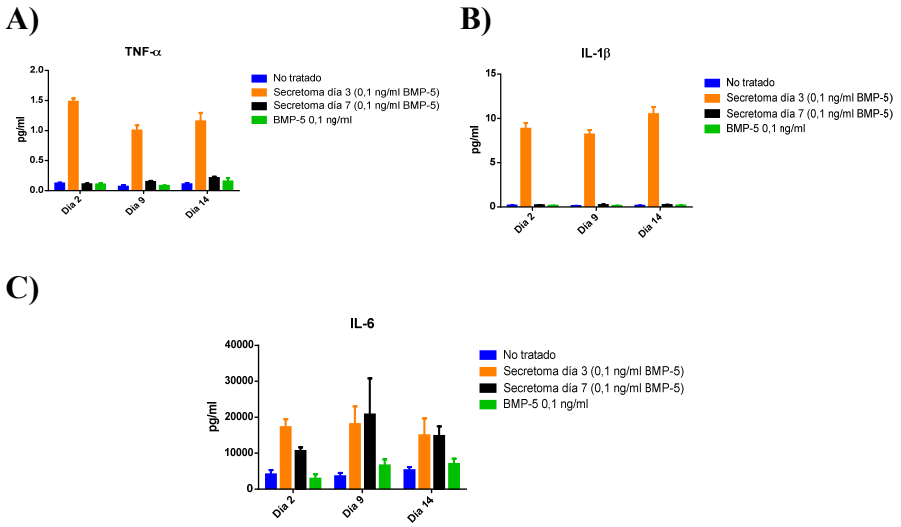


Figura 33. Evaluación de citoquinas proinflamatorias en el medio de osteoblastos tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF. Las citoquinas TNF-α, IL-6 e IL-1β se cuantificaron en el medio de cultivo de los osteoblastos tratados con BMP-5 y secretoma recogido a días 3 y 7 de cultivo a la concentración de 0,1 ng/ml de BMP-5. Las barras representan la media ± SD de cuatro réplicas técnicas por condición a días 2, 9 y 14.

Por último, también se cuantificaron en el medio varias citoquinas proinflamatorias. Las citoquinas TNF-α e IL-1β presentaron concentraciones muy elevadas en las células tratadas con secretoma recogido a día 3 en todos los tiempos analizados (Fig. 33A-B). Además, la concentración de ambas citoquinas fue prácticamente indetectable en el resto de condiciones a todos los tiempos analizados. Sin embargo, la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

concentración de IL-6 aumentó tras el tratamiento de los osteoblastos con ambas condiciones de secretoma (Fig. 33C).

4.3.2.3 Efecto de BMP-5 y secretoma en la mineralización

Para conocer el papel de BMP-5 sobre la mineralización se midieron los depósitos de calcio en los osteoblastos tras 14 días de cultivo. Todas las condiciones aumentaron la mineralización respecto al no tratado. No obstante, la cantidad de depósitos de calcio fue superior en la condición de BMP-5 0,1 ng/ml que en las de secretoma (Fig. 34).

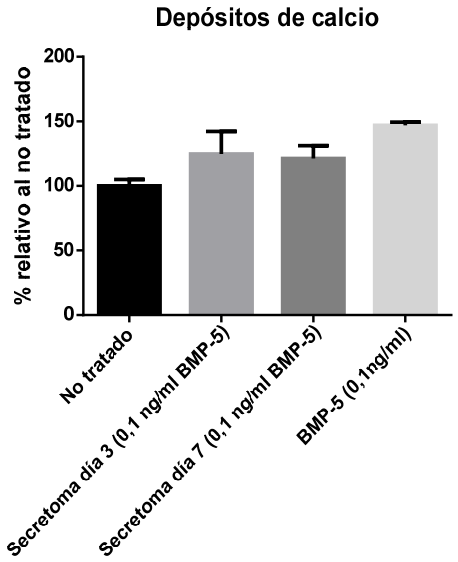


Figura 34. Evaluación de los depósitos de calcio en los osteoblastos a día 14 tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF. Las barras de cada condición representan la media ± SD de duplicados y están representados en % relativos a la condición no tratada.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.2.4 Efecto de BMP-5 en la osteoblastogénesis / osteoclastogénesis: Niveles de expresión de OPG y RANKL en los lisados celulares a día 14

El balance entre la formación y reabsorción de hueso está regulado por expresión de las proteínas RANKL y OPG liberadas por los osteoblastos. Para conocer cómo influye la proteína BMP-5 en el proceso de remodelación, se midieron los niveles de OPG y RANKL en los osteoblastos a día 14. Los niveles de OPG en las muestras tratadas con secretoma y BMP-5 superaron al no tratado (Fig. 35), pero la expresión de RANKL fue similar en todas las condiciones analizadas (Fig. 35B). Sin embargo, el ratio entre la expresión de OPG y RANKL mostró que las condiciones tratadas con BMP-5 y secretoma tenían un valor cercano a 1 (Fig. 35C), indicando una expresión similar entre ambas proteínas. Por el contrario, el no tratado presentó un valor de 0,6 aproximadamente, indicando un aumento de la expresión de RANKL con respecto a OPG (Fig. 35C).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

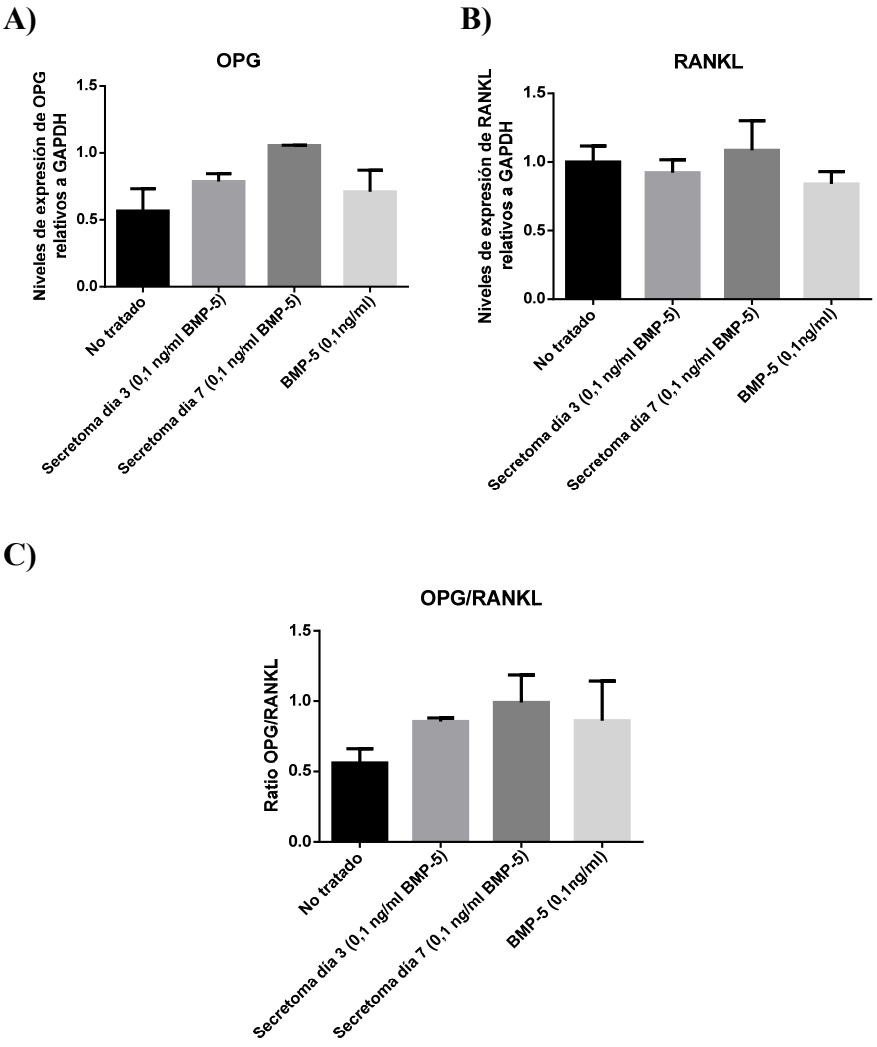


Figura 35. Evaluación de la expresión de OPG y RANKL en los osteoblastos a día 14 tras el tratamiento con BMP-5 y secretoma de las membranas L-PRF. Se evaluó la expresión de OPG (A) y RANKL (B) en los osteoblastos a día 14. Las barras de cada condición representan la media ± SD de duplicados y están representados relativos a la expresión de GAPDH. Además, se representó la relación entre la expresión de OPG y RANKL (C).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los resultados obtenidos muestran variabilidad en el efecto sobre los osteoblastos dependiendo del secretoma aplicado. Los datos indican que no solo BMP-5 tiene efecto sobre la diferenciación de los osteoblastos sino el conjunto de proteínas presentes en el secretoma. Y que además las diferencias entre los secretomas de las membranas L-PRF ya cuantificados anteriormente, podrían ser la causa de los resultados observados entre ambas condiciones de secretoma. Por todo ello se decidió evaluar el efecto del secretoma sobre MSC.

4.3.3 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre diferenciación osteogénica

Las MSC son células indiferenciadas que pueden dar lugar a distintos tipos celulares según el estímulo que reciban. Entre los tipos celulares a los que pueden diferenciarse están los osteoblastos, sobre los que ya se examinó el papel de la proteína BMP-5 secretada por las membranas L-PRF en el apartado anterior (4.3.2), observándose un efecto diferencial dependiente del momento en el que se recoge el secretoma de las membranas L-PRF y no tanto de la proteína en sí. En los análisis proteómicos realizados en la presente tesis doctoral, apartado 4.2.2, se identificó un gran número de proteínas y factores de crecimiento que estas membranas liberan y que además estos varían a lo largo del tiempo. Tras analizar las propiedades de estas membranas sobre diferentes tipos celulares y observar en el estudio piloto que pueden tener un efecto sobre la osteogénesis, se decidió estudiar el papel del secretoma sobre la diferenciación osteogénica, pero partiendo de las células madre de las que los osteoblastos derivan.

Para llevar a cabo este estudio, se cultivaron MSC en presencia de distintos estímulos. En primer lugar, una condición no tratada empleada como referencia para poder analizar si las muestras de secretoma afectan a la diferenciación. Otras dos condiciones son los secretomas recogidos a días 3 y 7 y por último una condición de diferenciación osteogénica. En este ensayo se emplearon muestras de secretoma procedentes de membranas L-PRF de 4 donantes diferentes recogidas a días 3 y 7. El secretoma se aplicó a una concentración final de 3% en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

medio de cultivo, debido a que esta fue la concentración óptima observada para la proliferación en fibroblastos (apartado 4.3.1.3).

4.3.3.1 Efecto del secretoma en la diferenciación osteogénica: Evaluación de la citotoxicidad

El efecto del secretoma sobre la citotoxicidad celular se evaluó midiendo la actividad de la enzima LDH en el medio de cultivo durante distintos momentos del cultivo de las MSC.

La actividad de esta enzima es similar entre todas las condiciones analizadas a días 2 y 14 de cultivo (Fig. 36). Sin embargo, las muestras de secretoma recogidas a día 3 y 7 presentaron valores superiores de esta enzima respecto a la condición no tratada en los días 7 y 21 de cultivo, siendo en ambos casos estadísticamente significativa (Fig. 36). Concretamente, a día 7 de cultivo ambas condiciones de secretoma aumentaron la actividad de LDH respecto a la condición no tratada con valores similares (143,6 ± 66,7 % para la muestra de secretoma recogida a día 3 y 140,0 ± 56,4 % para la muestra de secretoma recogida a día 7). El efecto del secretoma sobre la LDH fue mucho mayor a tiempo final del experimento, provocando incluso valores más elevados de esta enzima en las células tratadas con la muestra de secretoma recogida a día 3 de cultivo (246,5 ± 41,5 %) sobre la recogida a día 7 (196,9 ± 25,8%).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

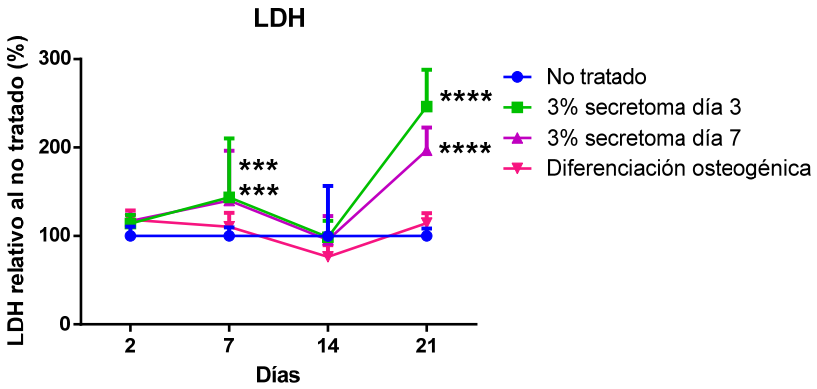


Figura 36. Evaluación de la citotoxicidad celular de las MSC tras la aplicación del secretoma de las membranas L-PRF. Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo de MSC no tratadas, tratadas con 3% de secretoma recogido a días 3 y 7 de cultivo y tratadas con medio de diferenciación osteogénica. Los valores de LDH se presentan en % relativo a la condición no tratada a días 2, 7, 14 y 21 de cultivo. Los valores de cada condición y en cada momento representan la media ± SD de cuatro muestras con cuatro réplicas técnicas por condición y a cada momento. El test empleado fue el *two way anova* con el análisis post hoc Dunnet. ***p<0,001; ****p<0,0001

4.3.3.2 Efecto del secretoma en la diferenciación osteogénica: Evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima que va aumentando a medida que las MSC se diferencian a osteoblasto. Sin embargo, ninguna de las condiciones tratadas con secretoma logra aumentar la actividad de esta enzima de forma significativa respecto a la condición no tratada a ninguno de los tiempos analizados (Fig. 37). A pesar de ello, se aprecia un aumento en el valor de la actividad de la fosfatasa a lo largo del tiempo en las condiciones tratadas con secretoma y en la condición de diferenciación osteogénica (Fig. 37).

Por otro lado, cabe destacar que el p-valor del tratamiento fue significativo (p=0,0445) indicando que los distintos tratamientos tienen un efecto sobre la actividad de esta enzima independientemente del tiempo, porque las medias para cada tratamiento son diferentes. Y a su vez, el tiempo, como factor independiente, también tiene un impacto

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

significativo (p=0,0082) indicando que la media de la actividad de la fosfatasa es distinta en cada momento analizado.

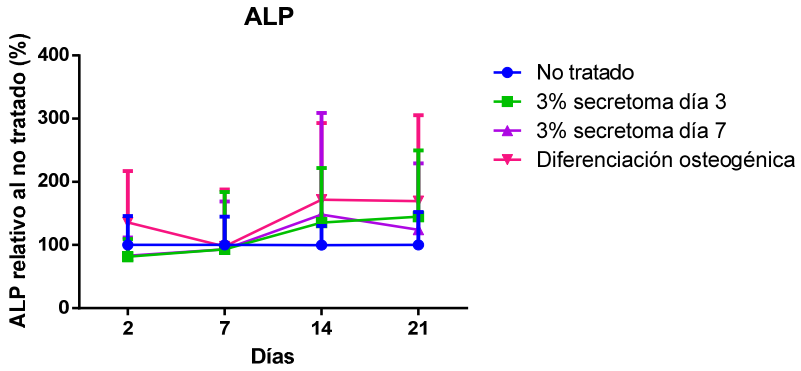


Figura 37. Evaluación de la fosfatasa alcalina de las MSC tras la aplicación del secretoma de las membranas L-PRF. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en el medio de cultivo de MSC no tratadas, tratadas con 3% de secretoma recogido a días 3 y 7 de cultivo y tratadas con medio de diferenciación osteogénica. Los valores de ALP se presentan en % relativo a la condición no tratada a días 2, 7, 14 y 21 de cultivo. Los valores de cada condición y en cada momento representan la media ± SD de cuatro muestras con cuatro réplicas técnicas por condición y a cada momento. El test empleado fue *el two way anova* con el análisis post hoc Dunnet.

4.3.3.3 Efecto del secretoma en la diferenciación osteogénica: Evaluación de un panel de citoquinas y proteínas específicas de diferenciación osteogénica

Durante el proceso de diferenciación se producen cambios en la liberación de proteínas por parte de las células que indican si estas se están diferenciando o no. Los niveles de algunas citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y proteínas relacionadas con formación y remodelación ósea se midieron en el medio de las células a distintos días con el fin de evaluar el proceso de diferenciación osteogénica. Además, se evaluó la concentración de las mismas proteínas en las muestras de secretoma de las membranas L-PRF empleadas para tratar las células, permitiendo diferenciar de esta manera si la proteína medida en el medio es liberada por las células o procede del secretoma.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

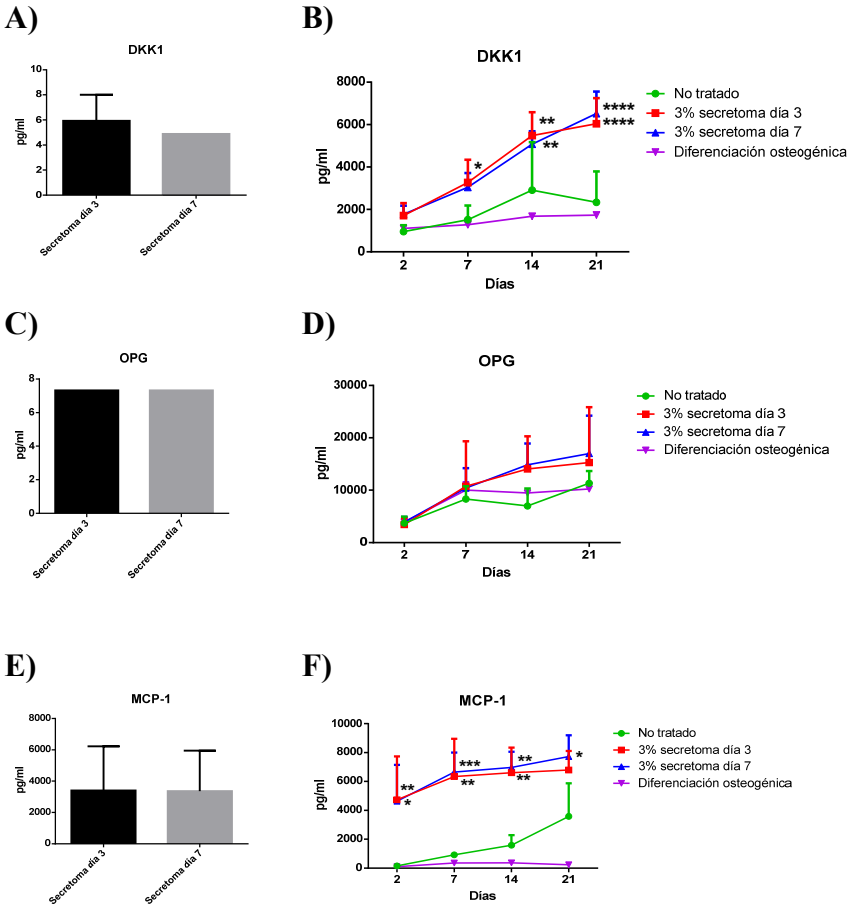


Figura 38. Evaluación de proteínas relacionadas con la diferenciación osteogénica en las muestras de secretoma y en el medio de las MSC tratadas con estas muestras. A, C, E) Las concentraciones de las proteínas DKK1, OPG y MCP-1 se midieron en las muestras de secretoma recogidas a días 3 y 7 empleadas para el tratamiento de las MSC. Las barras representan la media ± SD de cuatro donantes. **B, D, F)** Las proteínas DKK1, OPG y MCP-1 se cuantificaron en el medio de cultivo de las MSC no tratadas, tratadas con 3% de secretoma recogido a días 3 y 7 y tratadas con medio de diferenciación osteogénica a días 2, 7, 14 y 21 de cultivo. En el caso de las condiciones no tratado y de diferenciación osteogénica los datos representan la media ± SD de los duplicados evaluados a cada momento. En el caso de las condiciones tratadas con secretoma, los datos representan la media ± SD del tratamiento con secretoma de cuatro donantes realizados por duplicado en cada momento. El test empleado fue el *two way anova* con el análisis post hoc Dunnet. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el panel de las proteínas relacionadas con formación y remodelación ósea se midieron DKK1, OPG y MCP-1. Las dos primeras se encontraron en bajas concentraciones en las muestras de secretoma aplicadas a los cultivos (Fig. 38A y 38C), por ello el resultado obtenido del medio analizado corresponde a lo que las células las han liberado.

La proteína DKK1 presentó niveles elevados que aumentaron con el paso del tiempo en ambas condiciones tratadas con secretoma (Fig. 38B). Concretamente, las células tratadas con secretoma respecto a la condición no tratada fueron significativas a días 7, 14 y 21 en el caso del secretoma recogido a día 3, y a días 14 y 21 en el secretoma recogido a día 7 (Fig. 38B). Las diferencias significativas aumentaron con el paso debido a que la concentración de DKK1 aumentó en el medio de ambas condiciones tratadas con secretoma, pero no lo hacía de la misma manera en la condición no tratada.

Las concentraciones de la proteína OPG fueron similares entre todas las condiciones en los primeros días de análisis, días 2 y 7 (Fig. 38D). Las células tratadas con muestras de secretoma recogidas a distintos momentos mostraron un incremento en la concentración de OPG a días 14 y 21 respecto a los días previos, y también respecto a la condición no tratada en esos momentos (Fig. 38D).

En el caso de la proteína MCP-1 la concentración fue elevada en las muestras de secretoma de las membranas L-PRF recogidas a días 3 y 7 (Fig. 38E). Las células tratadas con estas muestras presentaron concentraciones similares a las de las muestras originales en el medio de las células recogido a día 2 de cultivo (Fig. 38F). Sin embargo, la concentración de esta proteína aumentó en el medio de las células tratadas con secretoma y en la condición no tratada a lo largo del tiempo, lo cual sugiere que este marcador es liberado por las propias células durante el cultivo (Fig. 38F). Además, la diferencia en la concentración entre muestras de secretoma respecto a la condición no tratada fue estadísticamente significativa en todos los momentos analizados en el caso de secretoma recogido a día 7, y para el secretoma

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

recogido a día 3 a excepción del día 21. No obstante, el incremento de la concentración de MCP-1 en las células no diferenciadas hizo que las diferencias significativas frente a las muestras de secretoma se redujeran a medida que aumentaba el tiempo de cultivo (Fig. 38F).

Las concentraciones de varias citoquinas también se cuantificaron en las muestras de secretoma de las membranas L-PRF recogidas a días 3 y 7 y en el medio de cultivo de las MSC tratadas con las distintas condiciones.

Las citoquinas IFN-γ e IL-8 presentaron concentraciones similares en las muestras de secretoma (Fig. 39A y 39C) y en el medio de cultivo de las células recogido a distintos tiempos (Fig. 39B y 39D). Sin embargo, la citoquina IFN-γ también se encontró en el medio de las células no tratadas y las tratadas con medio de diferenciación osteogénica (Fig. 39B), a diferencia de la citoquina IL-8 que no se encontró en esas condiciones (Fig.39D).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

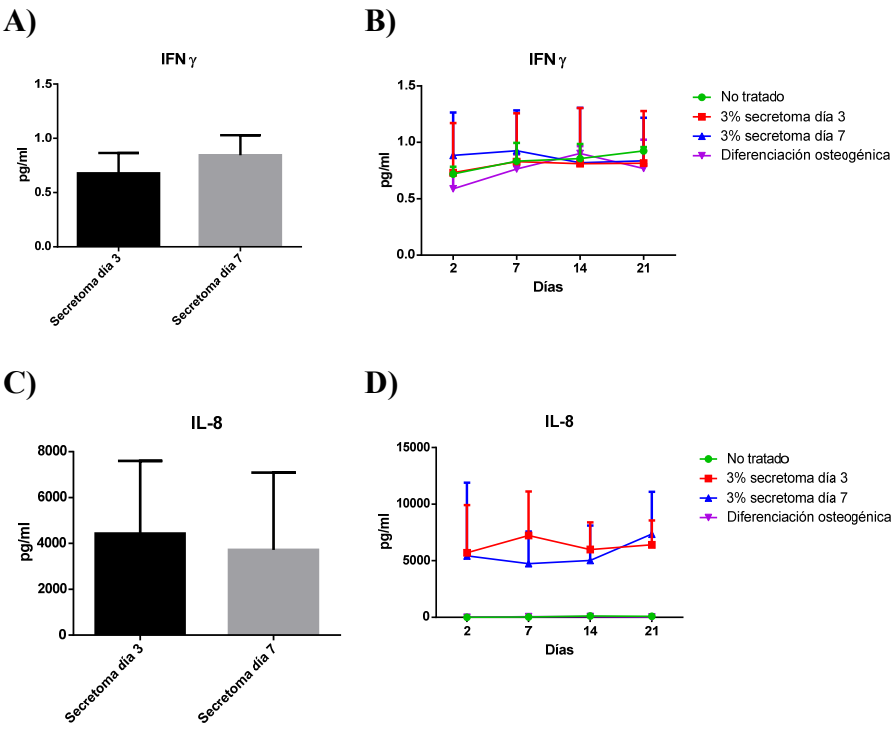


Figura 39. Evaluación de citoquinas proinflamatorias en las muestras de secretoma y en el medio de las MSC tratadas con estas muestras. A, C) Las citoquinas IFN- γ e IL-8 se midieron en las muestras de secretoma recogidas a días 3 y 7 empleadas para el tratamiento de las MSC. Las barras representan la media ± SD de cuatro donantes. **B, D)** Las citoquinas IFN-γ e IL-8 se cuantificaron en el medio de cultivo de las MSC no tratadas, tratadas con 3% de secretoma recogido a días 3 y 7 y tratadas con medio de diferenciación osteogénica a días 2, 7, 14 y 21 de cultivo. En el caso de las condiciones no tratado y de diferenciación osteogénica los datos representan la media ± SD de los duplicados evaluados a cada momento. En el caso de las condiciones tratadas con secretoma, los datos representan la media ± SD del tratamiento con secretoma de cuatro donantes realizados por duplicado en cada momento.

Las células tratadas con secretoma a día 3 fueron las únicas que mostraron concentraciones elevadas de TNF-α (Fig. 40B), manteniéndose estas en valores similares a lo largo del tiempo de cultivo. Las muestras de secretoma a día 3 presentaron los mismos valores que los cuantificados en el medio de cultivo de las células

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tratadas con esta condición (Fig. 40A), indicando que esta proteína está presente en el secretoma y no es liberado por las células.

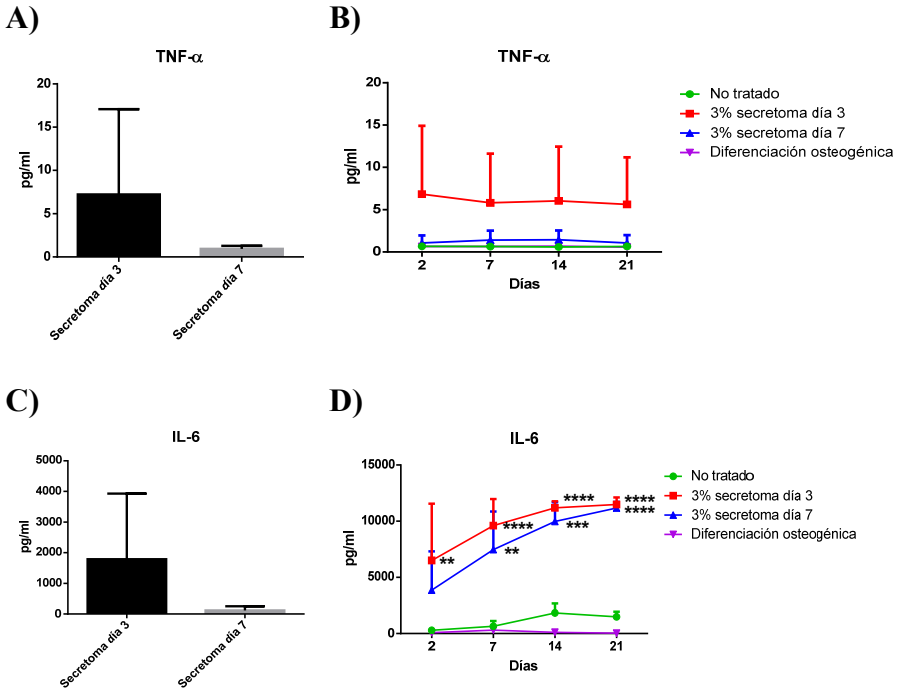


Figura 40. Evaluación de citoquinas proinflamatorias en las muestras de secretoma y en el medio de las MSC tratadas con estas muestras. A, C) Las citoquinas TNF-α e IL-6 se midieron en las muestras de secretoma recogidas a días 3 y 7 empleadas para el tratamiento de las MSC. Las barras representan la media ± SD de cuatro donantes. **B, D)** Las citoquinas TNF-α e IL-6 se cuantificaron en el medio de cultivo de las MSC no tratadas, tratadas con 3% de secretoma recogido a días 3 y 7 y tratadas con medio de diferenciación osteogénica a días 2, 7, 14 y 21 de cultivo. En el caso de las condiciones no tratado y de diferenciación osteogénica los datos representan la media ± SD de los duplicados evaluados a cada momento. En el caso de las condiciones tratadas con secretoma, los datos representan la media ± SD del tratamiento con secretoma de cuatro donantes realizados por duplicado en cada momento. El test empleado fue el *two way anova* con el análisis post hoc Dunnet. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001

La citoquina proinflamatoria IL-6 presentó concentraciones elevadas en todos los tiempos analizados en el medio de las células tratadas con ambos secretomas (Fig. 40D). Los niveles de IL-6 en las muestras de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

secretoma recogido a día 3 también fueron elevados (Fig. 40C), pero son superiores en el medio de las células tratadas con estas muestras a día 2 de cultivo. Además, en el medio de las células la concentración de esta proteína aumenta en la condición tratada con secretoma recogido a día 3 a lo largo del tiempo, indicando que IL-6 es liberado por las MSC. Por otro lado, las muestras de secretoma recogidas a día 7 presentaron niveles muy bajos de IL-6 (Fig. 40C), pero en el medio de las células tratadas con este secretoma la concentración fue elevada y también aumentaba con el paso del tiempo (Fig. 40D). Las células no tratadas presentaron niveles muy bajos de IL-6, por lo que las diferencias entre las distintas condiciones de secretoma y las células no diferenciadas fueron significativas a todos los tiempos analizados en el caso del secretoma de día 3 y a días 7, 14 y 21 para las células tratadas con secretoma de día 7. Asimismo, estas diferencias significativas se acrecientan con el paso del tiempo debido a que los niveles de IL-6 en las células tratadas con secretoma aumentan mucho, a diferencia de lo que aumentan en las células no tratadas (Fig. 40D).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

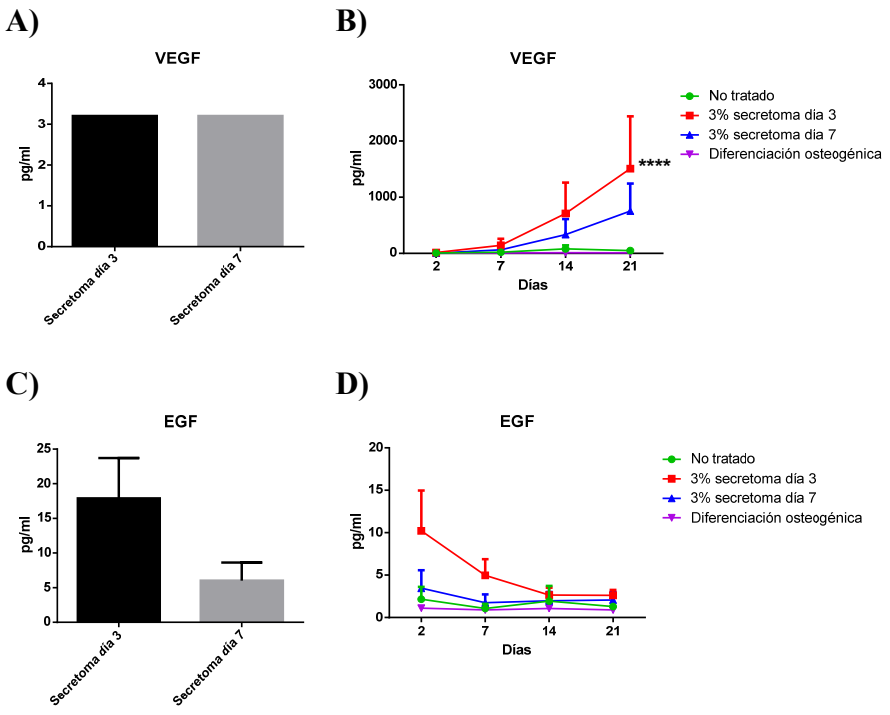


Figura 41. Evaluación de factores de crecimiento en las muestras de secretoma y en el medio de las MSC tratadas con estas muestras. A, C) Las concentraciones de los factores VEGF y EGF se midieron en las muestras de secretoma recogidas a días 3 y 7 empleadas para el tratamiento de las MSC. Las barras representan la media ± SD de cuatro donantes. **B, D)** Los factores VEGF y EGF se cuantificaron en el medio de cultivo de las MSC no tratadas, tratadas con 3% de secretoma recogido a días 3 y 7 y tratadas con medio de diferenciación osteogénica a días 2, 7, 14 y 21 de cultivo. En el caso de las condiciones no tratado y de diferenciación osteogénica los datos representan la media ± SD de los duplicados evaluados a cada momento. En el caso de las condiciones tratadas con secretoma, los datos representan la media ± SD del tratamiento con secretoma de cuatro donantes realizados por duplicado en cada momento. El test empleado fue el *two way anova* con el análisis post hoc Dunnet. ****p<0,0001

Los factores de crecimiento VEGF y EGF también fueron cuantificados en el medio de las células a distintos tiempos de análisis y en las muestras de secretoma empleadas para el tratamiento.

En el caso de VEGF, los niveles en las muestras de secretoma fueron muy pequeños (Fig. 41A), a diferencia de los cuantificados a días 14 y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

21 en el medio de las células tratadas con los secretomas recogidos a los distintos tiempos (Fig. 41B), indicando que VEGF es liberado por las células. Además, la concentración de VEGF se incrementa en las células tratadas con ambas condiciones de secretoma con el paso del tiempo, aunque siendo mayor la cantidad en las células tratadas con 3% de secretoma recogido a día 3, y por tanto la diferencia entre esta condición y la no tratada es estadísticamente significativa a día 21 (Fig. 41B).

Las cantidades del factor EGF fueron similares en las muestras de secretoma recogidos a días 3 y 7 (Fig. 41C) y en el medio de las células tratadas con esas muestras a día 2 (Fig. 41D). A pesar de ello, la concentración de este factor de crecimiento disminuyó en el medio de las células tratadas con el paso del tiempo, especialmente en la condición tratada con secretoma recogido a día 3 (Fig. 41D).

4.3.3.4 Efecto del secretoma en la diferenciación osteogénica: Evaluación de los niveles de calcio

Los depósitos de calcio se evaluaron sobre las células tras 21 días de tratamiento con las distintas condiciones. Cualitativamente, los cristales de calcio eran más grandes y se encontraban en mayor cantidad en las células tratadas con secretoma (Fig. 42C-D), especialmente con secretoma recogido a día 3 (Fig. 42C).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

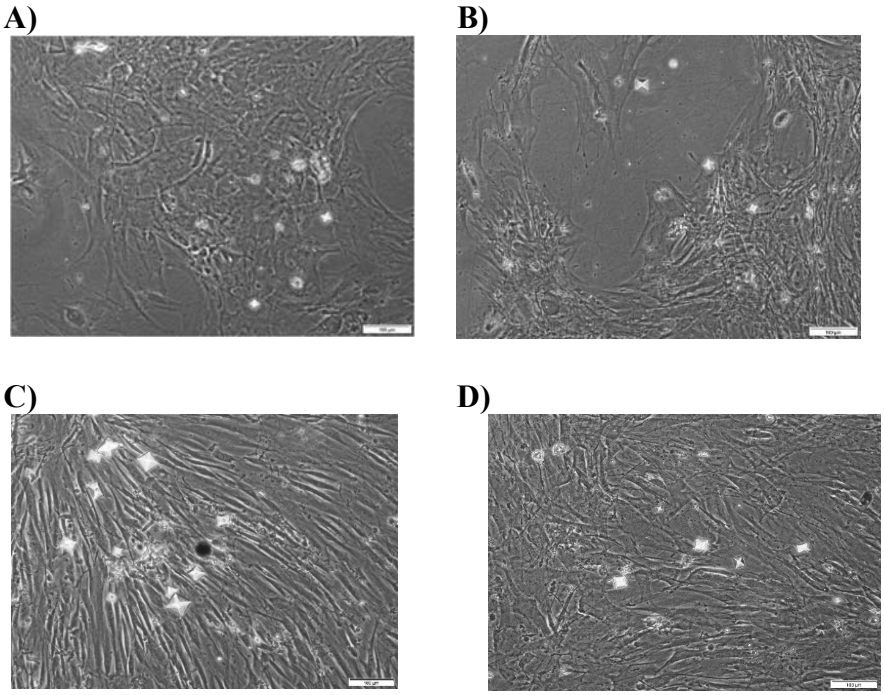


Figura 42. Imágenes representativas de los cristales de hidroxiapatita producidos por las MSC a día 21 de cultivo. Fotografías representativas de los cristales a día 21 en la condición no tratada **(A)**, en la condición tratada con medio de diferenciación osteogénica **(B)**, tratada con 3% de secretoma recogido a día 3 **(C)** y día 7 **(D)**.

La evaluación cuantitativa mostró que los niveles de calcio fueron elevados en las células tratadas con secretoma, siendo las diferencias estadísticamente significativas para ambas condiciones de secretoma respecto a la condición no tratado (Fig. 43).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

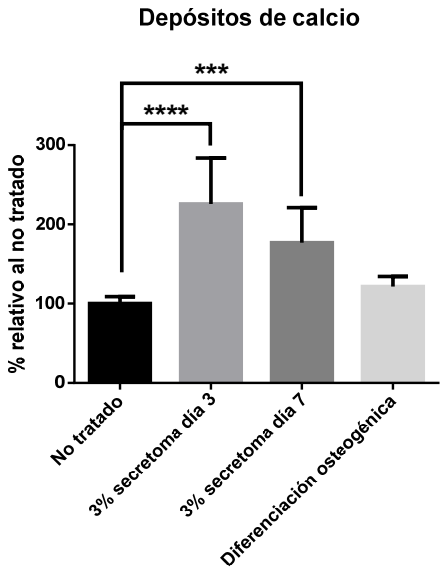


Figura 43. Evaluación de los depósitos de calcio en las MSC a día 21. Los depósitos de calcio se cuantificaron en las células fijadas tras 21 días en condiciones no tratadas, tratadas con 3% de secretoma recogido a días 3 y 7 y tratadas con medio de diferenciación osteogénica. Las barras de cada condición representan la media ± SD de duplicados, que en el caso de las condiciones tratadas con secretoma procedían de 4 donantes distintos. El test empleado fue el *one way anova* con análisis post hoc Holm-Sidak. *p<0,05

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.1 Estudio del contenido de las VEs liberadas por los CP tratados con Mirasol durante el almacenamiento

Actualmente en el campo de la medicina transfusional existe un debate sobre cuál es la mejor opción para el almacenamiento de plaquetas (156). Normalmente se almacenan a temperatura ambiente, pero existen alternativas para conservarlas a bajas temperaturas que en algunos casos incluyen la adición de DMSO. Sin embargo, el problema a evitar en todos los casos es la activación plaquetaria que a su vez es la responsable de la liberación de VEs. En las últimas décadas, se han empleado diferentes tecnologías de reducción de patógenos como Mirasol o Intercept, haciendo más seguros los CP, evitando el crecimiento bacteriano y permitiendo extender el tiempo de almacenamiento. No obstante, estas tecnologías no son totalmente inocuas ya que tienen un impacto en el proteoma plaquetario (44, 45, 58, 157-160), aunque este es menor comparado con el que causa el tiempo de almacenamiento (47-49, 51, 161), provocando lo que se conoce como lesiones de almacenamiento que se caracterizan, entre otras cosas, por la liberación de VEs.

Algunos grupos han descrito el efecto de diferentes agonistas plaquetarios sobre la liberación y el proteoma de las VEs (54, 162, 163). Pienimaeki-Roemer y colaboradores (79) describieron el proteoma de las VEs presentes en los CP, sin haber sido tratados con ninguna tecnología, a tiempo final de conservación (día 5), pero ninguno ha evaluado el efecto del almacenamiento en el proteoma de las VEs liberadas por los CP durante su conservación. Por ello, el objetivo de esta parte de la tesis fue analizar el contenido de las VEs liberadas por los CP durante su conservación con el fin de identificar marcadores de lesión plaquetaria que pueden estar relacionados con el desarrollo de reacciones adversas. Para ello se seleccionaron distintos momentos de almacenamiento, el día 2 por ser el primero en el que los CP se pueden transfundir tras el tratamiento con las tecnologías de reducción de patógenos y el 7 porque es el día límite de transfusión de los productos tratados. Las VEs se aislaron siguiendo un protocolo estandarizado en nuestro laboratorio (164) que permite obtener un buen rendimiento

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proteico y se caracterizaron siguiendo las recomendaciones de la ISEV (55).

La combinación de técnicas proteómicas cualitativas y cuantitativas aporta gran información sobre el contenido de las VEs derivadas de los CP a los distintos días de almacenamiento. De las más de 700 proteínas identificadas en las VEs derivadas de los CP, muchas habían sido descritas previamente en VEs derivadas de plaquetas y detectadas mediante distintas técnicas proteómicas (162, 163).

Atendiendo a las proteínas identificadas exclusivamente a un tiempo de almacenamiento, se encontró la proteína S100A9 a día 2. Esta proteína fue sugerida por Rijkers y colaboradores (161) como un marcador de plaquetas jóvenes porque su presencia en plaquetas disminuye significativamente a día 5 de almacenamiento comparados con los días 1 y 2, lo cual explica que en nuestra muestra solamente se haya identificado a día 2 de almacenamiento. Por otro lado, el receptor de colágeno GPVI se encontró únicamente en las VEs a día 7, lo que va en línea con los resultados obtenidos por Hosseini y colaboradores (165) quienes sugirieron este receptor como un marcador de lesiones de almacenamiento debido al aumento de su expresión a lo largo del tiempo de conservación. El conjunto de estas dos proteínas podría emplearse como marcador del posible estado de deterioro de los CP indicando si estos son adecuados o no para su transfusión para lo cual futuros estudios se centrarían en su validación en cohortes de muestras de CP independientes.

Los resultados cuantitativos mostraron que la gran mayoría de proteínas presentaba un aumento en la expresión a día 7 de almacenamiento. La quimiocina CCL5, que fue la proteína identificada con el mayor valor de *fold-change*, y PF4 están descritos como marcadores de activación plaquetaria (38) y se encontraron aumentados en las VEs a tiempo final de almacenamiento. Ambas proteínas tienen propiedades quimioatrayentes sobre monocitos, eosinófilos, neutrófilos y basófilos (166) pudiendo desencadenar reacciones adversas. Concretamente, CCL5 se ha postulado como una de las posibles proteínas junto con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

otras como TGFβ1 (también sobreexpresada a día 7 aunque con un valor de *fold change* menor a 2) que pueden desencadenar reacciones febriles no hemolíticas (167). Se sabe además que CCL5 tiene capacidad de reclutar basófilos (de forma dosis-dependiente) y que la liberación de histamina por parte de estos puede desencadenar reacciones postransfusionales (168) aunque esta proteína sola no es la causante de las posibles reacciones adversas provocadas por proteínas liberadas por plaquetas. Además, el cambio en la expresión de glicoproteínas en la superficie plaquetaria también se considera un indicador de activación plaquetaria (38). En este sentido, los resultados del estudio mostraron un aumento en la expresión de estos receptores en las VEs a día 7, con valores de *fold change* entre 2 y 3,8 dependiendo de la glicoproteína.

Entre las proteínas aumentadas a día 7 se encuentran enzimas indicadoras del estado metabólico de las células durante su conservación. La mayoría de las identificadas forman parte de la ruta de la glicólisis y la producción de lactato, lo que conlleva un aumento de los niveles de bicarbonato para tamponar el pH del medio. Como consecuencia de ello la CA2, proteína responsable de la disociación de bicarbonato en CO_2 y agua, se encuentra sobreexpresada. Todos estos datos indican niveles elevados de H_2CO_3 y lactato tras 7 días de almacenamiento, derivado de una disfunción del metabolismo de carbohidratos en plaquetas, otra de las lesiones típicas derivadas del almacenamiento (38). Además, a consecuencia de un incremento del funcionamiento de la ruta de la glicólisis se genera estrés metabólico y mayor producción de especies reactivas de oxígeno, que son detoxificadas por una gran variedad de enzimas, entre ellas PRDX6, GSTP1 y GSTO1, encontradas aumentadas también a día 7 de almacenamiento en las VEs. Esto es señal de una mayor concentración de especies reactivas de oxígeno en las plaquetas en este momento del almacenamiento y un desequilibrio en la producción de estas especies, que tienen un papel clave en el mantenimiento de la hemostasia, puede desencadenar eventos protrombóticos (169).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además de marcadores de lesión por almacenamiento, varias proteínas estructurales citoesqueléticas presentaron elevados niveles de expresión a día 7 comparado con el día 2, entre ellas CAPN1, GSN, TLN1, DSTN y CFL1. Las dos primeras promueven la formación de MVs por evaginación de la membrana mediante la despolimerización de los filamentos de actina tras la elevación de los niveles de calcio citosólico (170). Las tres últimas están asociadas al receptor ITA2B, el cual está implicado en la formación de MVs en plaquetas en reposo por la desestabilización del citoesqueleto (171), y que también presentó mayor expresión a día 7.

Esto último podría indicar una mayor liberación de VEs por parte de las plaquetas a día 7 de almacenamiento justificando el aumento de la expresión de una gran mayoría de proteínas en las VEs en ese momento. Con el fin de comprobar si la sobreexpresión de las proteínas podía ser debido a una mayor presencia de VEs en los CP a día 7 se cuantificó el número de MVs liberadas mediante citometría de flujo, empleando como marcadores anexina V y CD41, observando que el número era muy variable entre días y muestras. La variabilidad presente puede explicarse por la composición de cada CP formado por un *pool* de BC de 5 donantes de distinto sexo y que unido a otras variables podría tener un impacto en el contaje de MVs (172, 173). No obstante, es conveniente resaltar que una de las limitaciones del equipo utilizado en este estudio es la baja resolución para detectar partículas de tamaños inferiores a los 160 nm, correspondientes mayoritariamente a la subpoblación de exosomas.

De todas las proteínas expresadas diferencialmente se seleccionaron tres para la validación de los resultados obtenidos en VEs procedentes de una cohorte independiente de CP: CD9 e ITA2B, porque son marcadores de exosomas y MVs, respectivamente, siendo la última además un receptor esencial para la agregación y estando relacionado con la liberación de VEs en ausencia de estímulo (171); y ACTN1 porque es una proteína que se une a la actina, uno de los elementos principales del citoesqueleto y su reorganización es responsable de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

formación de MVs. Los resultados procedentes de los estudios de validación confirmaron el aumento de la expresión de las tres proteínas durante el almacenamiento y además se comprobó que los niveles de estas tres proteínas ya comienzan a incrementarse en las VEs derivadas de los CP a día 4 de almacenamiento (Fig. 13).

Por tanto, el proteoma de las VEs liberadas por los CP durante el almacenamiento varía a medida que aumenta el tiempo de conservación. La gran mayoría de las proteínas se encuentran sobreexpresadas a día 7, indicando un estado de hiperactivación plaquetaria entre otras lesiones derivadas del almacenamiento. Existe la hipótesis de que algunas proteínas liberadas por las plaquetas durante su conservación pueden provocar reacciones adversas, como es el caso de CCL5, y su elevado aumento a día 7 podría aumentar la probabilidad. Por consiguiente, el cargo proteómico de las VEs puede tener una repercusión en el receptor tras una transfusión dependiendo del tiempo de almacenamiento de los CP y esto se debe tener en cuenta a la hora de la transfusión de estos derivados limitando al máximo el empleo de los mismos a tiempos largos de conservación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2 Estudio de caracterización del perfil proteómico del secretoma de las membranas L-PRF

El uso exponencial de concentrados ricos en plaquetas (CRP) para el tratamiento de distintas patologías en diversos ámbitos clínicos ha incrementado el estudio de los mismos. Los efectos positivos observados tras la aplicación de estos concentrados radican en la actividad biológica de los factores de crecimiento liberados por los mismos. Por consiguiente, diferentes grupos han medido la liberación de algunos factores de crecimiento específicos, comparando su enriquecimiento en diferentes CRP y midiendo su cinética de liberación a lo largo del tiempo (100-103). Sin embargo, todavía no se ha caracterizado en detalle el proteoma del secretoma liberado por los CRP, pero los recientes avances en el campo de la proteómica han permitido progresar en este sentido. Algunos estudios han empleado distintas metodologías para analizar el proteoma de diversos CRP, aunque todos ellos lo han hecho empleando anticoagulantes (104, 106). Además, Yaprak y colaboradores analizaron el secretoma de PRF por 2D-LC/MS-MS encontrando un bajo número de identificaciones, solamente 35 (105).

En el estudio que se presenta en esta tesis doctoral, se realizó el análisis proteómico más detallado hasta la fecha del secretoma de las membranas L-PRF. Primeramente, se analizó el secretoma de las membranas a día 3 por LC-MS/MS. A continuación, se cuantificaron por ELISA los factores de crecimiento liberados por estas membranas a días 3 y 7 y también se detectó por SWATH la expresión diferencial de las proteínas liberadas a distintos días de cultivo de las membranas: 3, 7 y 21.

El secretoma de las membranas L-PRF incluye múltiples proteínas liberadas por varios tipos de células sanguíneas y con un rango dinámico variable. Además, comparado con los típicos CRP usados en la práctica clínica, la presencia de leucocitos en esta membrana rica en plaquetas contribuye a la presencia de otras proteínas en el secretoma, haciéndolo más complejo. En este contexto, encontramos que el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fraccionamiento de los extractos proteicos por 1D-SDS-PAGE aumentaba la cobertura del proteoma. Por ello, se llevaron a cabo dos aproximaciones complementarias basadas en gel para el análisis del secretoma a día 3, como se indica en el apartado 4.2.2.1.

De esta manera se identificaron un total de 705 proteínas en el análisis del perfil proteico del secretoma de las membranas L-PRF a día 3. Entre las rutas principales en las que estaban implicadas las proteínas identificadas se encontraban la endocitosis mediada por clatrina, la respuesta de fase aguda y la activación LXR/RXR, entre otras. Precisamente, Anitua y colaboradores (104) también habían encontrado las rutas de respuesta de fase aguda y la activación LXR/RXR entre las 10 rutas principales en el análisis de los extractos proteicos con acetonitrilo de su CRP. La presencia de proteínas abundantes relacionadas con la respuesta de fase aguda como fibrinógeno, albúmina y factores de la cascada del complemento fueron también identificadas en el secretoma y los lisados de otros CRP (104-106). En nuestro caso, la endocitosis mediada por clatrina es la vía más representativa debido en parte a la identificación de factores de crecimiento como PDGF y EGF en el secretoma de las membranas L-PRF. Específicamente, este tipo de endocitosis es una importante ruta de internalización de receptores tirosina quinasa, que contribuyen a la respuesta a EGF (174) y PDGF estimulando la migración y proliferación celular (175).

Entre los principales procesos biológicos relacionados con las identificaciones a días 3 otras rutas secretoras también fueron identificadas. En efecto, la identificación de ITA2B y CD9 en el secretoma sugiere la presencia de VEs derivadas de plaquetas. Por otro lado, se identificaron proteínas con actividad antimicrobiana como MMP9, CAP7, PERM, BPI y CATG indicando degranulación neutrófila. Estas proteínas liberadas por neutrófilos todavía no habían sido descritas en CPR, posiblemente debido a que muchos de ellos no contienen leucocitos. Además de las proteínas procedentes de plaquetas y neutrófilos, el análisis de biología de sistemas destacó la presencia de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proteínas derivadas de monocitos y linfocitos B y T CD4 en el secretoma a día 3.

Para conocer las diferencias en el secretoma de las membranas con el paso del tiempo, se llevó a cabo un análisis inicial 1D-SDS-PAGE a días 3 y 7, centrándonos en las bandas que presentaban distinta intensidad entre condiciones. Tras el análisis de las bandas por LC/MS-MS, más del 50% de proteínas encontradas fueron identificadas en ambas condiciones; sin embargo, EGF fue hallado únicamente a día 3. Los factores de crecimiento son claves para los procesos de curación de heridas, por ello se llevó a cabo un análisis cuantitativo complementario de factores de crecimiento mediante la técnica ELISA de las mismas muestras analizadas por espectrometría de masas. Acorde a este análisis, la mayoría de los factores de crecimiento se encontraban enriquecidos a día 3, muy probablemente debido a la alta degranulación neutrófila y plaquetaria a este punto. Solamente GDF15, una proteína altamente expresada en macrófagos, apareció disminuida en todos los donantes a día 3. La razón de esto podría ser que a día 7 el número de macrófagos probablemente sea más elevado que a día 3 por la transformación de monocitos en macrófagos durante ese período de tiempo.

Varios estudios han encontrado diferencias entre la concentración y la cinética de liberación de algunos factores de crecimiento en distintos CPR (102, 176-178) incluso combinados con xenografs (101), y la causa de las diferencias detectadas podría ser el empleo de diversas metodologías para la preparación de los CRP. A pesar de la variabilidad biológica encontrada en nuestro análisis de factores de crecimiento, los datos más relevantes pueden correlacionarse con los obtenidos por proteómica, puesto que los factores más abundantes detectados por ELISA a día 3 (PDGFA, TGFβ1 y EGF) habían sido previamente identificados por espectrometría de masas a ese día.

Además de caracterizar el proteoma de las membranas L-PRF, en este estudio se quiso ir un paso más allá y cuantificar las diferencias en el secretoma liberado por las membranas a lo largo del tiempo. Para este

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

propósito, se recogieron nuevas membranas procedentes de 4 donantes y se cultivaron durante 21 días. Los secretomas recogidos a días 3, 7 y 21 fueron analizados por espectrometría de masas empleando la metodología SWATH y de este modo se identificaron un total de 202 proteínas con diferencias estadísticamente significativas. Como esperábamos, casi todas las proteínas identificadas disminuían con el paso del tiempo, una posible explicación podría ser la apoptosis de las distintas células sanguíneas presentes en las membranas L-PRF. Entre esa gran mayoría se encontraban MMP9, TSP1 y CO3; concretamente estas proteínas habían sido identificadas en el análisis proteómico cualitativo. La sobreexpresión de estas proteínas relacionadas con la degranulación neutrófila y plaquetaria a día 3 se confirmó mediante inmunodetección en una cohorte independiente de membranas y de donantes.

Al mismo tiempo, en línea con la teoría de la apoptosis celular expuesta anteriormente, se podría explicar la sobreexpresión de algunas proteínas con el paso del tiempo como CAH1, PRDX2 y CATD. Las primeras son enzimas implicadas en la detoxificación de ROS y que su expresión se eleve con el paso del tiempo indica altos niveles de ROS y de estrés celular que están relacionados con la apoptosis celular. CATD es una proteasa liberada por los gránulos azurófiros de los neutrófilos que fue postulada como un inductor de la apoptosis en neutrófilos maduros a través de la activación de la caspasa 8, y cuya liberación se retrasa en ausencia de ROS (179). En línea con los resultados obtenidos por Conus y colaboradores, la sobreexpresión de CATD con el paso del tiempo en las membranas L-PRF indica apoptosis neutrófila a días 7 y 21.

El fibrinógeno es otra de las proteínas cuyos niveles aumentan con el paso del tiempo. En la cascada de la coagulación, la protrombina se escinde proteolíticamente para formar trombina gracias a la acción de los factores V y X de la coagulación. A continuación, la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina y esta es estabilizada por el factor XIII (180). Los gránulos α de las plaquetas liberan fibrinógeno cuando

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las plaquetas se activan (107). Que los niveles de fibrinógeno aumenten con el paso del tiempo sugiere que se produce degranulación plaquetaria, y teniendo en cuenta que el aumento de CATD indica también degranulación neutrófila se refuerza la hipótesis de la apoptosis celular. La ausencia de trombina en el secretoma de las membranas L-PRF y los niveles decrecientes de protrombina y del factor V de la coagulación con el paso del tiempo, no permiten que el fibrinógeno liberado por las plaquetas se transforme en fibrina y por tanto el fibrinógeno se acumula. El hallazgo de la acumulación de fibrinógeno con el paso del tiempo en el secretoma de las membranas L-PRF se validó tras medir los niveles de este en una cohorte independiente de donantes y de membranas mediante inmunodetección. Los altos niveles de fibrinógeno a días 7 y 21 podrían contribuir a las propiedades que las membranas L-PRF tienen en la curación de heridas. Esto último sigue la línea de los datos procedentes de Rybarczyk y colaboradores (181) quienes demostraron que el fibrinógeno mejora tanto la cicatrización como la proliferación celular reduciendo significativamente el tiempo de cierre de heridas en un modelo de lesión tisular de fibroblastos dermales.

A su vez, otra proteína que aumenta sus niveles en el secretoma con el paso del tiempo es CATS. Un estudio reciente ha demostrado el papel de CATS en la hidrólisis de las cadenas α y β de fibrina, sugiriendo además la posibilidad de múltiples lugares de corte a lo largo de la hebra de fibrina por la capacidad de esta enzima de escindir incluso los fragmentos producidos tras la fibrinólisis por plasmina (182).

Las propiedades fibrinolíticas de CATS asociada a su sobreexpresión en el secretoma de las membranas L-PRF en momentos tardíos, podría ser una explicación sobre la degradación de la membrana con el paso del tiempo. Además, las validaciones corroboraron la sobreexpresión de CATS en una cohorte independiente de donantes a día 21. Esto apoya la teoría de Douglas y colaboradores (182) que sugirieron que las catepsinas están implicadas en la degradación de redes de fibrina con células endoteliales y fibroblastos encapsulados, que colapsan de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

manera impredecible e incontrolada en días o semanas (183). Además, de su actividad fibrinolítica, CATS también participa en los procesos de regeneración celular. Recientemente, Memmert y colaboradores han estudiado las propiedades de CATS en el cierre de heridas proporcionando evidencia de que esta enzima estimula la proliferación y migración de las células del ligamento periodontal (184).

En resumen, este exhaustivo estudio ha permitido conocer más a fondo las moléculas que posiblemente estén involucradas en la actividad biológica de la membrana, que le confiere su potencial terapéutico. Como, además, es un campo reciente y con escasa información sobre sus bases moleculares, un conocimiento más profundo sobre las reacciones que tienen lugar a nivel celular podría permitir la optimización de su empleo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre diferentes tipos celulares

Como se especificó anteriormente, muchos estudios han obtenido buenos resultados tras la aplicación *in vivo* de las membranas L-PRF, y eso se debe en parte a la gran concentración de factores de crecimiento que estas liberan. Entre los tipos celulares que mejor responden a ellos se encuentran los fibroblastos, osteoblastos y células madre (107, 108), tipos celulares que intervienen/participan tras producirse una lesión. Puesto que se realizó una caracterización cualitativa y cuantitativa del secretoma de las membranas L-PRF, se decició evaluar el efecto *in vitro* sobre estos tipos celulares para obtener mayor información sobre a qué niveles actúan las proteínas liberadas por las plaquetas y leucocitos.

5.3.1 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre fibroblastos

Una de las ramas de la medicina donde se aplican estas membranas es la dermatología. El fin es acelerar las etapas de curación de heridas y evitar infecciones o cerrar aquellas de compleja resolución porque cronifican y por tanto causan dolor. Los fibroblastos son uno de los principales tipos celulares implicados en la cicatrización de las heridas. Estos se ven atraídos por los factores de crecimiento liberados en la fase proinflamatoria por leucocitos y plaquetas y migran hasta la zona depositando una capa de colágeno que dará lugar al cierre y cicatrización de la herida. Debido a que las membranas L-PRF están compuestas por plaquetas y leucocitos y entre las proteínas que se liberan se encontraron factores de crecimiento, se decidió estudiar el efecto del secretoma a nivel de la migración y proliferación celular.

Previamente a la realización del estudio, hubo que establecer las condiciones adecuadas para evaluar el efecto del secretoma sobre fibroblastos dermales.

Los fibroblastos necesitan para su crecimiento factores que están presentes en el suero con el que se suplementa el medio de cultivo. Antes de llevar a cabo este ensayo, se planteó que quizá los factores ya

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

presentes en el medio de cultivo podían enmascarar el efecto del secretoma de las membranas L-PRF. Por ese motivo se realizaron experimentos de proliferación y migración celular donde los fibroblastos se cultivaron en medios control, que contenían distintas concentraciones de FBS (10, 1 y 0 %), y medios tratados, a los que se le había añadido además secretoma a una concentración fija (10 ng/ml) seleccionada en base a la concentración estándar de bFGF y EGF que se utiliza habitualmente en estudios *in vitro* (155). En el ensayo de proliferación se observó que ninguna de las concentraciones de FBS parecía enmascarar el efecto del secretoma. Por el contrario, altas concentraciones de FBS (10%) sí lo hacían en migración celular, pero esta concentración era la única que aumentaba la migración de forma significativa y cerraba la herida (185).

La concentración de 10% de FBS era necesaria para cerrar la herida, pero en este caso la condición control (sin secretoma) superaba al tratado, lo que nos llevó a pensar que quizá la concentración seleccionada de secretoma no era la adecuada. Tras consultar la bibliografía, se decidió suplementar el medio de cultivo con distintas concentraciones de secretoma.

En primer lugar, se seleccionó un rango de concentraciones de 1 a 20 % de secretoma y se llevaron a cabo nuevos ensayos de proliferación y migración. En la proliferación se observaba un incremento a medida que aumentaba la concentración de secretoma, a excepción de la concentración más alta, 20%, que producía un efecto negativo. Sin embargo, en la migración aumentaba el cierre de herida a medida que aumentaba la concentración de secretoma en el medio.

Precisamente, varios investigadores describieron el mismo efecto a nivel de la proliferación cuando emplearon concentraciones elevadas de concentrados de plaquetas (CP) en diferentes tipos celulares. Por ejemplo, Han y cols. (186) observaron inhibición de la proliferación de células del ligamento periodontal utilizando PRP al 50%. El grupo de Amable y cols. (187) encontraron que existía una inhibición de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proliferación a concentraciones de PRP de 20 y 30% en BM-MSC, provocando incluso muerte celular a estas concentraciones, al igual que en nuestro caso. Además, otros grupos descubrieron que concentraciones de 15 y 30 % de PRP inhibían la proliferación en células del ligamento periodontal humano, osteoblastos y células endoteliales tras 6 días de incubación (121).

Al confirmar que altas concentraciones de secretoma impedían la proliferación, se evaluó un rango más bajo, del 1 al 10% de secretoma, siendo la concentración de 3% la que mostraba mayor proliferación, seguida de la de 5%. Las concentraciones más altas evaluadas en este ensayo, 7 y 10%, inhibieron la proliferación, al contrario que en el ensayo anterior donde la concentración de 10% de secretoma alcanzaba la máxima proliferación. Esta diferencia se debe a que en cada ensayo se empleó una muestra de secretoma de distintos donantes y como se observó en el apartado 4.2.2.3, el secretoma de cada donante tiene una concentración distinta de cada proteína, pudiendo ser esta la causa de las diferencias observadas entre las mismas concentraciones en distintos donantes. Para muchos grupos la concentración de PRP óptima fue la de 5% ya que era la que mejores resultados de proliferación mostraba tanto en células del ligamento periodontal (120, 121) como en osteoblastos, células endoteliales (121) y en fibroblastos (124). Sin embargo, ninguno de los estudios mencionados testó la concentración de 3%.

En el caso de la migración, todas las concentraciones superaron al control positivo en el cierre de la herida a las 24 horas, destacando la concentración 10% de secretoma. Algunos de los trabajos citados anteriormente evaluaron proliferación y migración a concentraciones de PRP de 1, 2,5 y 5 % encontrando que la proliferación máxima se producía al 5%, pero que no había diferencias entre las concentraciones de 2, 5 y 5% a nivel del cierre de herida a las 24 y 48 h (124). Un estudio publicado en el año 2019 evaluó el impacto de distintos CP, PRP y PRF a nivel de la proliferación y migración de fibroblastos gingivales y osteoblastos (125). En ensayos preliminares descubrieron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que de todas las concentraciones ensayadas (2,5, 5, 10, 25 y 50%), la de 5% era también la que mejores datos de proliferación mostraba en fibroblastos y osteoblastos con PRF (125). Los ensayos de migración hechos únicamente a esta concentración también mostraron un incremento de la migración tras 48 horas de tratamiento.

La diferencia de opiniones sobre cuál es la concentración óptima varía por muchas razones. Cada grupo obtiene los CP de manera distinta, lo que ya cambia su composición, y aparte no todos los analizan a los mismos porcentajes de volumen. Además, como hemos observado en los ensayos de proliferación, al emplear muestras de distintos donantes se obtuvieron diferencias en cuanto a qué concentración era la más óptima. A pesar de esa variabilidad se pueden seleccionar concentraciones donde todos los donantes obtengan valores aceptables de proliferación.

Al no haber consenso entre los distintos ensayos, se decidió evaluar las concentraciones que mayores resultados daban en cada donante para ver si existía una correlación entre concentración de secretoma y efecto. En total se evaluaron los secretomas de membranas L-PRF recogidos a días 3 y 7 procedentes de 8 donantes diferentes.

Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de 3% de secretoma recogido a día 3 mostraba mayor proliferación y migración que la misma muestra testada a la concentración de 10%. Al contrario ocurría con la muestra de secretoma recogida a día 7, donde la concentración de 10% mostraba mayor proliferación y migración que la misma muestra al 3%.

Una posible explicación a los resultados obtenidos reside en el contenido de las proteínas presentes en cada muestra. Como se observó en el estudio cuantitativo, existe una gran variedad de proteínas sobreexpresadas en el secretoma de las membranas L-PRF recogido a día 3 que podrían ser la causa del efecto negativo sobre la proliferación y migración cuando este se aplica en una cantidad excesiva. La proteína TSP-1 fue una de ellas y precisamente Hsu y cols. (121) encontraron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que concentraciones superiores a 2,5 µg/ml disminuían la viabilidad (proliferación) de osteoblastos, células endoteliales y de células del ligamento periodontal. En su estudio comprobaron que el uso de PRP a una concentración de 15% reducía la proliferación de todos los tipos celulares, pero que a 30% todavía lo hacía más. Como la concentración de TSP-1 en esta última condición fue de 180 µg/ml, muy superior a 2,5 µg/ml, sugirieron que esta proteína podría ser la causante de los efectos antiproliferativos que se encontraban a altas concentraciones de PRP (188). Sin embargo, también se postularon otras proteínas de origen leucocitario, entre ellas IL-1B, TNF-α y varias proteasas e hidrolasas (189-192), como las posibles causantes de inhibir la proliferación y estimular la apoptosis. Las muestras de secretoma a día 3 también contienen una amplia variedad de proteínas derivadas de leucocitos, y su gran cantidad en el secretoma recogido a día 3 podría dar explicación a los resultados observados.

La misma razón podría justificar el resultado contrario que se observa en las muestras de secretoma a día 7. La gran mayoría de las proteínas presentes en los secretomas de las membranas L-PRF a día 7 se encuentran disminuidas con respecto a día 3, por ello hace falta aumentar la concentración de secretoma a este día para obtener mejores resultados en proliferación y migración.

Cabe destacar que a pesar de aumentar la concentración de secretoma en las muestras de día 7, sigue siendo la concentración de 3% de secretoma a día 3 la que mejores resultados de proliferación muestra. Sin embargo, en el caso de la migración es la condición de 10% de secretoma a día 7 la que obtiene mejor dato de cierre de herida con respecto al control. La explicación a esto podría encontrarse de nuevo en la cantidad de proteínas presentes en el secretoma. Se ha visto que altos niveles de CATS correlacionan con una alta capacidad de migración en células tumorales y que el bloqueo de esta enzima con moléculas específicas logra disminuir la migración (193). Además, también se conoce que el fibrinógeno favorece la migración de los fibroblastos sobre todo cuando este se encuentra a una concentración

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cercana a la del plasma (194). Tanto CATS como fibrinógeno aumentan sus niveles en el secretoma con el paso del tiempo, pudiendo ser algunas de estas proteínas las que faciliten la migración de los fibroblastos tras el tratamiento con el secretoma recogido a día 7.

La evaluación de los secretomas de las membranas L-PRF recogidos a distintos días nos permite entender el efecto de las proteínas liberadas por plaquetas y leucocitos sobre los fibroblastos y de qué manera contribuyen en cada etapa del cierre de una herida.

5.3.2 Estudio del efecto de la proteína BMP-5 presente en el secretoma de las membranas L-PRF sobre los osteoblastos

Uno de los campos de mayor aplicación de las membranas L-PRF es la odontología debido a su fácil manipulación y efectos beneficiosos. En este ámbito clínico el uso de estas membranas está desplazando a materiales actualmente empleados para llevar a cabo injertos óseos. Muchos de estos materiales, se suplementan con proteínas como las BMPs para estimular la formación de hueso. Las proteínas de la familia BMP están implicadas en la regeneración y remodelación ósea, concretamente las isoformas 2 y 7 han sido aprobadas para el tratamiento de algunos defectos óseos (195).

El potencial empleo de las membranas L-PRF es que ya contienen moléculas que estimularán diferentes tipos celulares acelerando el proceso de cicatrización y regeneración. Entre las muchas proteínas secretadas por las membranas L-PRF, se identificó la proteína BMP-5 en la mitad de los donantes analizados mediante inmunodetección, tal cual se ha descrito en el apartado 4.2.2.3 de la presente tesis doctoral. La detección de la isoforma 5 (BMP-5) y su papel en la remodelación ósea nos llevó a plantear un estudio piloto con el objetivo de evaluar el papel osteogénico de esta proteína presente en el secretoma de las membranas L-PRF sobre los osteoblastos.

En este estudio tal y como se detalla en el apartado 4.3.2 de la presente tesis doctoral, se analizaron dos tiempos de recogida del secretoma (día 3 y 7) en los cuales el secretoma constaba de BMP-5 a una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

concentración de 0,1 ng/ml. Al mismo tiempo se incluyó un control positivo en el cual BMP-5 se encontraba a la concentración de 0,1 ng/ml y una condición sin tratar para comparar el efecto.

Se evaluó el proceso de diferenciación osteoblástica mediante el análisis de un panel de enzimas, proteínas y citoquinas en el medio de cultivo a los días 2, 7 y 14. La evaluación de la citotoxicidad mediante la determinación de la lactato deshidrogenasa en el medio mostró ligeros aumentos en la expresión de esta enzima a distintos tiempos analizados, tanto en los osteoblastos tratados con secretoma como en los tratados solo con BMP-5, indicando que se está produciendo diferenciación osteoblástica ya que este proceso conlleva apoptosis (196). Los resultados obtenidos tras el análisis del panel de proteínas de diferenciación osteogénica en el medio fueron diferentes entre las muestras de secretoma recogidas a distintos tiempos. La muestra de secretoma recogida a día 7 aumentó la actividad de la fosfatasa alcalina en todos los momentos analizados, pero especialmente a día 2. Esta enzima es un marcador de osteogénesis y su incremento a tiempos tempranos indica diferenciación osteoblástica (197). Por el contrario, la muestra de secretoma recogida a día 3 no produjo tanto incremento de esta enzima.

Los niveles de las proteínas DKK1 y SOST fueron similares entre todas las condiciones analizadas, a excepción de alguna variación puntual en algún momento. En cuanto a los marcadores de diferenciación OPG y OPN mostraron concentraciones crecientes en el medio tras el tratamiento con el secretoma a lo largo del tiempo, sugiriendo este aumento en la expresión diferenciación hacia osteoblasto maduro (197). Sin embargo, los niveles de la proteína OC fueron mayores en el control positivo indicando que las muestras de secretoma tienen un efecto menor sobre la mineralización.

En el caso de la proteína BMP-5 se ha descrito que existen efectos diferenciales sobre MSC dependiendo de la concentración utilizada y cuando se emplea en combinación con otras proteínas, tales como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

BMP-2 y BMP-6 (198). Así, Wultz y cols demostraron que el uso de BMP-5 a bajas concentraciones (1 ng/ml) aumenta la mineralización y el ratio RANKL/OPG en osteoblastos (198). Por el contrario, altas concentraciones de BMP-5 (100 ng/ml) mostraron una reducción en ambos parámetros. Por otro lado, la combinación a bajas de BMP-5 concentraciones con BMP-2 reduce la mineralización, sin embargo, los depósitos de calcio se incrementan a altas concentraciones de BMP-5 en combinación con BMP-2 (198).

En nuestro caso, la aplicación de la proteína BMP-5 a bajas concentraciones (0,1 ng/ml) aumentó los depósitos de calcio y la expresión de osteocalcina comparado con el tratamiento de los osteoblastos con las muestras de secretoma a la concentración de 0,1 ng/ml de BMP-5. No obstante, en el caso de las células tratadas con secretoma, la proteína BMP-5 no se encontraba sola sino en combinación con otras muchas proteínas presentes en diferentes cantidades. A pesar de ello, las muestras de secretoma mostraron mayor efecto sobre la expresión de marcadores osteogénicos (ALP, OPG, OPN) que el tratamiento con BMP-5 solamente sugiriendo efecto sobre la diferenciación de los osteoblastos, pero no sobre su mineralización.

La medida de las citoquinas proinflamatorias aportó información interesante sobre el efecto del secretoma sobre los osteoblastos. La concentración de las citoquinas proinflamatorias TNF-α, IL-1β e IL-6 en el medio de los osteoblastos tratados con la muestra de secretoma recogida a día 3 fue elevada en todos los momentos analizados, mientras que en las células tratadas solamente con BMP-5 y en las no tratadas los niveles eran casi indetectables. Esto sugiere que las citoquinas que estamos midiendo en el medio de las células tratadas con secretoma recogido a día 3 no son secretadas por los osteoblastos, sino que proceden del propio secretoma. Los estudios cualitativos, realizados previamente del secretoma de la membrana, señalaron como ruta principal en la que participan las proteínas liberadas por la membrana a día 3 la respuesta de fase aguda (Fig.10A). Esto indica la presencia de una gran cantidad de proteínas que intervienen en procesos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inflamatorios. Además, el estudio cuantitativo indicó que la gran mayoría de las proteínas presentes a día 3 disminuyen con el paso del tiempo, por ello no se observaron concentraciones elevadas de las citoquinas TNF-α e IL-1β en el medio de los osteoblastos tratados con secretoma de recogido a día 7.

Varios grupos han sugerido que TNF-α e IL-1β tienen un efecto inhibitorio sobre la osteogénesis. Ambas suprimen la mineralización y la actividad de la fosfatasa alcalina y la expresión de genes claves para la diferenciación osteogénica (199, 200). Las altas concentraciones de ambas citoquinas en el secretoma recogido a día 3 podrían explicar los bajos niveles de la fosfatasa alcalina en los osteoblastos tratados con esa muestra de secretoma. A su vez, las altas cantidades podrían ser también las responsables de la baja mineralización porque, como hemos observado en nuestro caso, el tratamiento de los osteoblastos con las muestras de secretoma no logra superar al control positivo en la mineralización, a pesar de que si lo haga en la expresión otros marcadores de diferenciación osteogénica.

Los osteoblastos contribuyen al proceso de remodelación mediante el balance de la formación y la reabsorción ósea. La secreción de RANKL por parte de los osteoblastos estimula a los osteoclastos mediante la unión de este ligando a su receptor. Con el fin de regular este proceso y que no haya una activación exagerada de los osteoclastos, los osteoblastos también secretan OPG, que inhibe la acción de RANKL mediante el bloqueo de su receptor (201).

El análisis de la expresión de las proteínas OPG y RANKL en los osteoblastos a día 14 de cultivo, mostró que las células tratadas con el secretoma recogido a día 7 son las que expresan mayor cantidad de OPG. Por otro lado, la expresión de RANKL fue similar entre las células tratadas con secretoma recogido a día 7 y las no tratadas.

El ratio OPG/RANKL fue próximo a 1 en las células tratadas solo con BMP-5 y las tratadas con secretoma recogido a día 7, indicando que ambas proteínas se expresan en la misma cantidad. Por el contrario, en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las células no tratadas y en las tratadas con secretoma recogido a día 3 el ratio fue inferior a 1, mostrando que hay más cantidad de RANKL que de OPG.

Una posible explicación a los niveles de expresión y el ratio OPG/RANKL vuelve a estar en las proteínas que se encuentran presentes en el secretoma. Como se especificó anteriormente, el secretoma recogido a día 3 presenta valores elevados de las citoquinas proinflamatorias, y recientemente se ha demostrado que TNF-α e IL-1B están relacionadas con el aumento en la expresión de RANKL por parte de los osteoblastos estimulando la osteoclastogénesis y la remodelación del hueso (202). Por esta razón, la relación OPG/RANKL es favorable a este último en el caso de la muestra de secretoma recogida a día 3, aunque no tanto como la condición no tratada donde el ratio indica que hay el doble de RANKL que de OPG. Esto puede ser debido de nuevo a la presencia de otras muchas proteínas en el secretoma que contrarrestan los efectos de las proteínas proinflamatorias.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio piloto no reflejan el efecto de la proteína BMP-5 sino el efecto de la combinación de todas las proteínas presentes en el secretoma en ese momento. A pesar de las limitaciones del estudio piloto, ya que solo se analizó el secretoma de un único donante, se observan diferencias en los marcadores de diferenciación osteoblástica según el momento de recogida del secretoma debido a que en cada caso su composición es diferente.

5.3.3 Estudio del efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre las MSC

A raíz de los datos obtenidos en el estudio piloto del efecto del secretoma sobre los osteoblastos, se decidió explorar el efecto del secretoma de las membranas L-PRF sobre células madre mesenquimales (MSC). Las MSC son células pluripotentes y pueden diferenciarse a varios tipos celulares dependiendo de las señales que reciban del ambiente, entre ellos, adipocitos, miocitos, condrocitos,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fibroblastos y osteoblastos. Estas células indiferenciadas participan en procesos de regeneración de heridas migrando hacia la zona, estimulando la proliferación y diferenciación de las células progenitoras residentes (203). Además, participan también en procesos de regeneración de fracturas puesto que pueden diferenciarse hacia osteoblastos dando lugar a la formación de hueso nuevo.

Las membranas L-PRF se aplican en el ámbito de la odontología con el fin de favorecer la cicatrización, pero también estimular la regeneración de hueso. Tras los resultados obtenidos en el estudio piloto sobre los osteoblastos, se decidió explorar el potencial del secretoma liberado por las membranas L-PRF en las MSC con el fin de analizar el posible papel osteogénico que el secretoma de estas membranas tiene sobre ese tipo celular.

Debido a que no es solamente una proteína la que tiene efecto sobre las células sino el conjunto de todas ellas, se decidió añadir en este estudio el secretoma atendiendo a la concentración final de secretoma en el cultivo celular. La concentración seleccionada fue de un 3% de secretoma ya que fue la concentración óptima seleccionada para los estudios proliferación celular realizados en fibroblastos. Para comprender si se producía diferenciación osteogénica o no, una condición fue tratar las células con medio osteogénico y otra condición donde no se trataban, de manera que las células siguieran siendo MSC. Los tratamientos con el secretoma recogido a días 3 y 7 de cultivo de membranas L-PRF se añadieron sobre el medio basal para explorar las propiedades de las proteínas presentes en el secretoma sobre la osteogénesis.

Las MSC se cultivaron durante 21 días en presencia de distintos tratamientos y durante ese tiempo se evaluaron varios marcadores en el medio de cultivo recogido a diferentes días durante el proceso de diferenciación (días 2, 7, 14 y 21). Uno de los parámetros analizados fue la enzima citosólica LDH que se libera al medio cuando las células se dañan y por tanto se emplea como marcador de citotoxicidad. Los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

niveles de esta enzima aumentaron de forma significativa en dos momentos del cultivo, días 7 y 21, en las células tratadas con las muestras de secretoma de membranas L-PRF recogidos a días 3 y 7. Este resultado parece indicar que las células tratadas con los secretomas recogidos a distintos tiempos tienden a diferenciarse más que las células tratadas con el medio de diferenciación osteogénica, ya que en el proceso de diferenciación hacia osteocitos, los osteoblastos maduros pueden entrar en apoptosis (196). Precisamente, este proceso juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del hueso, estimándose que entre el 60-80% de los osteoblastos que se encuentran en la zona de reabsorción mueren por apoptosis (204).

En consecuencia, los picos de LDH observados en los dos momentos analizados sugieren que las MSC se están diferenciando hacia osteoblastos y que parte de ellos mueren por apoptosis. Los niveles tan elevados de LDH que se observan a día 21 pueden indicar además un alto grado de glicólisis aerobia que es la fuente predominante de producción de ATP por parte de los osteoblastos maduros (205). Se ha sugerido que los osteoblastos utilizan mayoritariamente esta vía para la producción de energía porque de esta manera se sintetiza menor cantidad de ATP, permitiendo la mineralización osteoblástica que altas concentraciones de esta molécula no permiten (206, 207). Asimismo, otra posible explicación de por qué los osteoblastos utilizan principalmente la glicólisis aeróbica es para generar metabolitos intermedios necesarios para sintetizar proteínas de la matriz que requieren átomos de carbono derivados de esta ruta metabólica (108, 207, 208). Concretamente, algunos investigadores han sugerido que la glicólisis aeróbica está asociada con la liberación activa de citrato, que es esencial para la formación de nanocristales de apatita en hueso (207, 209, 210). Precisamente en las células tratadas con secretoma a día 21 se observó una mayor cantidad de cristales de hidroxiapatita comparadas con las células no tratadas, correlacionando estas observaciones con los altos depósitos de calcio cuantificados en las células lisadas en ese momento.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además de los indicios aportados por estos dos marcadores que sugieren diferenciación osteogénica, también se midieron en el medio de las células proteínas solubles específicas del proceso de diferenciación hacia osteocitos, así como citoquinas y algunos factores de crecimiento.

La fosfatasa alcalina es un marcador específico de diferenciación osteogénica porque solamente lo expresan los osteoblastos, alcanzando su pico en los osteoblastos maduros y disminuyendo sus niveles cuando estos alcanzan el estado de osteocito (197, 211). En nuestro caso las células tratadas con secretoma mostraron una ligera expresión de esta enzima a partir del día 14 de cultivo, sin embargo, los niveles en las células tratadas con el medio de diferenciación osteogénica fueron superiores.

A pesar de que los niveles de fosfatasa alcalina no fueron muy elevados en las células tratadas con secretoma, sí se identificaron niveles superiores de otros marcadores que podrían sugerir diferenciación osteogénica. Este fue el caso de la proteína OPG que aumentó sus niveles con el paso del tiempo en las muestras tratadas con secretoma, superando los producidos por las células tratadas con el medio de diferenciación osteogénica. Esta proteína juega un papel clave en el balance de la homeostasis de hueso, inhibiendo la osteoclastogénesis (211). La citoquina IL-6 se encontró en concentraciones muy elevadas en las células tratadas con las muestras de secretoma en todos los momentos de cultivo analizados (días 2, 7, 14 y 21). A pesar de que en un primer momento podía parecer que los niveles que se cuantificaban en el medio procedían de la propia muestra de secretoma, el aumento de la concentración de IL-6 con el paso del tiempo indicó que las propias células también lo secretaban, habiendo incluso diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con secretoma y las no tratadas. En este contexto, Xie y cols. (212) encontraron que las MSC derivadas de hueso liberan altos niveles de IL-6 y que estos correlacionan positivamente con el potencial osteogénico de estas células. Además, observaron que concentraciones exógenas de esta

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

citoquina también aceleran la diferenciación osteogénica de las propias células (213).

La aplicación exógena de IL-6 no es la única que aumenta el potencial osteogénico, se ha postulado que el factor de crecimiento EGF podría inducir diferenciación osteogénica, especialmente aumentando la mineralización (214). Concretamente, el factor EGF fue encontrado en las muestras de secretoma recogidas a días 3 y 7, aunque en mayor concentración en las muestras recogidas a día 3. La concentración de EGF en el medio de cultivo de las células a día 2 era similar a la de las muestras utilizadas para el tratamiento, indicando que lo cuantificado en el medio a día 2 se debía a la concentración de EGF en el secretoma y no a que este fuera secretado por las células. Además, sabemos que las MSC no liberan este factor porque los niveles en el medio disminuyen con el paso del tiempo, lo que indica que el EGF presente en el secretoma se está uniendo a su correspondiente receptor en las células y está siendo internalizado (215). El efecto inductor de EGF sobre la diferenciación osteogénica se aprecia especialmente en la mineralización (214) y eso es justo lo que se observa a día 21, un aumento de los depósitos de calcio especialmente en las células tratadas con las muestras de secretoma recogido a día 3 que son las que mayores niveles de EGF presentaron.

Todos los marcadores comentados hasta el momento aportan indicios de diferenciación osteogénica por parte de los secretomas de las membranas L-PRF recogidos a distintos tiempos. Sin embargo, se identificaron otros factores en el medio de las células tratadas con secretoma que apuntan en otra dirección.

Los niveles de la proteína DKK1 en el medio de las células tratadas con los secretomas recogidos a ambos días fueron estadísticamente significativos respecto a los niveles de DKK1 de las células no tratadas y esta diferencia aumentó con el paso del tiempo. Esto indica que el tratamiento con el secretoma estimula el aumento de la secreción de la proteína por parte de las MSC, provocando un efecto negativo en la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

diferenciación osteogénica (216). Los altos niveles de secreción de DKK1 por parte de las células podrían estar relacionados con la presencia de citoquinas proinflamatorias en el secretoma, especialmente de TNF-α (217, 218), cuya concentración en las muestras de secretoma recogidas a día 3 fue similar a la detectada en el medio de cultivo de las células tratadas con esas mismas muestras.

Adicionalmente, se detectaron niveles elevados de la proteína MCP-1 tanto en las muestras de secretoma como en el medio de las células tratadas con esas muestras a los distintos días de cultivo. El incremento de la concentración de esta proteína con el paso del tiempo fue el que indicó que esta también era secretada por las células. Por otro lado, el factor VEGF fue secretado por las células a los días más tardíos de cultivo, alcanzando niveles diferenciales significativos entre las células tratadas con las muestras de secretoma recogidas a día 3 y las no tratadas a día 21 de cultivo.

La secreción de ambas proteínas, MCP-1 y VEGF, por parte de las MSC sugiere un efecto potencial de diferenciación hacia células endoteliales, incluyendo procesos de angiogénesis (219, 220).

Por tanto, como ha quedado expuesto anteriormente, los secretomas de las membranas L-PRF recogidos a días 3 y 7 tienen un ligero efecto en la diferenciación osteogénica de las MSC. Sin embargo, la gran variedad de proteínas presentes en el secretoma de las membranas L-PRF podrían tener un impacto en la diferenciación de las MSC hacia otros tipos celulares, por ejemplo, adipocitos, miocitos, condrocitos o fibroblastos.

En cuanto a las limitaciones de este estudio, es importante señalar que no se han analizado marcadores de hueso a nivel de expresión a día 21, lo cual corroboraría si se ha producido diferenciación osteogénica. Además, el análisis de la expresión de ARN nos permitiría obtener más información sobre el proceso de diferenciación de MSC a otros tipos celulares. Por otra parte, cabe resaltar el efecto del secretoma no se ha analizado en un medio de diferenciación osteogénica, quizá hacerlo de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

esa manera hubiera mejorado el proceso de diferenciación osteogénica. Por último, solo se ha empleado una concentración, la de 3%, para evaluar el efecto del secretoma sobre las MSC, puede que otras concentraciones tengan un impacto diferente sobre la diferenciación osteogénica.

En cualquier caso, este estudio abre las puertas para otros posteriores que permitan profundizar más en detalle sobre el efecto biológico y funcional del secretoma de las membranas L-PRF sobre la diferenciación de MSC lo que contribuirá a explicar con mayor precisión el efecto regenerador de estas membranas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6.1 Estudio del contenido de las VEs liberadas por los CP tratados con Mirasol durante el almacenamiento

1. Se han identificado más de 750 proteínas en las VEs liberadas por los CP a distintos tiempos de almacenamiento. Concretamente, la proteína S100A9, marcador de plaquetas jóvenes, solamente se ha encontrado en las VEs liberadas a día 2 y el receptor GPVI, marcador de lesión plaquetaria, solamente se ha identificado en las VEs a día 7, indicando el estado y la viabilidad de las plaquetas durante su conservación.

2. El análisis diferencial revela que la gran mayoría de proteínas identificadas presentan mayor expresión a día 7 de almacenamiento, no estando esto ligado a un aumento en el número de VEs, confirmando el alto grado de estrés e hiperactivación en el que se encuentran las plaquetas a tiempo final de conservación.

3. La elevada expresión de citoquinas proinflamatorias, CCL5 y PF4, a día 7 de almacenamiento podría aumentar la probabilidad de reacciones adversas postransfusionales, pudiendo emplearse la cuantificación de las mismas como parámetro para disminuir el posible riesgo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2 Estudio de caracterización del perfil proteómico del secretoma de las membranas L-PRF

1. Se han identificado más de 700 proteínas liberadas por las membranas L-PRF a día 3 de cultivo entre las que destacan factores de crecimiento, proteínas relacionadas con su transporte entre células y proteínas de respuesta de fase aguda.

2. El análisis del secretoma a distintos tiempos muestra un enriquecimiento de la gran mayoría de las proteínas a día 3.

3. La elevada expresión de proteínas con actividad antimicrobiana y proteínas relacionadas con la activación plaquetaria indican degranulación neutrófila y plaquetaria a día 3. El aumento del factor GDF-15 a día 7 refleja diferenciación de monocitos a macrófagos. El incremento de fibrinógeno y catepsina S, que alcanza sus niveles máximos a día 21, sugiere apoptosis celular. El cambio en la expresión de las proteínas a lo largo del tiempo contribuye al proceso de curación de heridas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3 Estudio de los efectos del secretoma de las membranas L-PRF sobre distintos tipos celulares

1. El secretoma de las membranas L-PRF recogido a distintos tiempos y aplicado a diferentes concentraciones tiene efectos diferenciales sobre la proliferación y migración de fibroblastos, sugiriendo una contribución específica de las proteínas liberadas por las membranas en cada momento sobre la cicatrización de una herida.

2. El efecto de la proteína BMP-5 sobre los osteoblastos está relacionado con la combinación y la concentración del resto de proteínas presentes en el secretoma.

3. La aplicación del secretoma de las membranas L-PRF sobre células madre mesenquimales sugiere diferenciación osteogénica.

4. La gran variedad de proteínas presentes en el secretoma podría contribuir a la diferenciación de las MSC a otros tipos celulares, por ejemplo, adipocitos, miocitos condrocitos o fibroblastos, aumentando el "uso" potencial de estas membranas en otros ámbitos clínicos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6.1 Study of platelet concentrates EVs proteome over storage time

1. More than 750 proteins were identified in the EVs released by platelet concentrates at different storage time points. In particular, the young platelet marker protein S100A9, was only identified in EVs released at day 2. However, the GPVI receptor, marker of platelet lesion, was only identified in EVs released at day 7. The identification of proteins at specific time points indicates platelet state and viability over storage.

2. The quantitative analysis showed an overexpression of the majority of the proteins identified at day 7, not being related to an increase in the EVs number. This finding indicates a great degree of platelet stress and platelet hyper activation at day 7 of storage.

3. The proinflamatory proteins CCL5 and PF4 raised their levels at day 7 of storage increasing the probability of transfusion adverse reactions. The quantitation of these two proteins could be used in the future as a marker to reduce the risk of transfusion adverse reactions.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2 STUDY OF THE CHARACTERIZATION OF THE L-PRF SECRETOME

1. More than 700 proteins were identified at day 3 of L-PRF membranes culture. Proteins related to clathrin-mediated endocytosis, acute phase response and growth factors were among the identifications at day 3.

2. The majority of the proteins identified in the quantitative analysis showed an enrichment in their expression at day 3.

3. The high expression of proteins with bactericidal activity and proteins related to platelet activation at day 3 indicates platelet and neutrophil degranulation at that moment. On the contrary, the expression of growth factor GDF-15 increased at day 7 indicating macrophage differentiation. Lastly, bigger concentrations of cathepsin S and fibrinogen at day 21 suggests blood cells apoptosis. Changes in the secretome of L-PRF membranes over time benefit wound healing process.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3 STUDY OF THE EFFECT OF THE SECRETOME RELEASED BY L-PRF MEMBRANES ON DIFFERENT CELLULAR TYPES

1. Differential effects in fibroblast migration and proliferation were found when the L-PRF membranes secretome was applied at different concentrations and collected at different time points. This result suggests a specific secretome protein contribution on wound healing.

2. The BMP-5 effect on osteoblasts is related to the combination and concentration of the rest of the proteins released by L-PRF membranes.

3. Mesenchymal stem cells treated with L-PRF secretomes show a slight osteogenic differentiation.

4. Proteins released by L-PRF membranes could stimulate mesenchymal stem cells differentiation to adipocytes, myocytes, chondrocytes or fibroblasts, increasing the potential use of these membranes in other clinical scenarios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Izaguirre Ávila R. Propiedades de la sangre. In: Fernández-Tresguerres JAC, Victoria, Cardinali DP, Delpón E, Rey Díaz-Rubio E, Escrich Escriche E, Lahera Juliá V, et al., editors. Fisiología humana. 5 ed.https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2987&sectionid=250780510: McGraw Hill Education Inc; 2020.
2. Dean L. Blood and the cells it contains. In: (US) BMNCfBI, editor. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/2005.
3. Farley A, Hendry C, McLafferty E. Blood components. Nurs Stand. 2012;27(13):35-42.
4. Flores-Rivera OI, Ramírez-Morales K, Meza-Márquez JM, Nava-López JA. Fisiología de la coagulación. Revista Mexicana de Anestesiología. 2014;37:S382-S6.
5. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. Blood. 2004;103(6):2096-104.
6. Do Amaral RJ, Balduino A. Platelets in tissue regeneration. In: Kerrigan S, Moran N, editors. The Non-thrombotic Role of Platelets in Health and Disease. 1: Intech; 2015.
7. Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, Ghahary A. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013;2(5):215-24.
8. Donovan J, Abraham D, Norman J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. Front Biosci (Landmark Ed). 2013;18:106-19.
9. Sahni A, Khorana AA, Baggs RB, Peng H, Francis CW. FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis. Blood. 2006;107(1):126-31.
10. Akita S, Akino K, Hirano A. Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013;2(2):44-9.
11. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. Genome Biol. 2005;6(2):209.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

12. Min JK, Lee YM, Kim JH, Kim YM, Kim SW, Lee SY, et al. Hepatocyte growth factor suppresses vascular endothelial growth factor-induced expression of endothelial ICAM-1 and VCAM-1 by inhibiting the nuclear factor-kappaB pathway. Circ Res. 2005;96(3):300-7.
13. Krafts KP. Tissue repair: The hidden drama. Organogenesis. 2010;6(4):225-33.
14. Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. Platelets. 2018;29(6):556-68.
15. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. Int J Mol Sci. 2020;21(20).
16. Toche P. Visión panorámica del sistema inmune. Revista Médica Clínica Las Condes. 2012;23(4):446-57.
17. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. Microbiol Mol Biol Rev. 2018;82(1).
18. de Bont CM, Boelens WC, Pruijn GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. Cell Mol Immunol. 2019;16(1):19-27.
19. Camicia G, de Larrañaga G. [Neutrophil extracellular traps: a 2-faced host defense mechanism]. Med Clin (Barc). 2013;140(2):70-5.
20. Scheuerer B, Ernst M, Dürrbaum-Landmann I, Fleischer J, Grage-Griebenow E, Brandt E, et al. The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. Blood. 2000;95(4):1158-66.
21. Contreras A. DM, Martínez V. MC. Medicina transfusional en el siglo XXI. Revista Médica Clínica Las Condes. 2015;26(6):726-43.
22. Zamudio-Godínez L. Reacciones Transfusionales. Gaceta Médica de México. 2003;139(3):S173-5.
23. Barbolla L, Contreras E. Efectos adversos de la transfusión de componentes sanguíneos. Generalidades: Reacciones agudas inmediatas y retardadas. In: Barbolla LC, Enric, Pujol MdM, editors. Manual Práctico de Medicina Transfusional. Madrid: Acción Médica; 2002. p. 145-81.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

24. Vázquez JA, Vasallo E, Storino MA. Reacciones transfusionales. Revista de la facultad de medicina. 2002;25(2):154-62.
25. Yomtovian R, Kline W, Press C, Clay M, Engman H, Hammerschmidt D, et al. Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of a neutrophil-specific antibody. Lancet. 1984;1(8371):244-6.
26. Silliman CC, Paterson AJ, Dickey WO, Stroneck DF, Popovsky MA, Caldwell SA, et al. The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. Transfusion. 1997;37(7):719-26.
27. Ortiz P, Mingo A, Lozano M, Vesga MA, Grifols JR, Castrillo A, et al. [Guide for transfusion of blood components]. Med Clin (Barc). 2005;125(10):389-96.
28. Arbona Castaño C, Bautista-Gili AM, Castellà Cahiz MD, Castrillo Fernández A, Fernández Álvarez C, Fernández Herrera MD, et al. Guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos y sus derivados plasmáticos. 5ª ed. Celular SEdTSyT, editor2015.
29. Lozano ML, Rivera J, Vicente V. [Platelet concentrates from whole-blood donations (buffy-coat) or apheresis: which one to use?]. Med Clin (Barc). 2012;138(12):528-33.
30. Fernández Muñoz H. Obtención y Uso de Concentrados de Plaquetas:Perspectiva Actual: Universidad de Murcia; 2018.
31. Marschner S, Dimberg LY. Phatogen reduction technologies. In: Shaz BH, Hillyer CD, Reyes Gil M, editors. Transfusion Medicine and Hemostasis. 3º ed: Elsevier; 2019. p. 289-93.
32. Feys HB, Van Aelst B, Compernolle V. Biomolecular Consequences of Platelet Pathogen Inactivation Methods. Transfus Med Rev. 2019;33(1):29-34.
33. Lachert E. Pathogen inactivation method using ultraviolet C light. Journal of Transfusion Medicine. 2019;12(3):83-7.
34. Prowse CV. Component pathogen inactivation: a critical review. Vox Sang. 2013;104(3):183-99.
35. Barbolla L, Pujol MdM. Posibles modificaciones de los componentes sanguíneos. In: Barbolla L, Contreras E, Pujol MdM, editors. Manual Práctico de Medicina Transfusional. Madrid: Acción Médica; 2002. p. 59-70.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

36. Adams F, Bellairs G, Bird AR, Oguntibeju OO. Biochemical storage lesions occurring in nonirradiated and irradiated red blood cells: a brief review. Biomed Res Int. 2015;2015:968302.
37. Vani R, Soumya R, Manasa K, Carl H. Storage lesions in blood components. Oxidants and Antioxidants in Medical Science. 2015;4(3):125-32.
38. Mittal K, Kaur R. Platelet storage lesion: An update. Asian J Transfus Sci. 2015;9(1):1-3.
39. Ng MSY, Tung JP, Fraser JF. Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? Transfus Med Rev. 2018.
40. D'Amici GM, Rinalducci S, Zolla L. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. J Proteome Res. 2007;6(8):3242-55.
41. Rinalducci S, Ferru E, Blasi B, Turrini F, Zolla L. Oxidative stress and caspase-mediated fragmentation of cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 during blood storage. Blood Transfus. 2012;10 Suppl 2:s55-62.
42. D'Alessandro A, Dzieciatkowska M, Hill RC, Hansen KC. Supernatant protein biomarkers of red blood cell storage hemolysis as determined through an absolute quantification proteomics technology. Transfusion. 2016;56(6):1329-39.
43. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell concentrates: from metabolism to proteomics. Haematologica. 2012;97(1):107-15.
44. Schubert P, Culibrk B, Coupland D, Scammell K, Gyongyossy-Issa M, Devine DV. Riboflavin and ultraviolet light treatment potentiates vasodilator-stimulated phosphoprotein Ser-239 phosphorylation in platelet concentrates during storage. Transfusion. 2012;52(2):397-408.
45. Hechler B, Ohlmann P, Chafey P, Ravanat C, Eckly A, Maurer E, et al. Preserved functional and biochemical characteristics of platelet components prepared with amotosalen and ultraviolet A for pathogen inactivation. Transfusion. 2013;53(6):1187-200.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

46. Prudent M, Crettaz D, Delobel J, Tissot JD, Lion N. Proteomic analysis of Intercept-treated platelets. J Proteomics. 2012;76 Spec No.:316-28.
47. Kaisar M, van Dullemen LFA, Thézénas ML, Zeeshan Akhtar M, Huang H, Rendel S, et al. Plasma degradome affected by variable storage of human blood. Clin Proteomics. 2016;13:26.
48. Glenister KM, Payne KA, Sparrow RL. Proteomic analysis of supernatant from pooled buffy-coat platelet concentrates throughout 7-day storage. Transfusion. 2008;48(1):99-107.
49. Thiele T, Iuga C, Janetzky S, Schwertz H, Gesell Salazar M, Fürll B, et al. Early storage lesions in apheresis platelets are induced by the activation of the integrin αIIbβ3 and focal adhesion signaling pathways. J Proteomics. 2012;76 Spec No.:297-315.
50. Thiele T, Sablewski A, Iuga C, Bakchoul T, Bente A, Görg S, et al. Profiling alterations in platelets induced by Amotosalen/UVA pathogen reduction and gamma irradiation--a LC-ESI-MS/MS-based proteomics approach. Blood Transfus. 2012;10 Suppl 2:s63-70.
51. Salunkhe V, De Cuyper IM, Papadopoulos P, van der Meer PF, Daal BB, Villa-Fajardo M, et al. A comprehensive proteomics study on platelet concentrates: Platelet proteome, storage time and Mirasol pathogen reduction technology. Platelets. 2018:1-12.
52. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. Curr Opin Cell Biol. 2009;21(4):575-81.
53. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. Blood. 1999;94(11):3791-9.
54. Aatonen MT, Ohman T, Nyman TA, Laitinen S, Grönholm M, Siljander PR. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. J Extracell Vesicles. 2014;3.
55. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell Vesicles. 2018;7(1):1535750.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

56. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. J Thromb Haemost. 2014;12(5):614-27.
57. Barrachina MN, Calderón-Cruz B, Fernandez-Rocca L, García Á. Application of Extracellular Vesicles Proteomics to Cardiovascular Disease: Guidelines, Data Analysis, and Future Perspectives. Proteomics. 2019;19(1-2):e1800247.
58. Chen Z, Schubert P, Bakkour S, Culibrk B, Busch MP, Devine DV. p38 mitogen-activated protein kinase regulates mitochondrial function and microvesicle release in riboflavin- and ultraviolet light-treated apheresis platelet concentrates. Transfusion. 2017;57(5):1199-207.
59. Eker İ, Yılmaz S, Çetinkaya RA, Pekel A, Ünlü A, Gürsel O, et al. Generation of Platelet Microparticles after Cryopreservation of Apheresis Platelet Concentrates Contributes to Hemostatic Activity. Turk J Haematol. 2017;34(1):64-71.
60. Marcoux G, Duchez AC, Rousseau M, Lévesque T, Boudreau LH, Thibault L, et al. Microparticle and mitochondrial release during extended storage of different types of platelet concentrates. Platelets. 2017;28(3):272-80.
61. Noulsri E, Udomwinijsilp P, Lerdwana S, Chongkolwatana V, Permpikul P. Differences in levels of platelet-derived microparticles in platelet components prepared using the platelet rich plasma, buffy coat, and apheresis procedures. Transfus Apher Sci. 2017;56(2):135-40.
62. Ghasemzadeh M, Hosseini E, Roudsari ZO, Zadkhak P. Intraplatelet reactive oxygen species (ROS) correlate with the shedding of adhesive receptors, microvesiculation and platelet adhesion to collagen during storage: Does endogenous ROS generation downregulate platelet adhesive function? Thromb Res. 2018;163:153-61.
63. Oikawa S, Minegishi M, Endo K, Kawashima W, Kosunago S, Oyama M, et al. Impact of the platelet washing process on in vitro platelet properties, and the levels of soluble CD40 ligand and platelet-derived microparticles in the storage media. Transfusion. 2019;59(3):1080-9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

64. Valkonen S, Mallas B, Impola U, Valkeajärvi A, Eronen J, Javela K, et al. Assessment of Time-Dependent Platelet Activation Using Extracellular Vesicles, CD62P Exposure, and Soluble Glycoprotein V Content of Platelet Concentrates with Two Different Platelet Additive Solutions. Transfus Med Hemother. 2019;46(4):267-75.
65. Veale MF, Healey G, Sparrow RL. Effect of additive solutions on red blood cell (RBC) membrane properties of stored RBCs prepared from whole blood held for 24 hours at room temperature. Transfusion. 2011;51 Suppl 1:25S-33S.
66. Almizraq R, Tchir JD, Holovati JL, Acker JP. Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality. Transfusion. 2013;53(10):2258-67.
67. Grisendi G, Finetti E, Manganaro D, Cordova N, Montagnani G, Spano C, et al. Detection of microparticles from human red blood cells by multiparametric flow cytometry. Blood Transfus. 2015;13(2):274-80.
68. Cho CH, Yun SG, Koh YE, Lim CS. Effect of Irradiation on Microparticles in Red Blood Cell Concentrates. Ann Lab Med. 2016;36(4):362-6.
69. Almizraq RJ, Seghatchian J, Holovati JL, Acker JP. Extracellular vesicle characteristics in stored red blood cell concentrates are influenced by the method of detection. Transfus Apher Sci. 2017;56(2):254-60.
70. Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. Vox Sang. 2008;95(4):288-97.
71. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. Transfusion. 2008;48(9):1943-53.
72. Laurén E, Tigistu-Sahle F, Valkonen S, Westberg M, Valkeajärvi A, Eronen J, et al. Phospholipid composition of packed red blood cells and that of extracellular vesicles show a high resemblance and stability during storage. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2018;1863(1):1-8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

73. Solheim BG, Flesland O, Seghatchian J, Brosstad F. Clinical implications of red blood cell and platelet storage lesions: an overview. Transfus Apher Sci. 2004;31(3):185-9.
74. Wither M, Dzieciatkowska M, Nemkov T, Strop P, D'Alessandro A, Hansen KC. Hemoglobin oxidation at functional amino acid residues during routine storage of red blood cells. Transfusion. 2016;56(2):421-6.
75. Fischer D, Büssow J, Meybohm P, Weber CF, Zacharowski K, Urbschat A, et al. Microparticles from stored red blood cells enhance procoagulant and proinflammatory activity. Transfusion. 2017;57(11):2701-11.
76. Waters L, Padula MP, Marks DC, Johnson L. Cryopreserved platelets demonstrate reduced activation responses and impaired signaling after agonist stimulation. Transfusion. 2017;57(12):2845-57.
77. Almizraq RJ, Norris PJ, Inglis H, Menocha S, Wirtz MR, Juffermans N, et al. Blood manufacturing methods affect red blood cell product characteristics and immunomodulatory activity. Blood Adv. 2018;2(18):2296-306.
78. Canellini G, Rubin O, Delobel J, Crettaz D, Lion N, Tissot JD. Red blood cell microparticles and blood group antigens: an analysis by flow cytometry. Blood Transfus. 2012;10 Suppl 2:s39-45.
79. Pienimaeki-Roemer A, Kuhlmann K, Böttcher A, Konovalova T, Black A, Orsó E, et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. Transfusion. 2015;55(3):507-21.
80. Monteiro MC, O´Connor JE, Martínez M. La Citometría de Flujo en el Análisis de las Plaquetas: (I) Aspectos Estructurales y Funcionales de las Plaquetas. Revista de Diagnóstico Biológico. 2001;50(3):111-36.
81. Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. Annu Rev Med. 1979;30:119-34.
82. Siegel A, Lüscher EF. Non-identity of the alpha-granules of human blood platelets with typical lysosomes. Nature. 1967;215(5102):745-7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

83. Estado BOd. Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. 16 de septiembre de 2006.
84. Sanitarios AEdMyP. Informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas 2013. p. 1-5.
85. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. Muscles Ligaments Tendons J. 2014;4(1):3-9.
86. Glazer JL. An approach to the diagnosis and treatment of plantar fasciitis. Phys Sportsmed. 2009;37(2):74-9.
87. Peerbooms JC, Sluimer J, Bruijn DJ, Gosens T. Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet-rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year follow-up. Am J Sports Med. 2010;38(2):255-62.
88. Alcaraz-Rubio J, Oliver-Iguacel A, Sánchez-López JM. Plasma rico en factores de crecimiento plaquetario. Una nueva puerta a la Medicina regenerativa. Revista de Hematología Mexicana. 2015;16:128-42.
89. Varghese MP, Manuel S, Kumar L K S. Potential for Osseous Regeneration of Platelet-Rich Fibrin-A Comparative Study in Mandibular Third Molar Impaction Sockets. J Oral Maxillofac Surg. 2017;75(7):1322-9.
90. Forni F, Marzagalli M, Tesei P, Grassi A. Platelet gel: applications in dental regenerative surgery. Blood Transfus. 2013;11(1):102-7.
91. Scala M, Gipponi M, Mereu P, Strada P, Corvò R, Muraglia A, et al. Regeneration of mandibular osteoradionecrosis defect with platelet rich plasma gel. In Vivo. 2010;24(6):889-93.
92. Anitua E, Murias-Freijo A, Alkhraisat MH, Orive G. Clinical, radiographical, and histological outcomes of plasma rich in growth

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

factors in extraction socket: a randomized controlled clinical trial. Clin Oral Investig. 2015;19(3):589-600.
93. Marenzi G, Riccitiello F, Tia M, di Lauro A, Sammartino G. Influence of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) in the Healing of Simple Postextraction Sockets: A Split-Mouth Study. Biomed Res Int. 2015;2015:369273.
94. Bajaj P, Pradeep AR, Agarwal E, Rao NS, Naik SB, Priyanka N, et al. Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. J Periodontal Res. 2013;48(5):573-81.
95. Daif ET. Effect of autologous platelet-rich plasma on bone regeneration in mandibular fractures. Dent Traumatol. 2013;29(5):399-403.
96. Villela DL, Santos VL. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review. Growth Factors. 2010;28(2):111-6.
97. Dougherty EJ. An evidence-based model comparing the cost-effectiveness of platelet-rich plasma gel to alternative therapies for patients with nonhealing diabetic foot ulcers. Adv Skin Wound Care. 2008;21(12):568-75.
98. Alio JL, Abad M, Artola A, Rodriguez-Prats JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. Ophthalmology. 2007;114(7):1286-93.e1.
99. Ortuño-Prados VJ, Alio JL. Tratamiento de úlcera corneal neurotrófica con plasma rico en plaquetas y Tutopatch®. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. 2011(4):121-3.
100. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. Clin Oral Investig. 2016;20(9):2353-60.
101. Castro AB, Cortellini S, Temmerman A, Li X, Pinto N, Teughels W, et al. Characterization of the Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin Block: Release of Growth Factors, Cellular Content, and Structure. Int J Oral Maxillofac Implants. 2019;34(4):855–64.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

102. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. Clin Orthop Relat Res. 2015;473(5):1635-43.
103. Xiong G, Lingampalli N, Koltsov JCB, Leung LL, Bhutani N, Robinson WH, et al. Men and Women Differ in the Biochemical Composition of Platelet-Rich Plasma. Am J Sports Med. 2018;46(2):409-19.
104. Anitua E, Prado R, Azkargorta M, Rodriguez-Suárez E, Iloro I, Casado-Vela J, et al. High-throughput proteomic characterization of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret)-derived fibrin clot interactome. J Tissue Eng Regen Med. 2015;9(11):E1-12.
105. Yaprak E, Kasap M, Akpinar G, Islek EE, Sinanoglu A. Abundant proteins in platelet-rich fibrin and their potential contribution to wound healing: An explorative proteomics study and review of the literature. J Dent Sci. 2018;13(4):386-95.
106. Ząbczyk M, Stachowicz A, Natorska J, Olszanecki R, Wiśniewski JR, Undas A. Plasma fibrin clot proteomics in healthy subjects: Relation to clot permeability and lysis time. J Proteomics. 2019;208:103487.
107. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. Blood Rev. 2009;23(4):177-89.
108. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science. 2009;324(5930):1029-33.
109. Guarín-Corredor C, Paola Quiroga-Santamaría P, Landínez-Parra NS. Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. Rev Fac Med. 2013;6(4):441-8.
110. Senet P. Fisiología de la cicatrización cutánea. EMC - Dermatología. 2008;42(1):1-10.
111. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. Clin Plast Surg. 1998;25(3):321-40.
112. Clark RA. Biology of dermal wound repair. Dermatol Clin. 1993;11(4):647-66.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

113. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. Cellular biology of fracture healing. J Orthop Res. 2019;37(1):35-50.
114. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-7.
115. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. J Bone Miner Res. 2009;24(2):274-82.
116. Hu DP, Ferro F, Yang F, Taylor AJ, Chang W, Miclau T, et al. Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. Development. 2017;144(2):221-34.
117. Feng X. RANKing intracellular signaling in osteoclasts. IUBMB Life. 2005;57(6):389-95.
118. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. Tissue Eng Part C Methods. 2009;15(3):431-5.
119. Anitua E, Sánchez M, Zalduendo MM, de la Fuente M, Prado R, Orive G, et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. Cell Prolif. 2009;42(2):162-70.
120. Tavassoli-Hojjati S, Sattari M, Ghasemi T, Ahmadi R, Mashayekhi A. Effect of platelet-rich plasma concentrations on the proliferation of periodontal cells: An. Eur J Dent. 2016;10(4):469-74.
121. Hsu CW, Yuan K, Tseng CC. The negative effect of platelet-rich plasma on the growth of human cells is associated with secreted thrombospondin-1. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(2):185-92.
122. Kushida S, Kakudo N, Suzuki K, Kusumoto K. Effects of platelet-rich plasma on proliferation and myofibroblastic differentiation in human dermal fibroblasts. Ann Plast Surg. 2013;71(2):219-24.
123. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. Clin Oral Implants Res. 2006;17(2):212-9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

124. Nguyen PA, Pham TAV. Effects of platelet-rich plasma on human gingival fibroblast proliferation and migration in vitro. J Appl Oral Sci. 2018;26:e20180077.
125. Steller D, Herbst N, Pries R, Juhl D, Hakim SG. Positive impact of Platelet-rich plasma and Platelet-rich fibrin on viability, migration and proliferation of osteoblasts and fibroblasts treated with zoledronic acid. Sci Rep. 2019;9(1):8310.
126. Giusti I, D'Ascenzo S, Mancò A, Di Stefano G, Di Francesco M, Rughetti A, et al. Platelet concentration in platelet-rich plasma affects tenocyte behavior in vitro. Biomed Res Int. 2014;2014:630870.
127. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. Plast Reconstr Surg. 2008;122(5):1352-60.
128. Hara T, Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Lai F, Kusumoto K. Platelet-rich plasma stimulates human dermal fibroblast proliferation via a Ras-dependent extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. J Artif Organs. 2016;19(4):372-7.
129. Ferreira CF, Carriel Gomes MC, Filho JS, Granjeiro JM, Oliveira Simões CM, Magini ReS. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. Clin Oral Implants Res. 2005;16(4):456-60.
130. Slapnicka J, Fassmann A, Strasak L, Augustin P, Vanek J. Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. J Oral Maxillofac Surg. 2008;66(2):297-301.
131. Celotti F, Colciago A, Negri-Cesi P, Pravettoni A, Zaninetti R, Sacchi MC. Effect of platelet-rich plasma on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts: role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. Wound Repair Regen. 2006;14(2):195-202.
132. Creeper F, Lichanska AM, Marshall RI, Seymour GJ, Ivanovski S. The effect of platelet-rich plasma on osteoblast and periodontal ligament cell migration, proliferation and differentiation. J Periodontal Res. 2009;44(2):258-65.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

133. Herrera BS, Coimbra LS, Bastos AS, Teixeira SA, Steffens JP, Muscara MN, et al. Platelet-rich plasma stimulates cytokine expression and alkaline phosphatase activity in osteoblast-derived osteosarcoma cells. Arch Oral Biol. 2012;57(9):1282-9.
134. Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. J Oral Maxillofac Surg. 2005;63(3):362-9.
135. Zhang Y, Xing F, Luo R, Duan X. Platelet-Rich Plasma for Bone Fracture Treatment: A Systematic Review of Current Evidence in Preclinical and Clinical Studies. Front Med (Lausanne). 2021;8:676033.
136. Chieregato K, Castegnaro S, Madeo D, Astori G, Pegoraro M, Rodeghiero F. Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. Cytotherapy. 2011;13(8):933-43.
137. Hemeda H, Kalz J, Walenda G, Lohmann M, Wagner W. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. Cytotherapy. 2013;15(9):1174-81.
138. Zhu Y, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, et al. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. Osteoarthritis Cartilage. 2013;21(11):1627-37.
139. Vogel JP, Szalay K, Geiger F, Kramer M, Richter W, Kasten P. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. Platelets. 2006;17(7):462-9.
140. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. Arthroscopy. 2012;28(7):998-1009.
141. Liebig BE, Kisiday JD, Bahney CS, Ehrhart NP, Goodrich LR. The platelet-rich plasma and mesenchymal stem cell milieu: A review of therapeutic effects on bone healing. J Orthop Res. 2020;38(12):2539-50.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

142. García A. Two-dimensional gel electrophoresis in platelet proteomics research. Methods Mol Med. 2007;139:339-53.
143. Ramacciotti E, Hawley AE, Wrobleski SK, Myers DD, Strahler JR, Andrews PC, et al. Proteomics of microparticles after deep venous thrombosis. Thromb Res. 2010;125(6):e269-74.
144. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? J Thromb Haemost. 2009;7(1):190-7.
145. Cointe S, Judicone C, Robert S, Mooberry MJ, Poncelet P, Wauben M, et al. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. J Thromb Haemost. 2017;15(1):187-93.
146. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem. 1996;68(5):850-8.
147. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63.
148. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986;89(2):271-7.
149. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J Immunol Methods. 1988;115(1):61-9.
150. Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. Bioinformatics. 2014;30(4):523-30.
151. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D607-D13.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

152. Fabregat A, Sidiropoulos K, Viteri G, Forner O, Marin-Garcia P, Arnau V, et al. Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach. BMC Bioinformatics. 2017;18(1):142.
153. Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, Gangoda L, Quek CY, Williamson NA, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. Proteomics. 2015;15(15):2597-601.
154. Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D516-D9.
155. Monsuur HN, Boink MA, Weijers EM, Roffel S, Breetveld M, Gefen A, et al. Methods to study differences in cell mobility during skin wound healing in vitro. J Biomech. 2016;49(8):1381-7.
156. Vit G, Klüter H, Wuchter P. Platelet storage and functional integrity. Journal of Laboratory Medicine. 2020;44:285-93.
157. Mohr H, Steil L, Gravemann U, Thiele T, Hammer E, Greinacher A, et al. A novel approach to pathogen reduction in platelet concentrates using short-wave ultraviolet light. Transfusion. 2009;49(12):2612-24.
158. Marrocco C, D'Alessandro A, Girelli G, Zolla L. Proteomic analysis of platelets treated with gamma irradiation versus a commercial photochemical pathogen reduction technology. Transfusion. 2013;53(8):1808-20.
159. Schubert P, Culibrk B, Karwal S, Goodrich RP, Devine DV. Protein translation occurs in platelet concentrates despite riboflavin/UV light pathogen inactivation treatment. Proteomics Clin Appl. 2016;10(8):839-50.
160. Stivala S, Gobbato S, Infanti L, Reiner MF, Bonetti N, Meyer SC, et al. Amotosalen/ultraviolet A pathogen inactivation technology reduces platelet activatability, induces apoptosis and accelerates clearance. Haematologica. 2017;102(10):1650-60.
161. Rijkers M, van den Eshof BL, van der Meer PF, van Alphen FPJ, de Korte D, Leebeek FWG, et al. Monitoring storage induced changes in the platelet proteome employing label free quantitative mass spectrometry. Sci Rep. 2017;7(1):11045.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

162. Shai E, Rosa I, Parguiña AF, Motahedeh S, Varon D, García Á. Comparative analysis of platelet-derived microparticles reveals differences in their amount and proteome depending on the platelet stimulus. J Proteomics. 2012;76 Spec No.:287-96.
163. Kasprzyk J, Stępień E, Piekoszewski W. Application of nano-LC-MALDI-TOF/TOF-MS for proteomic analysis of microvesicles. Clin Biochem. 2017;50(4-5):241-3.
164. Barrachina MN, Sueiro AM, Casas V, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Guitián E, et al. A Combination of Proteomic Approaches Identifies A Panel of Circulating Extracellular Vesicle Proteins Related to the Risk of Suffering Cardiovascular Disease in Obese Patients. Proteomics. 2019;19(1-2):e1800248.
165. Hosseini E, Beshkar P, Ghasemzadeh M. Reverse correlations of collagen-dependent platelet aggregation and adhesion with GPVI shedding during storage. J Thromb Thrombolysis. 2018.
166. Chen Y, Zhong H, Zhao Y, Luo X, Gao W. Role of platelet biomarkers in inflammatory response. Biomark Res. 2020;8:28.
167. Hirayama F. Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment. Br J Haematol. 2013;160(4):434-44.
168. Wakamoto S, Fujihara M, Kuzuma K, Sato S, Kato T, Naohara T, et al. Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. Transfusion. 2003;43(8):1038-46.
169. Hernández-García S, Meneses M, Calderón-Salinas J-V. Producción y función de especies reactivas de oxígeno en plaquetas. Revista de Educación Bioquímica. 2020;39(2):52-60.
170. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood Rev. 2007;21(3):157-71.
171. Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. FEBS Lett. 2006;580(22):5313-20.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

172. Toth B, Nikolajek K, Rank A, Nieuwland R, Lohse P, Pihusch V, et al. Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles. Platelets. 2007;18(7):515-21.
173. Nielsen MH, Beck-Nielsen H, Andersen MN, Handberg A. A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. J Extracell Vesicles. 2014;3.
174. Delos Santos RC, Bautista S, Lucarelli S, Bone LN, Dayam RM, Abousawan J, et al. Selective regulation of clathrin-mediated epidermal growth factor receptor signaling and endocytosis by phospholipase C and calcium. Mol Biol Cell. 2017;28(21):2802-18.
175. Jastrzębski K, Zdżalik-Bielecka D, Mamińska A, Kalaidzidis Y, Hellberg C, Miaczynska M. Multiple routes of endocytic internalization of PDGFRβ contribute to PDGF-induced STAT3 signaling. J Cell Sci. 2017;130(3):577-89.
176. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;101(3):e45-50.
177. Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, Araújo RF, Vasconcelos RC, Cavalcante RS, et al. Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. Clin Oral Investig. 2019;23(3):1309-18.
178. Kardos D, Simon M, Vácz G, Hinsenkamp A, Holczer T, Cseh D, et al. The Composition of Hyperacute Serum and Platelet-Rich Plasma Is Markedly Different despite the Similar Production Method. Int J Mol Sci. 2019;20(3).
179. Conus S, Perozzo R, Reinheckel T, Peters C, Scapozza L, Yousefi S, et al. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. J Exp Med. 2008;205(3):685-98.
180. Chaudhry R, Babiker HM. Physiology, Coagulation Pathways. StatPearls; 2019.
181. Rybarczyk BJ, Lawrence SO, Simpson-Haidaris PJ. Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. Blood. 2003;102(12):4035-43.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

182. Douglas SA, Lamothe SE, Singleton TS, Averett RD, Platt MO. Human cathepsins K, L, and S: Related proteases, but unique fibrinolytic activity. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2018;1862(9):1925-32.
183. Whisler JA, Chen MB, Kamm RD. Control of perfusable microvascular network morphology using a multiculture microfluidic system. Tissue Eng Part C Methods. 2014;20(7):543-52.
184. Memmert S, Nokhbehsaim M, Damanaki A, Nogueira AVB, Papadopoulou AK, Piperi C, et al. Role of cathepsin S In periodontal wound healing-an in vitro study on human PDL cells. BMC Oral Health. 2018;18(1):60.
185. Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. Front Cell Dev Biol. 2019;7:107.
186. Han J, Meng HX, Tang JM, Li SL, Tang Y, Chen ZB. The effect of different platelet-rich plasma concentrations on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. Cell Prolif. 2007;40(2):241-52.
187. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. PLoS One. 2014;9(8):e104662.
188. Brecher ME, Hay S, Corash L, Hsu J, Lin L. Evaluation of bacterial inactivation in prestorage pooled, leukoreduced, whole blood-derived platelet concentrates suspended in plasma prepared with photochemical treatment. Transfusion. 2007;47(10):1896-901.
189. Kawada M, Ishizuka M, Takeuchi T. Enhancement of antiproliferative effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on human prostate cancer LNCaP cells by coculture with normal fibroblasts through secreted interleukin-6. Jpn J Cancer Res. 1999;90(5):546-54.
190. Dayan S, Stashenko P, Niederman R, Kupper TS. Oral epithelial overexpression of IL-1alpha causes periodontal disease. J Dent Res. 2004;83(10):786-90.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

191. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 2006;21(4):256-60.
192. Eley BM, Cox SW. Advances in periodontal diagnosis. 7. Proteolytic and hydrolytic enzymes link with periodontitis. Br Dent J. 1998;184(7):323-8.
193. Tsai JY, Lee MJ, Chang MD, Wang HC, Lin CC, Huang H. Effects of novel human cathepsin S inhibitors on cell migration in human cancer cells. J Enzyme Inhib Med Chem. 2014;29(4):538-46.
194. Brown LF, Lanir N, McDonagh J, Tognazzi K, Dvorak AM, Dvorak HF. Fibroblast migration in fibrin gel matrices. Am J Pathol. 1993;142(1):273-83.
195. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. ANZ J Surg. 2007;77(8):626-31.
196. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Biomed Res Int. 2015;2015:421746.
197. Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. J Dent Res. 2012;91(8):736-44.
198. Wutzl A, Rauner M, Seemann R, Millesi W, Krepler P, Pietschmann P, et al. Bone morphogenetic proteins 2, 5, and 6 in combination stimulate osteoblasts but not osteoclasts in vitro. J Orthop Res. 2010;28(11):1431-9.
199. Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE, Hamilton JA. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. Osteoarthritis Cartilage. 2009;17(6):735-42.
200. Kuroki T, Shingu M, Koshihara Y, Nobunaga M. Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells. Br J Rheumatol. 1994;33(3):224-30.
201. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. Cells. 2020;9(9).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

202. Kitaura H, Marahleh A, Ohori F, Noguchi T, Shen WR, Qi J, et al. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. Int J Mol Sci. 2020;21(14).
203. Hu MS, Borrelli MR, Lorenz HP, Longaker MT, Wan DC. Mesenchymal Stromal Cells and Cutaneous Wound Healing: A Comprehensive Review of the Background, Role, and Therapeutic Potential. Stem Cells Int. 2018;2018:6901983.
204. Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, et al. Overexpression of Bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. PLoS One. 2011;6(11):e27487.
205. Lee WC, Ji X, Nissim I, Long F. Malic Enzyme Couples Mitochondria with Aerobic Glycolysis in Osteoblasts. Cell Rep. 2020;32(10):108108.
206. Jones SJ, Gray C, Boyde A, Burnstock G. Purinergic transmitters inhibit bone formation by cultured osteoblasts. Bone. 1997;21(5):393-9.
207. Donat A, Knapstein PR, Jiang S, Baranowsky A, Ballhause TM, Frosch KH, et al. Glucose Metabolism in Osteoblasts in Healthy and Pathophysiological Conditions. Int J Mol Sci. 2021;22(8).
208. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell. 2008;134(5):703-7.
209. Franklin RB, Chellaiah M, Zou J, Reynolds MA, Costello LC. Evidence that Osteoblasts are Specialized Citrate-producing Cells that Provide the Citrate for Incorporation into the Structure of Bone. Open Bone J. 2014;6:1-7.
210. Dickens F. The citric acid content of animal tissues, with reference to its occurrence in bone and tumour. Biochem J. 1941;35(8-9):1011-23.
211. Amarasekara DS, Kim S, Rho J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. Int J Mol Sci. 2021;22(6).
212. Xie Z, Tang S, Ye G, Wang P, Li J, Liu W, et al. Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 2018;9(1):13.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

213. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997;15:323-50.
214. Del Angel-Mosqueda C, Gutiérrez-Puente Y, López-Lozano AP, Romero-Zavaleta RE, Mendiola-Jiménez A, Medina-De la Garza CE, et al. Epidermal growth factor enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. Head Face Med. 2015;11:29.
215. Clark AJ, Ishii S, Richert N, Merlino GT, Pastan I. Epidermal growth factor regulates the expression of its own receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82(24):8374-8.
216. Motovska Z, Vichova T, Doktorova M, Labos M, Maly M, Widimsky P. Serum Dickkopf-1 signaling and calcium deposition in aortic valve are significantly related to the presence of concomitant coronary atherosclerosis in patients with symptomatic calcified aortic stenosis. J Transl Med. 2015;13:63.
217. Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, et al. CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNFα. Cell Stem Cell. 2012;11(6):812-24.
218. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. Blood. 2009;113(3):517-25.
219. Ge Q, Zhang H, Hou J, Wan L, Cheng W, Wang X, et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms. Mol Med Rep. 2018;17(1):1667-75.
220. Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. PLoS One. 2012;7(4):e35685.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO I. LISTADO DE MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Anexo I.I Listado del material utilizado en la presente tesis doctoral

Material	Referencia	Casa Comercial
Tubos	IntraSpin 455385	Intra-Lock
Cubetas espectrofotómetro	634-0676	VWR
Navecillas de pesaje	611-9182 611-1996	VWR
Placas de pocillos	Nunc MaxiSorp™ 442404	Invitrogen (ThermoFisher)
Tubos ultracentrífuga	Ultra-Clear™ 344057	Beckman Coulter
Geles poliacrilamida 4-12%	Novex® NP0321	Invitrogen (ThermoFisher)
Cassettes vacíos para geles	Novex® NC2010	Invitrogen (ThermoFisher)
Bandeja de rehidratación	Immobiline DryStrip Reswelling Tray	GE Healthcare
Membranas PVDF	Immobilon™ IPVH00010	Merck
Papel de filtro transferencia	Amersham™ Hybond® RPN6101M	GE Healthcare
Películas revelado	Amersham™ Hybond® 906835	GE Healthcare
Filtros 15 kDa	Amicon™ UFC900324	Millipore
Hoja de bisturí	Nº15	Jai Surgicals
Microtubos	0030120086 0030120094 0030121112 0030119401 0030108116	Eppendorf
Puntas de pipeta	Ep T.I.P.S.® 0030000919	Eppendorf
	53509-015	VWR
	Axygen® 301-03-051 301-02-301	Corning

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tubos de centrífuga	525-0400 525-0402	VWR
Placas de cultivo	353047 353046 353072	Falcon
Placas cultivo	153548	Cultek (Corning)
Placas cultivo 100 mm	430167	Corning

Anexo I.II Listado de los equipos utilizados en la presente tesis doctoral

Equipo	Modelo	Casa Comercial
Centrífuga hematológica	Eppendorf 5702	Eppendorf
Centrífugas de microtubos	Eppendorf 5415 R	Eppendorf
	Eppendorf 5430 R	Eppendorf
	Eppendorf miniSpin Plus	Eppendorf
Centrífuga de tubos y placas	Beckman Allegra 25R	Beckman Coulter
	Rotor TS-5.1-500	Beckman Coulter
Citómetro	FACSCalibur	Becton Dickinson
Lector de placas	Infinite M1000	Tecan
Ultracentrífuga	Rotor SW 55 Ti	Beckman Coulter
Sonicador	Branson Sonifier® S-150D	Emerson Electric
Espectrofotómetro	Genesys 20	Thermo Scientific
Medidor de pH	pHenomenalTM pH 1100L	VWR
Agitador magnético	VMS-A	VWR

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Balanza de precisión	Acculab Atilon	Sartorius Stedim Biotech
Balanza analítica	Sartorius LE244S	Sartorius Stedim Biotech
Termobloque	Digital Heatblock	VWR
Cubeta de electroforesis	XCell SureLockTM Mini-Cell	Invitrogen
Módulo de transferencia	XCell IITM Blot Module	Invitrogen
Sistema de imagen de geles	Gel Doc XR + filtro 630BP30 62nm	Bio-Rad Laboratories
Transiluminador	Dark Reader® DR45M	Clare Chemical
SpeedVac	SavantTM SPD121P SpeedVac	Thermo Scientific
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer® comfort	Eppendorf
Lector inmunodetección multiplex	Luminex® 100/200™	Luminex
Microscopio	JEOL JEM-1011 Leica DM6000B	JEOL, Inc. Leica Microsystems
Contaje de subparticulas	NanoSight NS300	Malvern Panalytical
Sistema de enfoque isoeléctrico	Ettan™ IPGphor™ 3	GE Healthcare
Sistemas de HPLC	Eksigent Technologies nanoLC 400	Sciex
Espectrómetro de masas	Triple TOF 6600	Sciex

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexo I.III Listado de los reactivos utilizados en la presente tesis doctoral

Reactivo	Referencia	Casa Comercial
α-MEM	12571063	Invitrogen
Aceite mineral DryStrip Cover Fluid	GE17-1335-01	Sigma (GE Healthcare)
Alizarin red S mono sodiumsalt	1062780025	Sigma
Β-glicerolfosfato	G9422	Sigma
Β-mercaptoetanol	M6250	Sigma
Acetona	BDH1101	VWR Chemicals
Acetonitrilo	34998	Sigma
Ácido acético	BDH3098-3.8LP	VWR Chemicals
Ácido cítrico monohidrato	1.002.441.000	Merck
Ácido clorhídrico	100317	Merck
Ácido tricloroacético	20742.180	Amresco® (VWR)
Ácido fórmico	F0507	Sigma
Ácido trifluoroacético	302031	Sigma
AEBSF	101500	Millipore
Anexina V-FITC	556420	BD Biosciences
Aprotinina	A1153	Sigma
Azida de sodio	S8032	Sigma
Azul bromofenol	114391	Sigma

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Benzamidina	616	Amresco® (VWR)
Bicarbonato de sodio	S5761	Sigma
BMP-5	SRP3279	Sigma
Bromuro potásico	26.708.238	AnalaR NORMAPUR (VWR)
CHAPS	C9426	Sigma
Cetylpyridinium chloride	C0732	Sigma
BSA	A4503	Sigma
Citrato sódico	S1804	Sigma
Cloruro cálcico	449709	Sigma
Cloruro de magnesio	M8266	Sigma
Cloruro potásico	P9541	Sigma
Cloruro sódico	Electran® 443824T	VWR Chemicals
Coomassie Plus	23238	Thermo Scientific
DMEM	D5796	Sigma
DMEM	11960-044	Gibco
DMSO	D8418	Sigma
Dodecilsulfato sódico	97064-470	VWR
DTT	10197777001	Roche
EDTA	E5134	Sigma
EGTA	E0396	Sigma
FBS	35-079-CV	Corning

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fluoruro de sodio	S7920	Sigma
Formalina 10% neutral tamponada	05-K01009	Bio-Optica
Glicerol	M152	Amresco® (VWR)
Glicina	M103	Amresco® (VWR)
GlutaMAX™	35050-061	Gibco
HEPES	441476L	VWR
Hidrocortisona 21 hemisuccinato	18226-1	Cayman (VWR)
Hidróxido sódico	288.244.262	AnalaR NORMAPUR (VWR)
Human Growth Factor Array Q1	QAH-GF-1-1	Raybiotech
Human Mesenchymal Stem Cells	PT-2501	Lonza
Immobiline™ DryStip pH 4-7, 7 cm	17-6001-10	GE Healthcare
Inhibidores de proteasas	M250	Amresco® (VWR)
L-ascorbic acid	A4403	Sigma
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	11644793001	Roche (Sigma)
Leupeptina	J61188	Alfa Aesar
Líquido de fijación	G 354	Agfa
Líquido de revelado	G 150	Agfa
Marcador de peso molecular	26616	Thermo Scientific
Megamix-Plus SSC	7803	Stago (Biocytex)
Metanol	BDH1135	VWR Chemicals

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MILLIPLEX MAP Human Bone Magnetic Bead Panel - Bone Metabolism Multiplex Assay	HBNMAG-51K	Millipore
MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay	HCYTOMAG-60K (Personalizado)	Millipore
MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*)	M5655	Sigma
MP-Counts	7804	Stago (Biocytex)
MOPS 20X - Tampón de electroforesis	NP0001	Invitrogen (ThermoFisher)
Normal Human Dermal Fibroblast	C-12302	Promocell
Normal Human Osteoblast	CC-2538	Lonza
Ortovanadato de sodio	S6508	Sigma
Osteoblast Growth Media	C-27001	Promocell
Osteoblast Growth Media SupplementMix	C-39615	Promocell
Penicilina/Estreptomicina	15140-122	Gibco
Pepstatina	77170	Sigma
p-nitrofenil fosfato	P7998	Sigma
Prostaglandina I_2 (PGI_2)	18220	Cayman Chemical
SDS	L3771	Sigma
Solución Acrilamida-Bis	10688.01	Serva
Sustrato ECL	Pierce™ 32106	Thermo Scientific

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SYPRO® Ruby	50562	Lonza
Tiourea	VWRVM226	VWR
Tripsina	V511A	Promega
Tripsina-EDTA	25300-054	Gibco
Tris base	497	Amresco® (VWR)
Tween® 20	M147	Amresco® (VWR)
Urea	VWRVM123	VWR
Yodoacetamida	I1149	Sigma

ANEXO II. COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES Y TAMPONES EMPLEADOS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

- Tampón de lisis NP-40 2X: Cloruro sódico - 0,3 M; Tris BASE - 20 mM; EGTA - 2 mM; EDTA - 2 mM; NP-40 - 2% (v/v). Inhibidores de proteasas: Aprotinina - 10 µg/ml, Pepstatina - 1 µg/ml, Leupeptina - 10 µg/ml, AEBSF - 400 µg/ml, Ortovanadato sódico - 5 mM, pH 7,5.

- Tampón 2D-DIGE: CHAPS – 65 mM; Tiourea - 2 M; NDSB-256 – 150 mM; Tris Base – 30 mM; Urea – 5 M; Inhibidores de fosfatasas: Ortovanadato de sodio - 1 M, Fluoruro de sodio - 0,1 M, Benzamidina - 1 M

- PBS: Cloruro sódico - 137 mM, Cloruro potásico - 2,7 mM • Fosfato disódico - 8,1 mM, Fosfato potásico monobásico - 1,76 mM.

- Tampón SDS-MS: SDS - 2% (p/v), Tris pH 7,6 - 500 mM, DTT - 0,05 M.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Tampón Laemmli 5X: Tris pH 6,8 - 0,125 M, SDS - 10% (p/v), Glicerol - 50% (v/v), β-mercaptoetanol - 25% (v/v), Azul de bromofenol - 0,02% (v/v)

- Tampón Gel-S 5X: SDS - 2% (p/v), Glicerol - 50% (v/v), β-mercaptoetanol – 25% (v/v), azul de bromofenol – 0,02% (v/v)
- Tampón TBS-T: Tris pH 7,6 - 0,02 M, Cloruro sódico - 0,137 M, Tween 20 - 1% (v/v), pH 7,6.

- Tampón de electroforesis: Tris base - 0,25 M, Glicina - 1,92 M, SDS - 1% (p/v).

- Solución de fijación: Metanol - 10% (v/v), Ácido acético - 7% (v/v).

- Tampón de transferencia: Tris BASE - 0,025 M, Glicina - 0,191 M, Metanol - 20% (v/v).

- Solución de bloqueo inmunodetección: BSA - 5% (p/v), Azida sódica - 0,1% (p/v) - TBS-T c.s.p.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO III. FIGURAS SUPLEMENTARIAS DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS VES DERIVADAS DE CP Y ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS MEMBRANAS L-PRF

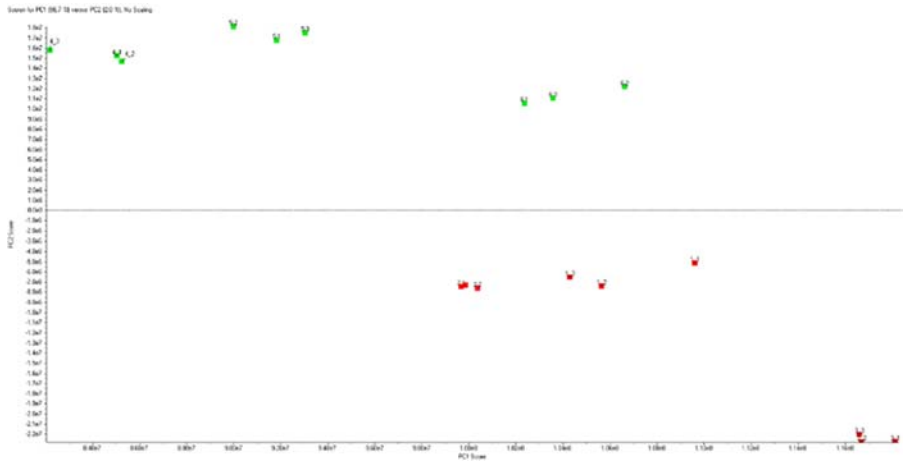


Figura Suplementaria 1. Análisis de componentes de las muestras de VEs a días 2 y 7 de almacenamiento en CP tratados con la tecnología Mirasol. Los cuadrados de color rojo representan las muestras de día 2 y los verdes las de día 7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

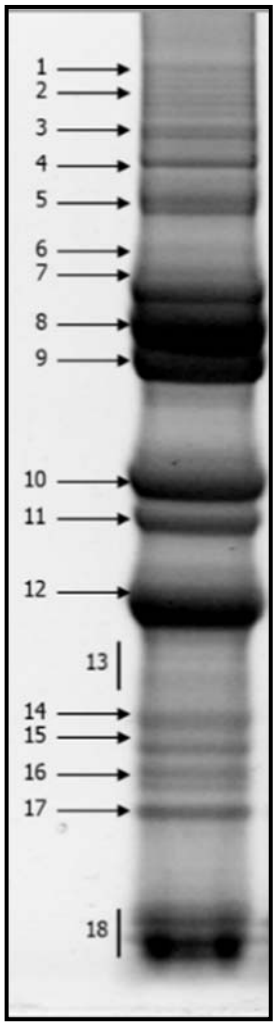


Figura Suplementaria 2. Perfil del secretoma de las membranas L-PRF a día 3 de cultivo. Las bandas señaladas fueron escindidas del gel para su análisis mediante LC-MS/MS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

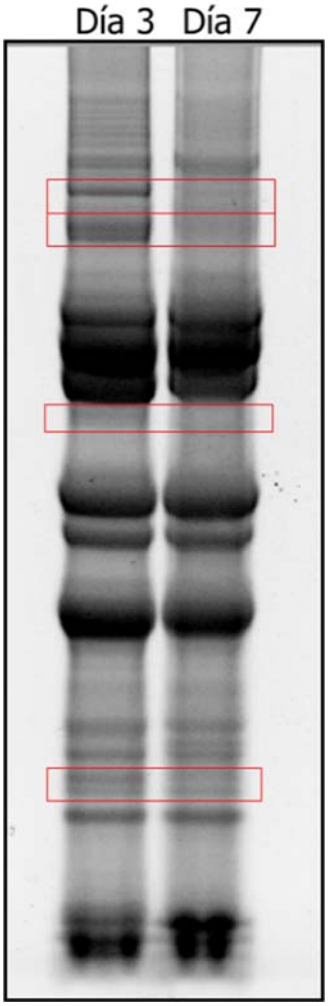


Figura Suplementaria 3. Análisis 1D-SDS-PAGE del secretoma de las membranas L-PRF a días 3 y 7. Cuatro bandas (indicadas en rojo) mostraron diferencias en la intensidad entre condiciones. Las bandas seleccionadas se escindieron y la proteína se digirió en gel y se analizó mediante LC-MS/MS.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

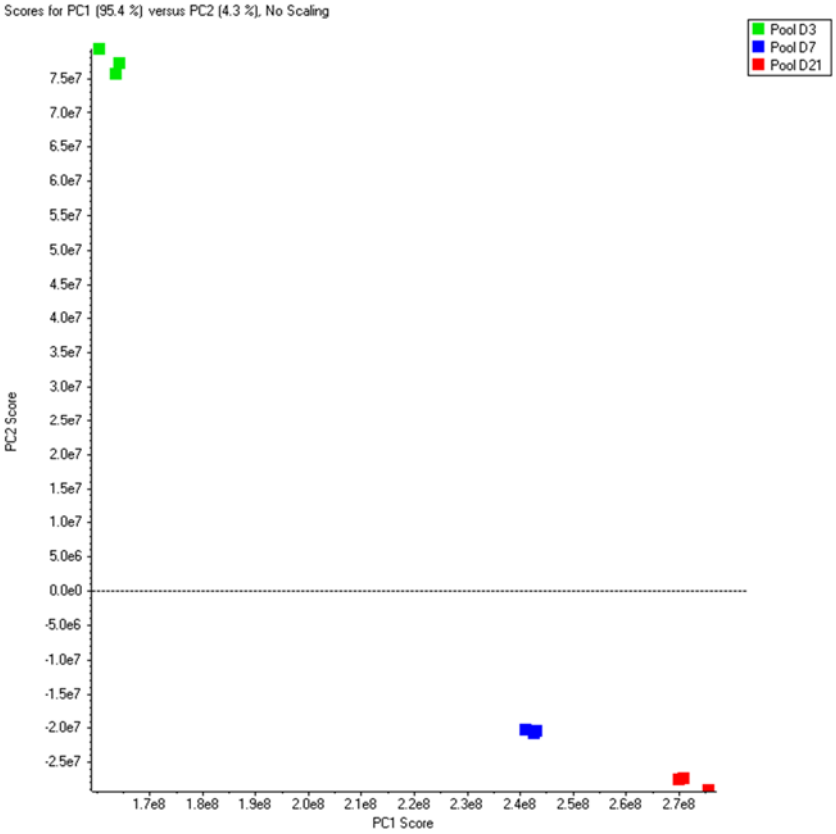


Figura Suplementaria 4. Análisis de componentes de las muestras de secretoma de las membranas L-PRF recogidas a distintos días de cultivo (2, 7 y 21). Los cuadrados de color verde representan las muestras de día 3 y los azules las de día 7 y los rojos las de día 21.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO IV. RESULTADOS AMPLIADOS DEL ESTUDIO DEL CONTENIDO DE LAS VES LIBERADAS POR LOS CP TRATADOS CON MIRASOL DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Anexo IV.I Resultados ampliados del análisis cualitativo del proteoma de las VEs

Tabla suplementaria 1. Proteínas identificadas en el análisis cualitativo del proteoma de las VEs presentes a distintos días de almacenamiento. En la columna condición se indica en que momento del almacenamiento se identificó la proteína; día 2 y día 7(d)

Código Uniprot	Nombre de la proteína	Condición
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	d2 + d7
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	d2 + d7
CO3_HUMAN	Complement C3	d2 + d7
FINC_HUMAN	Fibronectin	d2 + d7
CO4B_HUMAN	Complement C4-B	d2 + d7
FLNA_HUMAN	Filamin-A	d2 + d7
TLN1_HUMAN	Talin-1	d2 + d7
ALBU_HUMAN	Serum albumin	d2 + d7
VWF_HUMAN	von Willebrand factor	d2 + d7
CFAH_HUMAN	Complement factor H	d2 + d7
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	d2 + d7
IGHM_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant mu	d2 + d7
TSP1_HUMAN	Thromb	d2 + d7
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	d2 + d7
CO5_HUMAN	Complement C5	d2 + d7
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain	d2 + d7
MMRN1_HUMAN	Multimerin-1	d2 + d7
ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb	d2 + d7
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	d2 + d7
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	d2 + d7
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	d2 + d7
URP2_HUMAN	Fermitin family homolog 3	d2 + d7
HPTR_HUMAN	Haptoglobin-related protein	d2 + d7
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

K2C1_HUMAN	Keratin, type II cyt	d2 + d7
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	d2 + d7
ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	d2 + d7
PR	Vitamin K-dependent protein S	d2 + d7
FA5_HUMAN	Coagulation factor V	d2 + d7
IGHG1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	d2 + d7
VINC_HUMAN	Vinculin	d2 + d7
CD5L_HUMAN	CD5 antigen-like	d2 + d7
CLUS_HUMAN	Clusterin	d2 + d7
C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent	d2 + d7
IGHA1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	d2 + d7
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	d2 + d7
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cyt	d2 + d7
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	d2 + d7
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	d2 + d7
LG3BP_HUMAN	Galectin-3-binding protein	d2 + d7
GELS_HUMAN	Gelsolin	d2 + d7
EMIL1_HUMAN	EMILIN-1	d2 + d7
ITB3_HUMAN	Integrin beta-3	d2 + d7
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	d2 + d7
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	d2 + d7
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	d2 + d7
FCN2_HUMAN	Ficolin-2	d2 + d7
CO9_HUMAN	Complement component C9	d2 + d7
CFAB_HUMAN	Complement factor B	d2 + d7
HPT_HUMAN	Haptoglobin	d2 + d7
IGKC_HUMAN	Immunoglobulin kappa constant	d2 + d7
FCGBP_HUMAN	IgGFc-binding protein	d2 + d7
CO8B_HUMAN	Complement component C8 beta chain	d2 + d7
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1	d2 + d7
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	d2 + d7
TTHY_HUMAN	Transthyretin	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FCN3_HUMAN	Ficolin-3	d2 + d7
IGHG2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	d2 + d7
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	d2 + d7
STOM_HUMAN	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	d2 + d7
K22E_HUMAN	Keratin, type II cyt	d2 + d7
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	d2 + d7
IGLC2_HUMAN	Immunoglobulin lambda constant 2	d2 + d7
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	d2 + d7
APOA_HUMAN	Apolipoprotein	d2 + d7
C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit B	d2 + d7
CO6_HUMAN	Complement component C6	d2 + d7
LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	d2 + d7
TFR1_HUMAN	Transferrin receptor protein 1	d2 + d7
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	d2 + d7
F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	d2 + d7
KLKB1_HUMAN	Plasma kallikrein	d2 + d7
MASP1_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 1	d2 + d7
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	d2 + d7
MYH9_HUMAN	My	d2 + d7
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cyt	d2 + d7
ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	d2 + d7
HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2	d2 + d7
PROF1_HUMAN	Profilin-1	d2 + d7
VTNC_HUMAN	Vitronectin	d2 + d7
C4BPB_HUMAN	C4b-binding protein beta chain	d2 + d7
RAP1B_HUMAN	Ras-related protein Rap-1b	d2 + d7
HV323_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-23	d2 + d7
TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain	d2 + d7
TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	d2 + d7
TBA1C_HUMAN	Tubulin alpha-1C chain	d2 + d7
PLMN_HUMAN	Plasminogen	d2 + d7
FA11_HUMAN	Coagulation factor XI	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	d2 + d7
KV320_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-20	d2 + d7
C1QA_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit A	d2 + d7
PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	d2 + d7
PARVB_HUMAN	Beta-parvin	d2 + d7
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	d2 + d7
GNAI2_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G	d2 + d7
C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C	d2 + d7
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component	d2 + d7
PON1_HUMAN	Serum paraoxonase/arylesterase 1	d2 + d7
HEMO_HUMAN	Hemopexin	d2 + d7
CD36_HUMAN	Platelet glycoprotein 4	d2 + d7
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-ph	d2 + d7
RB27B_HUMAN	Ras-related protein Rab-27B	d2 + d7
LBP_HUMAN	Lipopolysaccharide-binding protein	d2 + d7
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	d2 + d7
RSU1_HUMAN	Ras suppressor protein 1	d2 + d7
HV551_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 5-51	d2 + d7
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	d2 + d7
PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	d2 + d7
IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor	d2 + d7
HV307_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-7	d2 + d7
KVD28_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-28	d2 + d7
KV401_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 4-1	d2 + d7
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	d2 + d7
ITB1_HUMAN	Integrin beta-1	d2 + d7
TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	d2 + d7
COF1_HUMAN	Cofilin-1	d2 + d7
KV106_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-6	d2 + d7
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	d2 + d7
B3AT_HUMAN	Band 3 anion transport protein	d2 + d7
KV311_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-11	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LV861_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 8-61	d2 + d7
HVD82_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-38-2	d2 + d7
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	d2 + d7
LDHB_HUMAN	L-lactate dehydrogenase B chain	d2 + d7
FLOT1_HUMAN	Flotillin-1	d2 + d7
HV315_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-15	d2 + d7
CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	d2 + d7
CD9_HUMAN	CD9 antigen	d2 + d7
IGLL5_HUMAN	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	d2 + d7
MOES_HUMAN	Moesin	d2 + d7
CLIC1_HUMAN	Chloride intracellular channel protein 1	d2 + d7
WDR1_HUMAN	WD repeat-containing protein 1	d2 + d7
CO7_HUMAN	Complement component C7	d2 + d7
HV601_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 6-1	d2 + d7
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	d2 + d7
KV109_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-9	d2 + d7
GP1BB_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib beta chain	d2 + d7
KV105_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-5	d2 + d7
ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	d2 + d7
ARF1_HUMAN	ADP-rib	d2 + d7
KV224_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2-24	d2 + d7
ILK_HUMAN	Integrin-linked protein kinase	d2 + d7
GTR1_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated gluc	d2 + d7
MASP2_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 2	d2 + d7
CPN2_HUMAN	Carboxypeptidase N subunit 2	d2 + d7
ITA6_HUMAN	Integrin alpha-6	d2 + d7
ALDOA_HUMAN	Fruct	d2 + d7
HV372_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-72	d2 + d7
HV146_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 1-46	d2 + d7
LV325_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-25	d2 + d7
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM	d2 + d7
GP1BA_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RAB7A_HUMAN	Ras-related protein Rab-7a	d2 + d7
FHR1_HUMAN	Complement factor H-related protein 1	d2 + d7
ANXA6_HUMAN	Annexin A6	d2 + d7
F13B_HUMAN	Coagulation factor XIII B chain	d2 + d7
ATPB_HUMAN	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	d2 + d7
PROP_HUMAN	Properdin	d2 + d7
LV151_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-51	d2 + d7
LV469_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 4-69	d2 + d7
FA12_HUMAN	Coagulation factor XII	d2 + d7
RL40_HUMAN	Ubiquitin-60S rib	d2 + d7
JAM1_HUMAN	Junctional adhesion molecule A	d2 + d7
HV118_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 1-18	d2 + d7
KV230_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2-30	d2 + d7
ADA10_HUMAN	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	d2 + d7
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	d2 + d7
COR1A_HUMAN	Coronin-1A	d2 + d7
APOD_HUMAN	Apolipoprotein D	d2 + d7
CO8A_HUMAN	Complement component C8 alpha chain	d2 + d7
HV349_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-49	d2 + d7
GPV_HUMAN	Platelet glycoprotein V	d2 + d7
PECA1_HUMAN	Platelet endothelial cell adhesion molecule	d2 + d7
HV205_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 2-5	d2 + d7
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	d2 + d7
KV315_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-15	d2 + d7
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	d2 + d7
PLSL_HUMAN	Plastin-2	d2 + d7
LV147_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-47	d2 + d7
1433G_HUMAN	14-3-3 protein gamma	d2 + d7
CO8G_HUMAN	Complement component C8 gamma chain	d2 + d7
A1AG2_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 2	d2 + d7
RB11B_HUMAN	Ras-related protein Rab-11B	d2 + d7
CETP_HUMAN	Cholesteryl ester transfer protein	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CTL1_HUMAN	Choline transporter-like protein 1	d2 + d7
IGHG3_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	d2 + d7
FCN1_HUMAN	Ficolin-1	d2 + d7
IGHG4_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	d2 + d7
MYCT1_HUMAN	Myc target protein 1	d2 + d7
HV43D_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-43D	d2 + d7
HV309_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-9	d2 + d7
SDCB1_HUMAN	Syntenin-1	d2 + d7
FBLN1_HUMAN	Fibulin-1	d2 + d7
LV321_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-21	d2 + d7
HV335_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-30-5	d2 + d7
AMBP_HUMAN	Protein AMBP	d2 + d7
TPIS_HUMAN	Tri	d2 + d7
RAB10_HUMAN	Ras-related protein Rab-10	d2 + d7
STX7_HUMAN	Syntaxin-7	d2 + d7
S10A8_HUMAN	Protein S100-A8	d2 + d7
FLOT2_HUMAN	Flotillin-2	d2 + d7
LV319_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-19	d2 + d7
HV374_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-74	d2 + d7
ARPC4_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	d2 + d7
LV746_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 7-46	d2 + d7
HV226_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 2-26	d2 + d7
IPSP_HUMAN	Plasma serine protease inhibitor	d2 + d7
PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2	d2 + d7
GPIX_HUMAN	Platelet glycoprotein IX	d2 + d7
GDIR2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	d2 + d7
ARP3_HUMAN	Actin-related protein 3	d2 + d7
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	d2 + d7
KV133_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-33	d2 + d7
OLFM4_HUMAN	Olfactomedin-4	d2 + d7
KVD29_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-29	d2 + d7
CAZA1_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-1	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	d2 + d7
PGRP2_HUMAN	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	d2 + d7
CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1	d2 + d7
STXB2_HUMAN	Syntaxin-binding protein 2	d2 + d7
KV116_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-16	d2 + d7
LV218_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 2-18	d2 + d7
LV545_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 5-45	d2 + d7
CYFP1_HUMAN	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	d2 + d7
KV113_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-13	d2 + d7
GNAQ_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G	d2 + d7
SAA4_HUMAN	Serum amyloid A-4 protein	d2 + d7
IGHA2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	d2 + d7
KVD12_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-12	d2 + d7
LV949_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 9-49	d2 + d7
MFGM_HUMAN	Lactadherin	d2 + d7
RAB5C_HUMAN	Ras-related protein Rab-5C	d2 + d7
GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	d2 + d7
GDIA_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	d2 + d7
HV64D_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-64D	d2 + d7
RAB1B_HUMAN	Ras-related protein Rab-1B	d2 + d7
RAB1A_HUMAN	Ras-related protein Rab-1A	d2 + d7
KV127_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-27	d2 + d7
KVD21_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 6D-21	d2 + d7
TSN14_HUMAN	Tetraspanin-14	d2 + d7
KVD39_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-39	d2 + d7
HV313_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-13	d2 + d7
HV169_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 1-69	d2 + d7
LV144_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-44	d2 + d7
HV428_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-28	d2 + d7
KV621_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 6-21	d2 + d7
BGH3_HUMAN	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	d2 + d7
CDC42_HUMAN	Cell division control protein 42 homolog	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAMP_HUMAN	Cathelicidin antimicrobial peptide	d2 + d7
IDHP_HUMAN	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	d2 + d7
TTYH3_HUMAN	Protein tweety homolog 3	d2 + d7
B2MG_HUMAN	Beta-2-microglobulin	d2 + d7
GPDM_HUMAN	Glycerol-3-ph	d2 + d7
LEUK_HUMAN	Leuk	d2 + d7
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	d2 + d7
LV657_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 6-57	d2 + d7
TGFB1_HUMAN	Transforming growth factor beta-1	d2 + d7
SODM_HUMAN	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	d2 + d7
PLF4_HUMAN	Platelet factor 4	d2 + d7
PTTG_HUMAN	Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein	d2 + d7
CAPZB_HUMAN	F-actin-capping protein subunit beta	d2 + d7
TBA4A_HUMAN	Tubulin alpha-4A chain	d2 + d7
MYO1G_HUMAN	Unconventional my	d2 + d7
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	d2 + d7
RAP2B_HUMAN	Ras-related protein Rap-2b	d2 + d7
ITAM_HUMAN	Integrin alpha-M	d2 + d7
ICAM2_HUMAN	Intercellular adhesion molecule 2	d2 + d7
KVD20_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3D-20	d2 + d7
CTL2_HUMAN	Choline transporter-like protein 2	d2 + d7
LY66F_HUMAN	Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6f	d2 + d7
K1C14_HUMAN	Keratin, type I cyt	d2 + d7
KVD15_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3D-15	d2 + d7
ANX11_HUMAN	Annexin A11	d2 + d7
EHD1_HUMAN	EH domain-containing protein 1	d2 + d7
ARC1B_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	d2 + d7
LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain	d2 + d7
CAN1_HUMAN	Calpain-1 catalytic subunit	d2 + d7
RAB6B_HUMAN	Ras-related protein Rab-6B	d2 + d7
CFAI_HUMAN	Complement factor I	d2 + d7
NID1_HUMAN	Nidogen-1	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	d2 + d7
LIMS1_HUMAN	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	d2 + d7
ARPC5_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	d2 + d7
IF4A1_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-I	d2 + d7
LV140_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-40	d2 + d7
SRC_HUMAN	Proto-oncogene tyr	d2 + d7
APT_HUMAN	Adenine ph	d2 + d7
LV460_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 4-60	d2 + d7
THRB_HUMAN	Prothrombin	d2 + d7
HV70D_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 2-70D	d2 + d7
AXA2L_HUMAN	Putative annexin A2-like protein	d2 + d7
COTL1_HUMAN	Coact	d2 + d7
4F2_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chain	d2 + d7
LV743_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 7-43	d2 + d7
SEPP1_HUMAN	Selenoprotein P	d2 + d7
LV39_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-9	d2 + d7
LV208_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 2-8	d2 + d7
1A69_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-69 alpha chain	d2 + d7
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	d2 + d7
1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha	d2 + d7
ITA2_HUMAN	Integrin alpha-2	d2 + d7
KAP0_HUMAN	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	d2 + d7
KVD16_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-16	d2 + d7
LV310_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-10	d2 + d7
CD47_HUMAN	Leukocyte surface antigen CD47	d2 + d7
PNPH_HUMAN	Purine nucle	d2 + d7
ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	d2 + d7
HV459_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-59	d2 + d7
HV103_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 1-3	d2 + d7
LV211_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 2-11	d2 + d7
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	d2 + d7
MYL6_HUMAN	My	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EHD3_HUMAN	EH domain-containing protein 3	d2 + d7
1433T_HUMAN	14-3-3 protein theta	d2 + d7
KVD08_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-8	d2 + d7
A16A1_HUMAN	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	d2 + d7
PSA2_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-2	d2 + d7
KV117_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-17	d2 + d7
PLEK_HUMAN	Pleckstrin	d2 + d7
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	d2 + d7
K2C5_HUMAN	Keratin, type II cyt	d2 + d7
VASP_HUMAN	Vasodilator-stimulated ph	d2 + d7
LVX54_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 10-54	d2 + d7
1433F_HUMAN	14-3-3 protein eta	d2 + d7
HV353_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-53	d2 + d7
S38A9_HUMAN	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 9	d2 + d7
ANGL6_HUMAN	Angiopoietin-related protein 6	d2 + d7
NCKP1_HUMAN	Nck-associated protein 1	d2 + d7
APOM_HUMAN	Apolipoprotein M	d2 + d7
PTPRC_HUMAN	Receptor-type tyr	d2 + d7
HV434_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-34	d2 + d7
PLP2_HUMAN	Proteolipid protein 2	d2 + d7
EZRI_HUMAN	Ezrin	d2 + d7
HS71B_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1B	d2 + d7
HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	d2 + d7
FILA2_HUMAN	Filaggrin-2	d2 + d7
ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	d2 + d7
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	d2 + d7
BIP_HUMAN	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	d2 + d7
AT2A3_HUMAN	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	d2 + d7
CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	d2 + d7
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	d2 + d7
PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase	d2 + d7
MDHM_HUMAN	Malate dehydrogenase, mitochondrial	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

VDAC3_HUMAN	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	d2 + d7
DHB4_HUMAN	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	d2 + d7
NB5R3_HUMAN	NADH-cytochrome b5 reductase 3	d2 + d7
ILEU_HUMAN	Leukocyte elastase inhibitor	d2 + d7
PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	d2 + d7
COR1C_HUMAN	Coronin-1C	d2 + d7
EF1A3_HUMAN	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	d2 + d7
GTR3_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated gluc	d2 + d7
RTN4_HUMAN	Reticulon-4	d2 + d7
PGK1_HUMAN	Ph	d2 + d7
ESYT1_HUMAN	Extended synaptotagmin-1	d2 + d7
GANAB_HUMAN	Neutral alpha-gluc	d2 + d7
ML12A_HUMAN	My	d2 + d7
PGH1_HUMAN	Pr	d2 + d7
ENPL_HUMAN	Endoplasmin	d2 + d7
RPN2_HUMAN	Dolichyl-diph	d2 + d7
GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	d2 + d7
RB11A_HUMAN	Ras-related protein Rab-11A	d2 + d7
CALX_HUMAN	Calnexin	d2 + d7
EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma	d2 + d7
PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6	d2 + d7
6PGD_HUMAN	6-ph	d2 + d7
RDH11_HUMAN	Retinol dehydrogenase 11	d2 + d7
THAS_HUMAN	Thromboxane-A synthase	d2 + d7
ARPC2_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	d2 + d7
PYGB_HUMAN	Glycogen ph	d2 + d7
STX11_HUMAN	Syntaxin-11	d2 + d7
ACTZ_HUMAN	Alpha-centractin	d2 + d7
EFTU_HUMAN	Elongation factor Tu, mitochondrial	d2 + d7
PI42A_HUMAN	Ph	d2 + d7
PRAF3_HUMAN	PRA1 family protein 3	d2 + d7
CISY_HUMAN	Citrate synthase, mitochondrial	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ATPO_HUMAN	ATP synthase subunit O, mitochondrial	d2 + d7
TAGL2_HUMAN	Transgelin-2	d2 + d7
PRDX3_HUMAN	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	d2 + d7
PTPRJ_HUMAN	Receptor-type tyr	d2 + d7
RAC2_HUMAN	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	d2 + d7
RPN1_HUMAN	Dolichyl-diph	d2 + d7
PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	d2 + d7
RASA3_HUMAN	Ras GTPase-activating protein 3	d2 + d7
CRAC1_HUMAN	Cartilage acidic protein 1	d2 + d7
GBB1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G	d2 + d7
TBA8_HUMAN	Tubulin alpha-8 chain	d2 + d7
DEST_HUMAN	Destrin	d2 + d7
GNAZ_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G	d2 + d7
CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein	d2 + d7
CAH2_HUMAN	Carbonic anhydrase 2	d2 + d7
ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4	d2 + d7
RAB14_HUMAN	Ras-related protein Rab-14	d2 + d7
TALDO_HUMAN	Transaldolase	d2 + d7
LYN_HUMAN	Tyr	d2 + d7
PP1A_HUMAN	Serine/threonine-protein ph	d2 + d7
G6PD_HUMAN	Gluc	d2 + d7
ESAM_HUMAN	Endothelial cell-selective adhesion molecule	d2 + d7
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	d2 + d7
PDC10_HUMAN	Programmed cell death protein 10	d2 + d7
TPP1_HUMAN	Tripeptidyl-peptidase 1	d2 + d7
TKT_HUMAN	Transketolase	d2 + d7
GSTO1_HUMAN	Glutathione S-transferase omega-1	d2 + d7
KAPCB_HUMAN	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	d2 + d7
RAB32_HUMAN	Ras-related protein Rab-32	d2 + d7
POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E	d2 + d7
PRDX5_HUMAN	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	d2 + d7
UBS3B_HUMAN	Ubiquitin-associated and SH3 domain-containing protein B	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OLA1_HUMAN	Obg-like ATPase 1	d2 + d7
CKLF5_HUMAN	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 5	d2 + d7
ZYX_HUMAN	Zyxin	d2 + d7
STIM1_HUMAN	Stromal interaction molecule 1	d2 + d7
PSME1_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 1	d2 + d7
GDIR1_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	d2 + d7
P2RX1_HUMAN	P2X purinoceptor 1	d2 + d7
PSB2_HUMAN	Proteasome subunit beta type-2	d2 + d7
ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	d2 + d7
TYPH_HUMAN	Thymidine ph	d2 + d7
ESTD_HUMAN	S-formylglutathione hydrolase	d2 + d7
SNP23_HUMAN	Synapt	d2 + d7
PDLI1_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 1	d2 + d7
TCPZ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta	d2 + d7
DCXR_HUMAN	L-xylul	d2 + d7
K2C6C_HUMAN	Keratin, type II cyt	d2 + d7
AOFB_HUMAN	Amine oxidase [flavin-containing] B	d2 + d7
PCYXL_HUMAN	Prenylcysteine oxidase-like	d2 + d7
CATA_HUMAN	Catalase	d2 + d7
MPCP_HUMAN	Ph	d2 + d7
TMM40_HUMAN	Transmembrane protein 40	d2 + d7
G6PI_HUMAN	Gluc	d2 + d7
KAD2_HUMAN	Adenylate kinase 2, mitochondrial	d2 + d7
ENDD1_HUMAN	Endonuclease domain-containing 1 protein	d2 + d7
CPNE4_HUMAN	Copine-4	d2 + d7
TMX1_HUMAN	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	d2 + d7
ANO6_HUMAN	Anoctamin-6	d2 + d7
RAB8A_HUMAN	Ras-related protein Rab-8A	d2 + d7
TMEDA_HUMAN	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	d2 + d7
CAVN2_HUMAN	Caveolae-associated protein 2	d2 + d7
ADT3_HUMAN	ADP/ATP translocase 3	d2 + d7
LOX12_HUMAN	Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S-type	d2 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PAR4_HUMAN	Proteinase-activated receptor 4	d2 + d7
SLAF5_HUMAN	SLAM family member 5	d2 + d7
IGHD_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant delta	d2 + d7
MYADM_HUMAN	Myeloid-associated differentiation marker	d2 + d7
GNA13_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	d2 + d7
H32_HUMAN	Histone H3.2	d2 + d7
CBPN_HUMAN	Carboxypeptidase N catalytic chain	d2 + d7
TEX28_HUMAN	Testis-specific protein TEX28	d2 + d7
NNTM_HUMAN	NAD	d2 + d7
CALR_HUMAN	Calreticulin	d2 + d7
BASI_HUMAN	Basigin	d2 + d7
PHB_HUMAN	Prohibitin	d2 + d7
TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain	d2 + d7
PSA_HUMAN	Puromycin-sensitive aminopeptidase	d2 + d7
RAB21_HUMAN	Ras-related protein Rab-21	d2 + d7
PDC6I_HUMAN	Programmed cell death 6-interacting protein	d2 + d7
NDKB_HUMAN	Nucle	d2 + d7
SPB6_HUMAN	Serpin B6	d2 + d7
CO6A3_HUMAN	Collagen alpha-3	d2 + d7
IGLC3_HUMAN	Immunoglobulin lambda constant 3	d2
RAP1A_HUMAN	Ras-related protein Rap-1A	d2
1B55_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-55 alpha chain	d2
KV228_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2-28	d2
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	d2
PRG4_HUMAN	Proteoglycan 4	d2
OIT3_HUMAN	Oncoprotein-induced transcript 3 protein	d2
1C03_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-3 alpha chain	d2
HV311_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-11	d2
GTR14_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated gluc	d2
HV108_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 1-8	d2
GBB2_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	d2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AMPN_HUMAN	Aminopeptidase N	d2
KV112_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-12	d2
RAB1C_HUMAN	Putative Ras-related protein Rab-1C	d2
HV366_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-66	d2
VIME_HUMAN	Vimentin	d2
C1QT3_HUMAN	Complement C1q tumor necr	d2
F161B_HUMAN	Protein FAM161B	d2
TCAM1_HUMAN	TIR domain-containing adapter molecule 1	d2
RELN_HUMAN	Reelin	d2
PF4V_HUMAN	Platelet factor 4 variant	d2
CO2_HUMAN	Complement C2	d2
PDCD1_HUMAN	Programmed cell death protein 1	d2
ALDOB_HUMAN	Fruct	d2
KVD30_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-30	d2
HV102_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 1-2	d2
PIGT_HUMAN	GPI transamidase component PIG-T	d2
HV364_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-64	d2
LYST_HUMAN	Lys	d2
CD44_HUMAN	CD44 antigen	d2
US6NL_HUMAN	USP6 N-terminal-like protein	d2
MYL6B_HUMAN	My	d2
CD14_HUMAN	Monocyte differentiation antigen CD14	d2
LV327_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-27	d2
A2012_HUMAN	Putative ankyrin repeat domain-containing protein 20A12 pseudogene	d2
FBLN3_HUMAN	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	d2
MBL2_HUMAN	Mann	d2
PGAM2_HUMAN	Ph	d2
1B35_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-35 alpha chain	d2
HVC33_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3	d2
DAB1_HUMAN	Disabled homolog 1	d2
ZPI_HUMAN	Protein Z-dependent protease inhibitor	d2
ANXA2_HUMAN	Annexin A2	d2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PCLO_HUMAN	Protein piccolo	d2
P73_HUMAN	Tumor protein p73	d2
1C07_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain	d2
ADT2_HUMAN	ADP/ATP translocase 2	d2
MAOM_HUMAN	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	d2
GAPR1_HUMAN	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	d2
ACTS_HUMAN	Actin, alpha skeletal muscle	d2
PHB2_HUMAN	Prohibitin-2	d2
PRDX4_HUMAN	Peroxiredoxin-4	d2
VDAC1_HUMAN	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	d2
DYN3_HUMAN	Dynamin-3	d2
H2B1L_HUMAN	Histone H2B type 1-L	d2
SCPDL_HUMAN	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	d2
CHPF2_HUMAN	Chondroitin sulfate glucuronyltransferase	d2
SDHA_HUMAN	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	d2
KPCA_HUMAN	Protein kinase C alpha type	d2
CSF2R_HUMAN	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor subunit alpha	d2
ACADV_HUMAN	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	d2
GRAN_HUMAN	Grancalcin	d2
ICAM3_HUMAN	Intercellular adhesion molecule 3	d2
S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	d2
1B41_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-41 alpha chain	d2
BAP31_HUMAN	B-cell receptor-associated protein 31	d2
ITB2_HUMAN	Integrin beta-2	d2
1A33_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-33 alpha chain	d2
RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	d2
LRBA_HUMAN	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	d2
ADIPO_HUMAN	Adiponectin	d2
HGFL_HUMAN	Hepatocyte growth factor-like protein	d2
TBB4B_HUMAN	Tubulin beta-4B chain	d2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LR2BP_HUMAN	LRP2-binding protein	d2
PPIF_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	d2
1B15_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-15 alpha chain	d7
UN13D_HUMAN	Protein unc-13 homolog D	d7
PTN6_HUMAN	Tyr	d7
UBA1_HUMAN	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	d7
ARP2_HUMAN	Actin-related protein 2	d7
MGLL_HUMAN	Monoglyceride lipase	d7
IMB1_HUMAN	Importin subunit beta-1	d7
PARK7_HUMAN	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	d7
RAC1_HUMAN	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	d7
ROCK2_HUMAN	Rho-associated protein kinase 2	d7
2AAA_HUMAN	Serine/threonine-protein ph	d7
MTPN_HUMAN	Myotrophin	d7
CD151_HUMAN	CD151 antigen	d7
G6B_HUMAN	Megakaryocyte and platelet inhibitory receptor G6b	d7
TCPG_HUMAN	T-complex protein 1 subunit gamma	d7
KALRN_HUMAN	Kalirin	d7
ARPC3_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	d7
JAM3_HUMAN	Junctional adhesion molecule C	d7
CSK_HUMAN	Tyr	d7
TCPB_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta	d7
K1C16_HUMAN	Keratin, type I cyt	d7
PYGL_HUMAN	Glycogen ph	d7
RALB_HUMAN	Ras-related protein Ral-B	d7
DIAP1_HUMAN	Protein diaphanous homolog 1	d7
GSHR_HUMAN	Glutathione reductase, mitochondrial	d7
TSN9_HUMAN	Tetraspanin-9	d7
LRC32_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 32	d7
HEM2_HUMAN	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	d7
NCKPL_HUMAN	Nck-associated protein 1-like	d7
STK24_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase 24	d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DAAM1_HUMAN	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1	d7
PCSK6_HUMAN	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	d7
UGPA_HUMAN	UTP--gluc	d7
RHOA_HUMAN	Transforming protein RhoA	d7
DNM1L_HUMAN	Dynamin-1-like protein	d7
SNAA_HUMAN	Alpha-soluble NSF attachment protein	d7
SKAP2_HUMAN	Src kinase-associated ph	d7
CAB39_HUMAN	Calcium-binding protein 39	d7
TPM3_HUMAN	Tropomy	d7
TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon	d7
XPP1_HUMAN	Xaa-Pro aminopeptidase 1	d7
CPNS1_HUMAN	Calpain small subunit 1	d7
PGAM1_HUMAN	Ph	d7
VATA_HUMAN	V-type proton ATPase catalytic subunit A	d7
TWF2_HUMAN	Twinfilin-2	d7
1B07_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain	d7
SEPT7_HUMAN	Septin-7	d7
ANXA7_HUMAN	Annexin A7	d7
EM55_HUMAN	55 kDa erythrocyte membrane protein	d7
GPVI_HUMAN	Platelet glycoprotein VI	d7
PSAL_HUMAN	Puromycin-sensitive aminopeptidase-like protein	d7
KAPCA_HUMAN	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	d7
LEGL_HUMAN	Galectin-related protein	d7
FHL1_HUMAN	Four and a half LIM domains protein 1	d7
MDHC_HUMAN	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	d7
GDN_HUMAN	Glia-derived nexin	d7
FYN_HUMAN	Tyr	d7
MK14_HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 14	d7
GARS_HUMAN	Glycine--tRNA ligase	d7
PLXA4_HUMAN	Plexin-A4	d7
STXB3_HUMAN	Syntaxin-binding protein 3	d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SUSD3_HUMAN	Sushi domain-containing protein 3	d7
PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	d7
TCPD_HUMAN	T-complex protein 1 subunit delta	d7
NP1L1_HUMAN	Nucle	d7
SYTL4_HUMAN	Synaptotagmin-like protein 4	d7
SH3L3_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	d7
WASF2_HUMAN	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	d7
INF2_HUMAN	Inverted formin-2	d7
CCL5_HUMAN	C-C motif chemokine 5	d7
FCERG_HUMAN	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	d7
SUSD1_HUMAN	Sushi domain-containing protein 1	d7
CD226_HUMAN	CD226 antigen	d7
PFKAP_HUMAN	ATP-dependent 6-ph	d7
NBEL2_HUMAN	Neurobeachin-like protein 2	d7
DYN2_HUMAN	Dynamin-2	d7
ANXA5_HUMAN	Annexin A5	d7
CLD5_HUMAN	Claudin-5	d7
RAB37_HUMAN	Ras-related protein Rab-37	d7
LFG3_HUMAN	Protein lifeguard 3	d7
RGS10_HUMAN	Regulator of G-protein signaling 10	d7
CPNE3_HUMAN	Copine-3	d7
PKHL1_HUMAN	Fibrocystin-L	d7
FAK2_HUMAN	Protein-tyr	d7
PSB1_HUMAN	Proteasome subunit beta type-1	d7
COPG1_HUMAN	Coatomer subunit gamma-1	d7
PANX1_HUMAN	Pannexin-1	d7
FKB1A_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	d7
GMPR1_HUMAN	GMP reductase 1	d7
ADDA_HUMAN	Alpha-adducin	d7
S10A4_HUMAN	Protein S100-A4	d7
ADHX_HUMAN	Alcohol dehydrogenase class-3	d7
THIO_HUMAN	Thioredoxin	d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TSN4_HUMAN	Tetraspanin-4	d7
LST1_HUMAN	Leukocyte-specific transcript 1 protein	d7
FHOD1_HUMAN	FH1/FH2 domain-containing protein 1	d7
LYAM3_HUMAN	P-selectin	d7
COR1B_HUMAN	Coronin-1B	d7
ENOG_HUMAN	Gamma-enolase	d7
ACTBL_HUMAN	Beta-actin-like protein 2	d7
IDHC_HUMAN	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	d7
MUC19_HUMAN	Mucin-19	d7
CLC1B_HUMAN	C-type lectin domain family 1 member B	d7
RHOG_HUMAN	Rho-related GTP-binding protein RhoG	d7
ACLY_HUMAN	ATP-citrate synthase	d7
CAZA2_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-2	d7
PACN2_HUMAN	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	d7
GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial	d7
KIF2A_HUMAN	Kinesin-like protein KIF2A	d7
BID_HUMAN	BH3-interacting domain death agonist	d7
HPRT_HUMAN	Hypoxanthine-guanine ph	d7
MARE2_HUMAN	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	d7
CNDP2_HUMAN	Cyt	d7
GRB2_HUMAN	Growth factor receptor-bound protein 2	d7
UB2L3_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	d7
CD109_HUMAN	CD109 antigen	d7
HPCL1_HUMAN	Hippocalcin-like protein 1	d7
DOK3_HUMAN	Docking protein 3	d7
CRKL_HUMAN	Crk-like protein	d7
APOC1_HUMAN	Apolipoprotein C-I	d7
CD82_HUMAN	CD82 antigen	d7
UBA7_HUMAN	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7	d7
TGFI1_HUMAN	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	d7
ARK72_HUMAN	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	d7
LV214_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 2-14	d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PFKAL_HUMAN	ATP-dependent 6-ph	d7
RHG01_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 1	d7
PTPRA_HUMAN	Receptor-type tyr	d7
LAMP1_HUMAN	Lys	d7
AMPL_HUMAN	Cyt	d7
PSD13_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	d7
RAB2B_HUMAN	Ras-related protein Rab-2B	d7
MPRD_HUMAN	Cation-dependent mann	d7
PAI1_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 1	d7
FAS_HUMAN	Fatty acid synthase	d7
PSA3_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-3	d7
GBB4_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	d7
BLMH_HUMAN	Bleomycin hydrolase	d7
ARF4_HUMAN	ADP-rib	d7
ERBIN_HUMAN	Erbin	d7
GIPC3_HUMAN	PDZ domain-containing protein GIPC3	d7
AMPD2_HUMAN	AMP deaminase 2	d7
FAAA_HUMAN	Fumarylacetoacetase	d7
RHG18_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 18	d7
CAND1_HUMAN	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	d7
NCHL1_HUMAN	Neural cell adhesion molecule L1-like protein	d7
CKLF6_HUMAN	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 6	d7
CC50A_HUMAN	Cell cycle control protein 50A	d7
SAR1A_HUMAN	GTP-binding protein SAR1a	d7
TPP2_HUMAN	Tripeptidyl-peptidase 2	d7
PSA6_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-6	d7
LV539_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 5-39	d7
VDAC2_HUMAN	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	d7
SYYC_HUMAN	Tyr	d7
KAP3_HUMAN	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	d7
POTEJ_HUMAN	POTE ankyrin domain family member J	d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SPT2_HUMAN	Protein SPT2 homolog	d7
MOT4_HUMAN	Monocarboxylate transporter 4	d7
SH3L2_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 2	d7
ANK1_HUMAN	Ankyrin-1	d7
CBR1_HUMAN	Carbonyl reductase [NADPH] 1	d7
GBG5_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	d7
MAST2_HUMAN	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2	d7
FYB1_HUMAN	FYN-binding protein 1	d7
TIMP1_HUMAN	Metalloproteinase inhibitor 1	d7
SEPT2_HUMAN	Septin-2	d7
ABI1_HUMAN	Abl interactor 1	d7
KCY_HUMAN	UMP-CMP kinase	d7
MPP5_HUMAN	MAGUK p55 subfamily member 5	d7
XPO1_HUMAN	Exportin-1	d7
RAB8B_HUMAN	Ras-related protein Rab-8B	d7
GRP2_HUMAN	RAS guanyl-releasing protein 2	d7
PEBP1_HUMAN	Ph	d7
TRXR1_HUMAN	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	d7
NCK2_HUMAN	Cytoplasmic protein NCK2	d7
TPM4_HUMAN	Tropomy	d7
1A02_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain	d7
HV333_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-33	d7
HLAH_HUMAN	Putative HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain H	d7
1B49_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-49 alpha chain	d7
MYLK_HUMAN	My	d7
ACTC_HUMAN	Actin, alpha cardiac muscle 1	d7
PDE5A_HUMAN	cGMP-specific 3',5'-cyclic ph	d7
MOB1A_HUMAN	MOB kinase activator 1A	d7
TSN33_HUMAN	Tetraspanin-33	d7
ST1A4_HUMAN	Sulfotransferase 1A4	d7
E41L2_HUMAN	Band 4.1-like protein 2	d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SH3G3_HUMAN	Endophilin-A3	d7
PRA10_HUMAN	PRAME family member 10	d7
1B18_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-18 alpha chain	d7
KPCB_HUMAN	Protein kinase C beta type	d7
PGM1_HUMAN	Ph	d7
TCO1_HUMAN	Transcobalamin-1	d7
SNAG_HUMAN	Gamma-soluble NSF attachment protein	d7
COL10_HUMAN	Collectin-10	d7
AP1B1_HUMAN	AP-1 complex subunit beta-1	d7
DUS3_HUMAN	Dual specificity protein ph	d7
LAT_HUMAN	Linker for activation of T-cells family member 1	d7
1A68_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain	d7
DCUP_HUMAN	Uroporphyrinogen decarboxylase	d7
ERP29_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 29	d7
1A74_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-74 alpha chain	d7
AT8A2_HUMAN	Ph	d7
SORCN_HUMAN	Sorcin	d7
CE290_HUMAN	Centr	d7
ANXA4_HUMAN	Annexin A4	d7
ODB2_HUMAN	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial	d7
1B08_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-8 alpha chain	d7
1B50_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-50 alpha chain	d7
DOK2_HUMAN	Docking protein 2	d7
ST1A2_HUMAN	Sulfotransferase 1A2	d7
ECE1_HUMAN	Endothelin-converting enzyme 1	d7
PP1G_HUMAN	Serine/threonine-protein ph	d7
BTK_HUMAN	Tyr	d7
PLXA1_HUMAN	Plexin-A1	d7
PGM2_HUMAN	Ph	d7
CPNE8_HUMAN	Copine-8	d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HV321_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-21	d7
LCP2_HUMAN	Lymphocyte cyt	d7
RENBP_HUMAN	N-acylgluc	d7
SOX6_HUMAN	Transcription factor SOX-6	d7
AT2A2_HUMAN	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	d7
GSTM4_HUMAN	Glutathione S-transferase Mu 4	d7
GPX1_HUMAN	Glutathione peroxidase 1	d7
CNN2_HUMAN	Calponin-2	d7
TAOK1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase TAO1	d7
MYL9_HUMAN	My	d7
RTN3_HUMAN	Reticulon-3	d7
SAC1_HUMAN	Ph	d7
PSB8_HUMAN	Proteasome subunit beta type-8	d7
HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta	d7
TCPQ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit theta	d7
DCTN2_HUMAN	Dynactin subunit 2	d7
COX2_HUMAN	Cytochrome c oxidase subunit 2	d7
HNRPK_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	d7
FCG2C_HUMAN	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-c	d7
RB33B_HUMAN	Ras-related protein Rab-33B	d7
EFCB1_HUMAN	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 1	d7
EFNB1_HUMAN	Ephrin-B1	d7
DBNL_HUMAN	Drebrin-like protein	d7
TIMP3_HUMAN	Metalloproteinase inhibitor 3	d7
PCBP1_HUMAN	Poly(rC)-binding protein 1	d7
AT1B3_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	d7
PNCB_HUMAN	Nicotinate ph	d7
MTSS1_HUMAN	Metastasis suppressor protein 1	d7
SAR1B_HUMAN	GTP-binding protein SAR1b	d7
CLIC4_HUMAN	Chloride intracellular channel protein 4	d7
LAMP2_HUMAN	Lys	d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

KDM4C_HUMAN	Lysine-specific demethylase 4C	d7

Anexo IV.II Resultados ampliados del análisis cuantitativo del proteoma de las VEs

Tabla suplementaria 2. Proteínas identificadas diferencialmente expresadas en el análisis cuantitativo del proteoma de las VEs presentes a distintos días de almacenamiento día 2 vs día 7.

Código Uniprot	Proteína	p-value	Mean 1	Mean 2	Fold Change
CD36_HUMAN	Platelet glycoprotein 4	1,9E-11	3,1E+05	1,0E+06	3,0E-01
ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb	2,6E-11	4,2E+06	1,8E+07	2,4E-01
TTYH3_HUMAN	Protein tweety homolog 3	3,1E-11	3,6E+04	7,8E+04	4,6E-01
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	5,3E-11	2,8E+05	6,1E+05	4,7E-01
ITB1_HUMAN	Integrin beta-1	1,1E-10	1,2E+05	2,9E+05	4,0E-01
GSTO1_HUMAN	Glutathione S-transferase omega-1	2,8E-10	6,4E+03	2,5E+04	2,6E-01
PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,5E-10	1,1E+05	3,2E+05	3,5E-01
RB27B_HUMAN	Ras-related protein Rab-27B	5,2E-10	1,5E+05	4,4E+05	3,3E-01
CD9_HUMAN	CD9 antigen	7,4E-10	2,9E+05	1,3E+06	2,3E-01
PARVB_HUMAN	Beta-parvin	1,1E-09	2,5E+05	8,9E+05	2,8E-01
CAH2_HUMAN	Carbonic anhydrase 2	1,3E-09	1,7E+04	8,5E+04	2,0E-01
CAZA1_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-1	1,6E-09	2,4E+04	7,9E+04	3,0E-01
RAB8A_HUMAN	Ras-related protein Rab-8A	2,6E-09	1,4E+04	4,7E+04	3,0E-01
CTL1_HUMAN	Choline transporter-like protein 1	3,0E-09	2,7E+04	8,5E+04	3,2E-01
ITB3_HUMAN	Integrin beta-3	3,2E-09	1,1E+06	4,6E+06	2,4E-01
GNAQ_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	3,9E-09	5,8E+04	1,6E+05	3,6E-01
CDC42_HUMAN	Cell division control protein 42 homolog	4,8E-09	3,1E+04	9,3E+04	3,3E-01
ADA10_HUMAN	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	5,3E-09	8,7E+04	3,0E+05	2,9E-01
GNAI2_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	5,9E-09	1,4E+05	3,6E+05	4,0E-01
ZYX_HUMAN	Zyxin	7,6E-09	2,7E+04	1,1E+05	2,4E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANX11_HUMAN	Annexin A11	1,0E-08	2,2E+04	5,5E+04	4,1E-01
PGK1_HUMAN	Ph	1,1E-08	1,9E+04	6,6E+04	2,8E-01
ALDOA_HUMAN	Fruct	1,2E-08	1,8E+05	6,8E+05	2,6E-01
STOM_HUMAN	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	1,2E-08	4,9E+05	1,9E+06	2,6E-01
LDHB_HUMAN	L-lactate dehydrogenase B chain	1,3E-08	9,2E+04	3,4E+05	2,7E-01
CAB39_HUMAN	Calcium-binding protein 39	1,6E-08	1,4E+04	3,8E+04	3,7E-01
PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	2,2E-08	3,3E+04	1,4E+05	2,4E-01
GELS_HUMAN	Gelsolin	2,4E-08	7,0E+05	1,8E+06	3,8E-01
ERBIN_HUMAN	Erbin	2,5E-08	7,3E+03	1,8E+04	4,0E-01
CLIC1_HUMAN	Chloride intracellular channel protein 1	2,5E-08	9,7E+04	2,7E+05	3,6E-01
ITA6_HUMAN	Integrin alpha-6	2,6E-08	1,6E+05	5,7E+05	2,8E-01
DOK3_HUMAN	Docking protein 3	2,8E-08	3,9E+03	1,5E+04	2,7E-01
ESAM_HUMAN	Endothelial cell-selective adhesion molecule	3,1E-08	2,5E+04	8,8E+04	2,8E-01
ITA2_HUMAN	Integrin alpha-2	3,3E-08	4,1E+04	1,1E+05	3,9E-01
DEST_HUMAN	Destrin	3,5E-08	8,9E+03	6,4E+04	1,4E-01
TSP1_HUMAN	Thromb	3,7E-08	7,3E+06	2,2E+07	3,4E-01
ILEU_HUMAN	Leukocyte elastase inhibitor	3,7E-08	4,8E+04	1,5E+05	3,2E-01
FCN2_HUMAN	Ficolin-2	4,1E-08	8,2E+05	4,4E+05	1,9E+00
HS71B_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1B	4,9E-08	2,4E+04	6,1E+04	3,9E-01
TLN1_HUMAN	Talin-1	5,8E-08	1,8E+06	7,7E+06	2,4E-01
GP1BB_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib beta chain	6,3E-08	1,3E+05	4,9E+05	2,6E-01
RB11B_HUMAN	Ras-related protein Rab-11B	6,9E-08	5,6E+04	1,5E+05	3,8E-01
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-ph	7,1E-08	3,2E+05	1,3E+06	2,4E-01
LFG3_HUMAN	Protein lifeguard 3	7,1E-08	1,0E+04	3,0E+04	3,5E-01
EHD3_HUMAN	EH domain-containing protein 3	7,7E-08	2,7E+04	1,6E+05	1,7E-01
GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	9,6E-08	1,0E+04	4,1E+04	2,5E-01
VINC_HUMAN	Vinculin	9,8E-08	4,7E+05	2,2E+06	2,2E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SNP23_HUMAN	Synapt	1,1E-07	1,7E+04	5,0E+04	3,4E-01
CYFP1_HUMAN	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	1,2E-07	6,7E+04	1,8E+05	3,8E-01
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	1,2E-07	5,0E+05	1,8E+06	2,8E-01
PECA1_HUMAN	Platelet endothelial cell adhesion molecule	1,3E-07	1,1E+05	3,3E+05	3,5E-01
RASA3_HUMAN	Ras GTPase-activating protein 3	1,5E-07	2,0E+04	6,1E+04	3,3E-01
GDIR2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	1,5E-07	1,9E+04	6,4E+04	3,0E-01
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	1,6E-07	1,4E+05	4,1E+05	3,4E-01
RSU1_HUMAN	Ras suppressor protein 1	1,6E-07	2,5E+05	1,3E+06	2,0E-01
STXB2_HUMAN	Syntaxin-binding protein 2	1,8E-07	6,3E+04	1,8E+05	3,5E-01
PTPRJ_HUMAN	Receptor-type tyr	1,9E-07	3,3E+04	1,1E+05	3,0E-01
KAP0_HUMAN	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1,9E-07	2,0E+04	6,4E+04	3,2E-01
URP2_HUMAN	Fermitin family homolog 3	2,1E-07	1,3E+06	5,7E+06	2,2E-01
GTR3_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated gluc	2,2E-07	2,1E+05	1,0E+06	2,1E-01
CTL2_HUMAN	Choline transporter-like protein 2	2,3E-07	1,2E+04	3,4E+04	3,7E-01
CAN1_HUMAN	Calpain-1 catalytic subunit	2,4E-07	4,6E+04	1,4E+05	3,2E-01
1433G_HUMAN	14-3-3 protein gamma	2,4E-07	3,0E+04	9,2E+04	3,2E-01
MYCT1_HUMAN	Myc target protein 1	2,5E-07	4,4E+04	2,1E+05	2,1E-01
EHD1_HUMAN	EH domain-containing protein 1	3,1E-07	1,7E+04	4,5E+04	3,8E-01
STXB3_HUMAN	Syntaxin-binding protein 3	3,1E-07	4,1E+03	1,0E+04	3,9E-01
SH3L3_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	3,4E-07	1,9E+04	8,4E+04	2,2E-01
RL40_HUMAN	Ubiquitin-60S rib	3,5E-07	1,1E+05	2,2E+05	5,0E-01
RAC2_HUMAN	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	3,7E-07	3,0E+04	7,1E+04	4,2E-01
GPIX_HUMAN	Platelet glycoprotein IX	3,9E-07	1,6E+05	5,9E+05	2,6E-01
RAB6B_HUMAN	Ras-related protein Rab-6B	4,4E-07	2,8E+04	7,4E+04	3,7E-01
GSHR_HUMAN	Glutathione reductase, mitochondrial	5,1E-07	9,6E+03	2,8E+04	3,4E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ARPC4_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	5,6E-07	4,4E+04	1,3E+05	3,5E-01
COF1_HUMAN	Cofilin-1	5,7E-07	3,2E+05	2,2E+06	1,5E-01
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM	5,7E-07	1,4E+05	5,1E+05	2,8E-01
TPIS_HUMAN	Tri	6,5E-07	6,9E+04	2,4E+05	2,9E-01
RAB7A_HUMAN	Ras-related protein Rab-7a	6,8E-07	4,0E+04	9,6E+04	4,2E-01
ILK_HUMAN	Integrin-linked protein kinase	7,2E-07	1,2E+05	4,3E+05	2,9E-01
RAB10_HUMAN	Ras-related protein Rab-10	7,4E-07	4,4E+04	1,3E+05	3,5E-01
1433T_HUMAN	14-3-3 protein theta	8,6E-07	8,8E+03	2,8E+04	3,2E-01
1C07_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain	1,1E-06	2,3E+04	5,6E+04	4,1E-01
FLNA_HUMAN	Filamin-A	1,1E-06	2,0E+06	5,4E+06	3,7E-01
STX7_HUMAN	Syntaxin-7	1,3E-06	2,1E+04	3,2E+04	6,6E-01
GRB2_HUMAN	Growth factor receptor-bound protein 2	1,4E-06	6,1E+03	1,9E+04	3,1E-01
PROF1_HUMAN	Profilin-1	1,5E-06	3,0E+05	1,1E+06	2,7E-01
MYADM_HUMAN	Myeloid-associated differentiation marker	1,6E-06	4,8E+03	2,2E+04	2,2E-01
RAP1B_HUMAN	Ras-related protein Rap-1b	1,7E-06	5,1E+05	2,0E+06	2,6E-01
1B50_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-50 alpha chain	2,0E-06	2,8E+04	6,5E+04	4,3E-01
F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	2,1E-06	3,3E+05	8,2E+05	4,1E-01
CCL5_HUMAN	C-C motif chemokine 5	2,5E-06	3,5E+03	3,5E+04	1,0E-01
CATA_HUMAN	Catalase	3,0E-06	1,1E+04	2,0E+04	5,3E-01
MASP2_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 2	3,6E-06	3,0E+04	1,8E+04	1,7E+00
SRC_HUMAN	Proto-oncogene tyr	4,3E-06	9,6E+04	2,7E+05	3,5E-01
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	4,4E-06	1,5E+05	1,1E+05	1,3E+00
LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain	4,5E-06	7,1E+04	2,1E+05	3,3E-01
ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	5,5E-06	1,6E+05	4,3E+05	3,8E-01
1433F_HUMAN	14-3-3 protein eta	6,0E-06	3,4E+04	9,8E+04	3,5E-01
ALBU_HUMAN	Serum albumin	6,2E-06	2,6E+07	1,8E+07	1,5E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	7,6E-06	9,9E+04	3,1E+05	3,2E-01
PNPH_HUMAN	Purine nucle	9,3E-06	3,6E+04	1,0E+05	3,4E-01
CLC1B_HUMAN	C-type lectin domain family 1 member B	9,4E-06	6,7E+03	2,4E+04	2,8E-01
ARC1B_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	1,0E-05	2,2E+04	5,9E+04	3,7E-01
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	1,2E-05	2,9E+04	6,7E+04	4,4E-01
LYAM3_HUMAN	P-selectin	1,2E-05	1,4E+04	3,1E+04	4,5E-01
UN13D_HUMAN	Protein unc-13 homolog D	1,4E-05	1,5E+04	3,2E+04	4,8E-01
GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	1,5E-05	3,1E+04	8,1E+04	3,8E-01
PYGB_HUMAN	Glycogen ph	1,6E-05	1,1E+04	3,1E+04	3,5E-01
MOES_HUMAN	Moesin	1,9E-05	2,0E+05	4,2E+05	4,7E-01
FCN3_HUMAN	Ficolin-3	2,0E-05	3,1E+05	2,1E+05	1,5E+00
TTHY_HUMAN	Transthyretin	2,4E-05	2,2E+05	1,3E+05	1,7E+00
TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2,6E-05	2,6E+04	6,2E+04	4,1E-01
COTL1_HUMAN	Coact	3,5E-05	1,2E+04	3,3E+04	3,5E-01
LIMS1_HUMAN	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	3,5E-05	4,3E+04	2,2E+05	1,9E-01
COR1C_HUMAN	Coronin-1C	3,9E-05	1,7E+04	4,1E+04	4,3E-01
TGFB1_HUMAN	Transforming growth factor beta-1	4,3E-05	9,3E+04	1,7E+05	5,5E-01
COR1A_HUMAN	Coronin-1A	4,7E-05	8,7E+04	1,6E+05	5,5E-01
CAVN2_HUMAN	Caveolae-associated protein 2	4,8E-05	1,3E+04	4,8E+04	2,8E-01
ARF1_HUMAN	ADP-rib	4,8E-05	8,5E+03	2,0E+04	4,3E-01
ARP3_HUMAN	Actin-related protein 3	6,0E-05	2,4E+04	6,2E+04	3,8E-01
VASP_HUMAN	Vasodilator-stimulated ph	9,6E-05	1,4E+04	4,3E+04	3,2E-01
NID1_HUMAN	Nidogen-1	9,8E-05	1,3E+04	2,2E+04	5,7E-01
TSN9_HUMAN	Tetraspanin-9	1,0E-04	1,8E+04	5,3E+04	3,4E-01
HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	1,3E-04	5,7E+03	2,7E+04	2,1E-01
KIF2A_HUMAN	Kinesin-like protein KIF2A	1,3E-04	5,1E+03	1,3E+04	3,9E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NCKP1_HUMAN	Nck-associated protein 1	1,4E-04	1,7E+03	8,3E+03	2,1E-01
LYN_HUMAN	Tyr	1,4E-04	2,2E+04	5,9E+04	3,8E-01
C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C	1,5E-04	2,7E+06	2,0E+06	1,4E+00
C4BPB_HUMAN	C4b-binding protein beta chain	1,6E-04	5,4E+05	4,1E+05	1,3E+00
KV401_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 4-1	1,6E-04	3,2E+06	2,5E+06	1,3E+00
LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	1,7E-04	1,2E+05	1,9E+05	6,4E-01
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	2,0E-04	7,8E+05	6,1E+05	1,3E+00
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	2,1E-04	6,0E+05	4,9E+05	1,2E+00
TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	2,3E-04	8,8E+04	2,0E+05	4,3E-01
TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain	2,3E-04	2,8E+05	6,5E+05	4,3E-01
MGLL_HUMAN	Monoglyceride lipase	2,6E-04	4,7E+03	2,3E+04	2,1E-01
TBA4A_HUMAN	Tubulin alpha-4A chain	3,3E-04	5,0E+04	1,0E+05	4,8E-01
TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	3,3E-04	2,6E+05	5,0E+05	5,1E-01
G6PD_HUMAN	Gluc	5,3E-04	1,4E+04	5,3E+04	2,7E-01
ROCK2_HUMAN	Rho-associated protein kinase 2	5,9E-04	3,9E+03	1,2E+04	3,2E-01
PLEK_HUMAN	Pleckstrin	5,9E-04	5,2E+04	1,6E+05	3,2E-01
IF4A1_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-I	6,2E-04	1,2E+04	2,3E+04	5,0E-01
NP1L1_HUMAN	Nucle	6,6E-04	3,2E+03	1,6E+04	2,0E-01
LG3BP_HUMAN	Galectin-3-binding protein	6,7E-04	1,8E+06	1,3E+06	1,5E+00
SLAF5_HUMAN	SLAM family member 5	8,1E-04	5,6E+03	1,3E+04	4,1E-01
1A74_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-74 alpha chain	8,4E-04	3,8E+04	1,1E+05	3,6E-01
FBLN1_HUMAN	Fibulin-1	8,8E-04	4,8E+04	3,2E+04	1,5E+00
CAZA2_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-2	9,8E-04	5,7E+03	2,5E+04	2,2E-01
PGAM1_HUMAN	Ph	1,2E-03	1,5E+04	3,0E+04	4,9E-01
PLF4_HUMAN	Platelet factor 4	1,2E-03	1,0E+05	2,4E+05	4,3E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TFR1_HUMAN	Transferrin receptor protein 1	1,3E-03	1,0E+05	6,3E+04	1,6E+00
G6PI_HUMAN	Gluc	1,5E-03	2,3E+04	6,0E+04	3,8E-01
CSK_HUMAN	Tyr	1,6E-03	6,7E+03	1,6E+04	4,2E-01
ARPC5_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	1,8E-03	7,9E+03	1,8E+04	4,3E-01
VTNC_HUMAN	Vitronectin	2,0E-03	6,2E+05	1,2E+06	5,3E-01
ML12A_HUMAN	My	2,2E-03	3,6E+04	8,7E+04	4,1E-01
C1QA_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit A	2,2E-03	3,3E+05	2,6E+05	1,3E+00
OIT3_HUMAN	Oncoprotein-induced transcript 3 protein	2,3E-03	1,3E+04	4,8E+03	2,8E+00
ARF4_HUMAN	ADP-rib	2,4E-03	3,9E+03	1,1E+04	3,5E-01
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	2,7E-03	5,9E+04	1,3E+05	4,6E-01
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	3,3E-03	9,5E+07	8,1E+07	1,2E+00
G6B_HUMAN	Megakaryocyte and platelet inhibitory receptor G6b	3,4E-03	2,0E+04	9,3E+04	2,2E-01
GP1BA_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	3,8E-03	2,5E+05	5,0E+05	4,9E-01
FCGBP_HUMAN	IgGFc-binding protein	3,8E-03	2,8E+05	2,2E+05	1,3E+00
CLUS_HUMAN	Clusterin	3,9E-03	1,2E+06	1,7E+06	6,8E-01
PON1_HUMAN	Serum paraoxonase/arylesterase 1	4,4E-03	1,9E+05	2,4E+05	7,7E-01
GNAZ_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha	4,5E-03	9,0E+03	1,9E+04	4,6E-01
IQGA2_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	4,9E-03	5,3E+03	1,1E+04	4,9E-01
ARPC3_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	5,0E-03	3,7E+03	1,2E+04	3,0E-01
CO3_HUMAN	Complement C3	5,4E-03	8,3E+06	6,9E+06	1,2E+00
RAB5C_HUMAN	Ras-related protein Rab-5C	5,4E-03	2,0E+04	3,6E+04	5,7E-01
PI42A_HUMAN	Ph	6,1E-03	5,4E+03	1,6E+04	3,4E-01
PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6	6,4E-03	1,5E+04	3,2E+04	4,7E-01
PSA6_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-6	6,7E-03	4,7E+03	1,1E+04	4,3E-01
VWF_HUMAN	von Willebrand factor	7,0E-03	1,9E+06	8,3E+05	2,3E+00
WDR1_HUMAN	WD repeat-containing protein 1	7,1E-03	7,3E+05	1,9E+06	3,9E-01
HV315_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-15	7,3E-03	9,3E+05	8,0E+05	1,2E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit B	7,4E-03	6,0E+05	4,4E+05	1,3E+00
FINC_HUMAN	Fibronectin	7,6E-03	2,8E+07	1,5E+07	1,9E+00
GPV_HUMAN	Platelet glycoprotein V	8,2E-03	3,5E+04	5,4E+04	6,4E-01
LOX12_HUMAN	Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S-type	8,9E-03	4,2E+03	1,2E+04	3,4E-01
HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2	9,0E-03	1,1E+05	6,4E+04	1,8E+00
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	9,8E-03	6,0E+04	4,4E+04	1,4E+00
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	1,0E-02	5,0E+04	3,7E+04	1,4E+00
CBPN_HUMAN	Carboxypeptidase N catalytic chain	1,1E-02	7,2E+03	4,7E+03	1,5E+00
HV335_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-30-5	1,1E-02	1,0E+06	8,8E+05	1,2E+00
H32_HUMAN	Histone H3.2	1,2E-02	5,5E+04	2,3E+04	2,4E+00
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	1,2E-02	1,7E+05	1,3E+05	1,3E+00
AT1A1_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	1,2E-02	4,5E+03	9,6E+03	4,7E-01
BIP_HUMAN	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1,2E-02	7,5E+04	1,3E+05	5,9E-01
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	1,3E-02	3,9E+04	3,0E+04	1,3E+00
MYL6_HUMAN	My	1,4E-02	8,1E+04	1,5E+05	5,4E-01
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	1,4E-02	2,5E+04	1,2E+04	2,0E+00
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	1,4E-02	5,8E+04	4,1E+04	1,4E+00
CFAB_HUMAN	Complement factor B	1,5E-02	1,7E+05	1,4E+05	1,2E+00
HPTR_HUMAN	Haptoglobin-related protein	1,5E-02	1,0E+06	7,3E+05	1,4E+00
RAB8B_HUMAN	Ras-related protein Rab-8B	1,7E-02	4,2E+03	1,0E+04	4,2E-01
GTR1_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated gluc	1,7E-02	3,8E+04	2,5E+04	1,5E+00
RAB1B_HUMAN	Ras-related protein Rab-1B	1,8E-02	5,0E+03	8,4E+03	6,0E-01
STX11_HUMAN	Syntaxin-11	1,8E-02	1,5E+04	7,0E+04	2,1E-01
HV307_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-7	1,9E-02	2,0E+05	1,6E+05	1,2E+00
HV428_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-28	2,0E-02	3,0E+04	2,1E+04	1,4E+00
ARPC2_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	2,2E-02	6,1E+03	1,2E+04	5,2E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha	2,3E-02	3,5E+03	9,5E+03	3,7E-01
KV311_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-11	3,0E-02	2,4E+06	2,1E+06	1,1E+00
HV601_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 6-1	3,1E-02	2,1E+05	1,5E+05	1,4E+00
LBP_HUMAN	Lipopolysaccharide-binding protein	3,1E-02	1,6E+05	8,6E+04	1,8E+00
AMBP_HUMAN	Protein AMBP	3,2E-02	2,3E+04	1,6E+04	1,4E+00
ARP2_HUMAN	Actin-related protein 2	3,2E-02	9,0E+03	2,0E+04	4,5E-01
TAGL2_HUMAN	Transgelin-2	3,4E-02	3,8E+04	6,9E+04	5,5E-01
DHB4_HUMAN	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	3,5E-02	1,8E+04	2,7E+04	6,7E-01
GPDM_HUMAN	Glycerol-3-ph	3,8E-02	6,9E+03	1,3E+04	5,3E-01
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	3,9E-02	5,0E+05	3,6E+05	1,4E+00
FYB1_HUMAN	FYN-binding protein 1	4,0E-02	7,9E+03	2,0E+04	3,9E-01
RAB32_HUMAN	Ras-related protein Rab-32	4,3E-02	1,1E+04	1,7E+04	6,3E-01
IGLL5_HUMAN	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	4,4E-02	2,5E+05	2,0E+05	1,2E+00
CO8A_HUMAN	Complement component C8 alpha chain	4,4E-02	1,2E+05	3,4E+05	3,4E-01
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	4,4E-02	1,0E+06	7,6E+05	1,4E+00
SAC1_HUMAN	Ph	4,6E-02	4,6E+03	8,8E+03	5,2E-01
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	4,6E-02	5,4E+05	4,4E+05	1,2E+00
MASP1_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 1	4,9E-02	7,2E+04	5,0E+04	1,4E+00
PACN2_HUMAN	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	5,0E-02	7,8E+03	1,3E+04	5,9E-01
KVD07_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3D-7	5,0E-02	5,7E+04	4,0E+04	1,4E+00
B3AT_HUMAN	Band 3 anion transport protein	5,1E-02	1,1E+05	8,3E+04	1,4E+00
SNAA_HUMAN	Alpha-soluble NSF attachment protein	5,2E-02	4,5E+03	8,2E+03	5,5E-01
CALX_HUMAN	Calnexin	5,2E-02	1,7E+04	3,3E+04	5,1E-01
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	5,3E-02	1,1E+04	1,8E+04	6,1E-01
KV315_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-15	5,5E-02	3,0E+05	2,5E+05	1,2E+00
IGHA1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	5,5E-02	5,6E+06	5,0E+06	1,1E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INF2_HUMAN	Inverted formin-2	5,6E-02	3,3E+03	7,1E+03	4,7E-01
CO7_HUMAN	Complement component C7	5,8E-02	1,2E+05	4,2E+05	2,9E-01
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cyt	5,8E-02	2,0E+05	2,8E+05	7,0E-01
IGHG1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	5,9E-02	4,8E+06	4,0E+06	1,2E+00
HV349_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-49	5,9E-02	2,6E+05	2,2E+05	1,2E+00
IDHP_HUMAN	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	6,3E-02	2,5E+04	4,1E+04	6,1E-01
CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1	6,3E-02	4,4E+04	6,2E+04	7,0E-01
CO8B_HUMAN	Complement component C8 beta chain	6,4E-02	3,3E+05	7,2E+05	4,6E-01
CO8G_HUMAN	Complement component C8 gamma chain	6,5E-02	1,8E+05	5,4E+05	3,3E-01
CO9_HUMAN	Complement component C9	6,8E-02	4,2E+05	1,6E+06	2,6E-01
MYH9_HUMAN	My	7,0E-02	8,4E+05	1,5E+06	5,5E-01
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	7,3E-02	3,6E+05	2,9E+05	1,3E+00
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	7,3E-02	4,1E+05	2,4E+05	1,7E+00
HPT_HUMAN	Haptoglobin	7,3E-02	1,5E+06	1,2E+06	1,2E+00
ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	7,4E-02	8,1E+04	1,2E+05	6,6E-01
CO6_HUMAN	Complement component C6	7,4E-02	1,7E+05	5,8E+05	2,9E-01
CALR_HUMAN	Calreticulin	7,5E-02	3,8E+03	6,2E+03	6,2E-01
KV224_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2-24	7,6E-02	4,2E+05	3,6E+05	1,2E+00
ADT3_HUMAN	ADP/ATP translocase 3	7,6E-02	2,3E+04	3,5E+04	6,5E-01
APOA_HUMAN	Apolipoprotein(a)	8,4E-02	3,6E+05	2,4E+05	1,5E+00
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	8,5E-02	2,4E+05	2,0E+05	1,2E+00
GBB2_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	8,7E-02	7,3E+03	1,0E+04	7,0E-01
PCBP1_HUMAN	Poly(rC)-binding protein 1	8,9E-02	1,6E+04	2,6E+04	6,2E-01
KV320_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-20	9,2E-02	3,1E+06	2,7E+06	1,1E+00
C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent	9,2E-02	3,6E+05	2,8E+05	1,3E+00
PROP_HUMAN	Properdin	9,4E-02	2,0E+04	1,7E+04	1,1E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1B35_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-35 alpha chain	9,8E-02	5,7E+03	1,1E+04	5,4E-01
CD5L_HUMAN	CD5 antigen-like	9,8E-02	1,8E+06	1,5E+06	1,2E+00
TKT_HUMAN	Transketolase	1,0E-01	6,2E+04	3,2E+04	2,0E+00
TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon	1,0E-01	1,5E+04	2,6E+04	5,9E-01
SRC8_HUMAN	Src substrate cortactin	1,0E-01	1,0E+04	1,9E+04	5,4E-01
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	1,0E-01	6,0E+05	4,9E+05	1,2E+00
CO5_HUMAN	Complement C5	1,1E-01	9,1E+05	2,0E+06	4,5E-01
LV151_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-51	1,1E-01	2,3E+04	1,4E+04	1,6E+00
PARK7_HUMAN	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	1,1E-01	6,3E+03	1,1E+04	5,8E-01
PTPRC_HUMAN	Receptor-type tyr	1,1E-01	2,2E+04	2,8E+04	7,9E-01
TBX21_HUMAN	T-box transcription factor TBX21	1,1E-01	1,8E+04	3,5E+04	5,1E-01
HV205_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 2-5	1,1E-01	7,3E+04	5,5E+04	1,3E+00
IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor	1,2E-01	1,8E+05	2,1E+05	8,5E-01
PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	1,2E-01	9,5E+04	7,9E+04	1,2E+00
MMRN1_HUMAN	Multimerin-1	1,2E-01	1,2E+06	1,5E+06	7,9E-01
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component	1,3E-01	1,0E+05	8,8E+04	1,2E+00
FA12_HUMAN	Coagulation factor XII	1,3E-01	1,3E+04	1,0E+04	1,3E+00
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cyt	1,3E-01	1,1E+06	1,4E+06	8,1E-01
KVD29_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-29	1,3E-01	1,5E+04	9,6E+03	1,6E+00
SODM_HUMAN	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	1,4E-01	4,9E+04	6,8E+04	7,1E-01
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	1,4E-01	1,3E+07	1,0E+07	1,2E+00
RAP2B_HUMAN	Ras-related protein Rap-2b	1,4E-01	7,8E+03	1,4E+04	5,6E-01
HV551_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 5-51	1,4E-01	5,3E+05	4,7E+05	1,1E+00
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	1,4E-01	1,4E+07	1,1E+07	1,3E+00
KV621_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 6-21	1,5E-01	9,9E+04	8,9E+04	1,1E+00
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	1,5E-01	1,5E+07	1,2E+07	1,3E+00
THAS_HUMAN	Thromboxane-A synthase	1,6E-01	7,1E+03	1,0E+04	6,8E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

KV105_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-5	1,6E-01	1,9E+05	1,7E+05	1,2E+00
SDCB1_HUMAN	Syntenin-1	1,6E-01	5,7E+04	4,1E+04	1,4E+00
S10A8_HUMAN	Protein S100-A8	1,6E-01	2,3E+04	1,9E+04	1,2E+00
RAB37_HUMAN	Ras-related protein Rab-37	1,7E-01	1,5E+04	1,1E+04	1,4E+00
LRC32_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 32	1,8E-01	6,5E+03	8,4E+03	7,7E-01
LV861_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 8-61	1,8E-01	5,1E+04	7,1E+04	7,2E-01
PR	Vitamin K-dependent protein S	1,8E-01	2,5E+06	2,2E+06	1,1E+00
ANXA4_HUMAN	Annexin A4	1,8E-01	7,3E+03	1,0E+04	7,1E-01
FA11_HUMAN	Coagulation factor XI	1,8E-01	7,9E+04	5,4E+04	1,4E+00
IGHA2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	1,8E-01	1,6E+05	1,4E+05	1,2E+00
HV374_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-74	1,9E-01	3,3E+04	2,8E+04	1,2E+00
KLKB1_HUMAN	Plasma kallikrein	1,9E-01	4,2E+04	3,4E+04	1,2E+00
AT2A3_HUMAN	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	1,9E-01	4,7E+04	6,5E+04	7,2E-01
AK1C2_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member C2	1,9E-01	9,8E+03	1,9E+04	5,2E-01
HV364_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-64	1,9E-01	1,6E+05	1,4E+05	1,2E+00
IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	1,9E-01	1,2E+04	2,6E+04	4,7E-01
LV743_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 7-43	2,0E-01	5,0E+04	4,4E+04	1,1E+00
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	2,1E-01	2,4E+06	2,1E+06	1,1E+00
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	2,2E-01	1,3E+06	1,1E+06	1,1E+00
ESYT1_HUMAN	Extended synaptotagmin-1	2,3E-01	7,0E+03	9,9E+03	7,1E-01
IGKC_HUMAN	Immunoglobulin kappa constant	2,3E-01	1,6E+07	1,3E+07	1,2E+00
GBB1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	2,3E-01	9,8E+03	1,4E+04	6,9E-01
IGHG4_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	2,3E-01	1,9E+05	1,6E+05	1,2E+00
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1	2,4E-01	8,6E+05	7,4E+05	1,2E+00
THRB_HUMAN	Prothrombin	2,5E-01	1,3E+04	1,6E+04	8,4E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PRDX3_HUMAN	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	2,5E-01	1,2E+04	1,5E+04	7,7E-01
WASF2_HUMAN	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	2,5E-01	2,1E+04	1,2E+04	1,7E+00
CO4B_HUMAN	Complement C4-B	2,5E-01	5,0E+05	5,4E+05	9,3E-01
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	2,6E-01	1,3E+06	9,1E+05	1,4E+00
ATPB_HUMAN	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	2,6E-01	9,3E+04	1,1E+05	8,2E-01
OLFM4_HUMAN	Olfactomedin-4	2,6E-01	2,2E+04	1,6E+04	1,3E+00
CROCC_HUMAN	Rootletin	2,7E-01	1,5E+04	1,1E+04	1,4E+00
AK1C3_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member C3	2,7E-01	1,2E+04	7,9E+03	1,5E+00
LCP2_HUMAN	Lymphocyte cyt	2,8E-01	3,0E+03	4,4E+03	6,8E-01
HEMO_HUMAN	Hemopexin	2,8E-01	2,7E+04	2,3E+04	1,2E+00
K1C18_HUMAN	Keratin, type I cyt	2,8E-01	1,4E+03	1,9E+03	7,5E-01
CPN2_HUMAN	Carboxypeptidase N subunit 2	2,8E-01	2,5E+04	2,9E+04	8,6E-01
RAB14_HUMAN	Ras-related protein Rab-14	2,8E-01	3,4E+04	4,1E+04	8,2E-01
PRAF3_HUMAN	PRA1 family protein 3	2,8E-01	2,2E+04	3,0E+04	7,5E-01
LV469_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 4-69	2,9E-01	3,6E+04	2,9E+04	1,3E+00
IF5AL_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	2,9E-01	3,8E+03	2,0E+03	1,9E+00
PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2	3,0E-01	2,4E+04	2,0E+04	1,2E+00
KVD08_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-8	3,0E-01	3,0E+05	2,8E+05	1,1E+00
MDHM_HUMAN	Malate dehydrogenase, mitochondrial	3,0E-01	4,3E+03	1,6E+03	2,7E+00
CD226_HUMAN	CD226 antigen	3,0E-01	1,2E+04	1,8E+04	6,7E-01
EM55_HUMAN	55 kDa erythrocyte membrane protein	3,3E-01	1,0E+04	1,5E+04	6,9E-01
EMIL1_HUMAN	EMILIN-1	3,3E-01	4,4E+05	4,8E+05	9,1E-01
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain	3,5E-01	5,1E+06	4,7E+06	1,1E+00
K1C14_HUMAN	Keratin, type I cyt	3,6E-01	1,6E+04	1,3E+04	1,2E+00
GDIR1_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	3,7E-01	2,1E+04	2,8E+04	
HV226_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 2-26	3,8E-01	1,3E+04	1,2E+04	1,1E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HV459_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-59	3,8E-01	5,3E+04	4,7E+04	1,1E+00
CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	3,9E-01	4,5E+04	2,9E+04	1,6E+00
PHB_HUMAN	Prohibitin	4,0E-01	1,0E+04	8,3E+03	1,2E+00
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	4,1E-01	1,0E+06	1,2E+06	8,7E-01
KV116_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-16	4,2E-01	3,2E+04	2,9E+04	1,1E+00
KV117_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-17	4,2E-01	7,9E+04	7,2E+04	1,1E+00
RL9_HUMAN	60S rib	4,3E-01	7,9E+03	1,1E+04	7,0E-01
6PGD_HUMAN	6-ph	4,3E-01	4,5E+04	5,4E+04	8,3E-01
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	4,3E-01	1,3E+04	1,0E+04	1,3E+00
LV218_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 2-18	4,3E-01	7,5E+04	6,6E+04	1,1E+00
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	4,4E-01	1,1E+04	1,4E+04	8,1E-01
APT_HUMAN	Adenine ph	4,8E-01	3,2E+03	4,0E+03	8,1E-01
CFAI_HUMAN	Complement factor I	4,9E-01	2,5E+04	2,7E+04	9,4E-01
LV319_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-19	4,9E-01	1,5E+05	1,4E+05	1,1E+00
PTN6_HUMAN	Tyr	5,0E-01	2,1E+04	2,4E+04	8,6E-01
FHR1_HUMAN	Complement factor H-related protein 1	5,0E-01	6,3E+04	6,7E+04	9,4E-01
VDAC3_HUMAN	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	5,0E-01	1,1E+04	1,4E+04	8,1E-01
K22E_HUMAN	Keratin, type II cyt	5,1E-01	1,6E+05	1,5E+05	1,1E+00
HVD82_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-38-2	5,1E-01	8,9E+03	1,0E+04	8,7E-01
ECE1_HUMAN	Endothelin-converting enzyme 1	5,3E-01	1,5E+04	1,2E+04	1,3E+00
PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	5,4E-01	1,0E+03	1,3E+03	8,4E-01
KVD39_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-39	5,4E-01	6,8E+04	6,4E+04	1,1E+00
KV230_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2-30	5,5E-01	2,6E+05	2,4E+05	1,1E+00
TCPB_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta	5,6E-01	7,0E+03	4,8E+03	1,4E+00
KV133_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-33	5,7E-01	1,1E+05	1,1E+05	1,0E+00
PSA2_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-2	5,7E-01	1,0E+04	1,1E+04	8,8E-01
KV113_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-13	5,7E-01	1,4E+05	1,2E+05	1,1E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AK1BA_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member B10	5,9E-01	3,5E+03	2,2E+03	1,6E+00
ENDD1_HUMAN	Endonuclease domain-containing 1 protein	5,9E-01	1,2E+04	1,4E+04	8,7E-01
HV64D_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-64D	5,9E-01	3,1E+04	2,8E+04	1,1E+00
FLOT1_HUMAN	Flotillin-1	5,9E-01	3,7E+03	4,2E+03	8,6E-01
LV310_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-10	6,0E-01	4,6E+04	3,6E+04	1,3E+00
HV102_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 1-2	6,0E-01	9,0E+05	8,2E+05	1,1E+00
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	6,1E-01	2,6E+04	3,0E+04	8,7E-01
TCPG_HUMAN	T-complex protein 1 subunit gamma	6,1E-01	3,2E+03	3,9E+03	8,2E-01
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	6,2E-01	1,9E+05	1,8E+05	1,0E+00
IGHG3_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	6,3E-01	5,8E+04	6,3E+04	9,2E-01
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	6,4E-01	2,4E+04	2,3E+04	1,0E+00
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cyt	6,5E-01	2,9E+05	2,8E+05	1,0E+00
EF1A3_HUMAN	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	6,6E-01	1,3E+04	1,5E+04	9,2E-01
BLVRB_HUMAN	Flavin reductase (NADPH)	6,6E-01	2,1E+03	3,0E+03	7,2E-01
ALDR_HUMAN	Ald	6,6E-01	2,0E+04	1,6E+04	1,3E+00
BGH3_HUMAN	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	6,6E-01	9,6E+03	8,5E+03	1,1E+00
VIME_HUMAN	Vimentin	6,6E-01	1,1E+04	1,4E+04	8,2E-01
ACLY_HUMAN	ATP-citrate synthase	6,7E-01	5,0E+03	6,9E+03	7,2E-01
HV146_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 1-46	6,8E-01	1,6E+05	1,5E+05	1,1E+00
HV309_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-9	6,9E-01	7,2E+04	6,7E+04	1,1E+00
EF2_HUMAN	Elongation factor 2	7,1E-01	5,4E+03	4,8E+03	1,1E+00
LV147_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-47	7,3E-01	8,1E+05	7,9E+05	1,0E+00
RPN1_HUMAN	Dolichyl-diph	7,4E-01	8,8E+03	9,8E+03	9,0E-01
TCPZ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta	7,4E-01	2,2E+03	2,0E+03	1,1E+00
APOD_HUMAN	Apolipoprotein D	7,5E-01	3,5E+04	3,3E+04	1,1E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	7,5E-01	2,5E+04	2,3E+04	1,1E+00
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	7,6E-01	1,6E+04	1,7E+04	9,5E-01
LV321_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-21	7,7E-01	2,3E+05	2,4E+05	9,5E-01
AK1C1_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member C1	7,8E-01	7,6E+03	6,6E+03	1,2E+00
F13B_HUMAN	Coagulation factor XIII B chain	8,0E-01	2,5E+04	2,4E+04	1,0E+00
ANXA2_HUMAN	Annexin A2	8,0E-01	4,0E+03	3,7E+03	1,1E+00
IGHG2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	8,1E-01	4,8E+05	4,9E+05	9,6E-01
ENPL_HUMAN	Endoplasmin	8,1E-01	4,3E+04	4,6E+04	9,4E-01
UBA1_HUMAN	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	8,1E-01	1,3E+04	1,2E+04	1,1E+00
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	8,2E-01	1,2E+04	1,1E+04	1,1E+00
FA5_HUMAN	Coagulation factor V	8,2E-01	2,7E+05	2,6E+05	1,0E+00
LV214_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 2-14	8,2E-01	2,3E+04	2,6E+04	9,1E-01
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	8,2E-01	5,6E+05	5,5E+05	1,0E+00
KVD12_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-12	8,5E-01	3,3E+04	3,4E+04	9,8E-01
KVD28_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-28	8,5E-01	2,4E+05	2,4E+05	1,0E+00
AL1A1_HUMAN	Retinal dehydrogenase 1	8,7E-01	4,1E+04	3,9E+04	1,1E+00
NQO1_HUMAN	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	8,8E-01	6,3E+03	6,7E+03	9,4E-01
HV372_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-72	8,8E-01	1,1E+05	1,1E+05	1,0E+00
HV323_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-23	9,0E-01	8,6E+04	8,7E+04	9,8E-01
PLMN_HUMAN	Plasminogen	9,1E-01	1,3E+05	1,3E+05	9,8E-01
IGLC2_HUMAN	Immunoglobulin lambda constant 2	9,3E-01	1,4E+07	1,4E+07	1,0E+00
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	9,5E-01	4,8E+04	4,8E+04	1,0E+00
SAA4_HUMAN	Serum amyloid A-4 protein	9,5E-01	3,5E+04	3,5E+04	9,9E-01
PSB3_HUMAN	Proteasome subunit beta type-3	9,6E-01	3,3E+03	3,3E+03	1,0E+00
PSB2_HUMAN	Proteasome subunit beta type-2	9,6E-01	2,4E+03	2,4E+03	9,9E-01
LV325_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-25	9,7E-01	1,0E+05	1,0E+05	1,0E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CFAH_HUMAN	Complement factor H	9,7E-01	1,8E+06	1,8E+06	1,0E+00
ICAM2_HUMAN	Intercellular adhesion molecule 2	9,7E-01	6,1E+03	6,0E+03	1,0E+00
LV208_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 2-8	9,8E-01	9,4E+04	9,4E+04	1,0E+00
LV949_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 9-49	9,9E-01	6,0E+04	6,0E+04	1,0E+00
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	9,9E-01	5,4E+06	5,4E+06	1,0E+00

ANEXO V. RESULTADOS AMPLIADOS DEL ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL PROTEÓMICO DEL SECRETOMA DE LAS MEMBRANAS L-PRF

Anexo V.I Resultados ampliados del análisis cualitativo del perfil del secretoma de las membranas L-PRF a día 3 de cultivo

Tabla suplementaria 3. Proteínas identificadas en el análisis cualitativo del secretoma de las membranas L-PRF a día 3 de cultivo. Las proteínas se identificaron empleando dos aproximaciones proteómicas, concentrar la proteína en una única banda mediante electroforesis monodimensional SDS-PAGE (C) o correr una electroforesis completa y cortar todas las bandas del perfil proteico (B). La columna de aproximación indica mediante que aproximación se identificaron las proteínas, ambas (C+B), concentrando en una banda (C) o corriendo la electroforesis completa y cortando bandas (B).

Código Uniprot	Nombre de la proteína	Aproximación
TPM4_HUMAN	Tropomyosin alpha-4 chain	C + B
ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4	C + B
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	C + B
CATA_HUMAN	Catalase	C + B
ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A	C + B
CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	C + B
PNPH_HUMAN	Purine nucleoside phosphorylase	C + B
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	C + B
RSU1_HUMAN	Ras suppressor protein 1	C + B
PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase 1	C + B
PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	C + B
TAGL2_HUMAN	Transgelin-2	C + B
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM	C + B
LKHA4_HUMAN	Leukotriene A-4 hydrolase	C + B
CAH2_HUMAN	Carbonic anhydrase 2	C + B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain	C + B
GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	C + B
6PGD_HUMAN	6-phosphogluconate dehydrogenase	C + B
IGKC_HUMAN	Immunoglobulin kappa constant	C + B
S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	C + B
CYRIB_HUMAN	CYFIP-related Rac1 interactor B	C + B
VIME_HUMAN	Vimentin	C + B
GDIR2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	C + B
ARPC2_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	C + B
RB11B_HUMAN	Ras-related protein Rab-11B	C + B
MDHC_HUMAN	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	C + B
TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	C + B
CAPZB_HUMAN	F-actin-capping protein subunit beta	C + B
PSME1_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 1	C + B
CAZA1_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-1	C + B
COF1_HUMAN	Cofilin-1	C + B
CAN1_HUMAN	Calpain-1 catalytic subunit	C + B
COR1A_HUMAN	Coronin-1A	C + B
IGLC3_HUMAN	Immunoglobulin lambda constant 3	C + B
PGM2_HUMAN	Phosphoglucomutase-2	C + B
TALDO_HUMAN	Transaldolase	C + B
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	C + B
ARP3_HUMAN	Actin-related protein 3	C + B
TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain	C + B
CRKL_HUMAN	Crk-like protein	C + B
CNDP2_HUMAN	Cytosolic non-specific dipeptidase	C + B
H2B1L_HUMAN	Histone H2B type 1-L	C + B
UBE2N_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	C + B
UB2L3_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	C + B
PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2	C + B
SPTN1_HUMAN	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	C + B
COTL1_HUMAN	Coactosin-like protein	C + B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NAMPT_HUMAN	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	C + B
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	C + B
MYL6_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	C + B
SH3L3_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	C + B
SODM_HUMAN	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	C + B
CAPG_HUMAN	Macrophage-capping protein	C + B
UB2V1_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	C + B
PSA2_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-2	C + B
PYGB_HUMAN	Glycogen phosphorylase, brain form	C + B
STOM_HUMAN	Stomatin	C + B
SH3L2_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 2	C + B
SODC_HUMAN	Superoxide dismutase	C + B
GLOD4_HUMAN	Glyoxalase domain-containing protein 4	C + B
CPNS1_HUMAN	Calpain small subunit 1	C + B
CAB39_HUMAN	Calcium-binding protein 39	C + B
THIO_HUMAN	Thioredoxin	C + B
FKB1A_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	C + B
PRDX5_HUMAN	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	C + B
MDHM_HUMAN	Malate dehydrogenase, mitochondrial	C + B
PSA6_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-6	C + B
PSB3_HUMAN	Proteasome subunit beta type-3	C + B
PRDX3_HUMAN	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	C + B
PSA3_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-3	C + B
ML12A_HUMAN	Myosin regulatory light chain 12A	C + B
PSB1_HUMAN	Proteasome subunit beta type-1	C + B
CLIC1_HUMAN	Chloride intracellular channel protein 1	C + B
SH3L1_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	C + B
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	C + B
ARPC3_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	C + B
NDKA_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase A	C + B
ROA2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	C + B
IGHG3_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	C + B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RAB7A_HUMAN	Ras-related protein Rab-7a	C + B
PEPD_HUMAN	Xaa-Pro dipeptidase	C + B
PSA_HUMAN	Puromycin-sensitive aminopeptidase	C + B
ARPC5_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	C + B
ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	C + B
CSRP1_HUMAN	Cysteine and glycine-rich protein 1	C + B
EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma	C + B
ENOG_HUMAN	Gamma-enolase	C + B
FILA2_HUMAN	Filaggrin-2	C + B
FRIH_HUMAN	Ferritin heavy chain	C + B
G6PD_HUMAN	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	C + B
HEBP2_HUMAN	Heme-binding protein 2	C + B
HPCL1_HUMAN	Hippocalcin-like protein 1	C + B
HPRT_HUMAN	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	C + B
IMB1_HUMAN	Importin subunit beta-1	C + B
KAPCA_HUMAN	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	C + B
PSB2_HUMAN	Proteasome subunit beta type-2	C + B
PSB8_HUMAN	Proteasome subunit beta type-8	C + B
PYGL_HUMAN	Glycogen phosphorylase, liver form	C + B
TRXR1_HUMAN	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	C + B
UGPA_HUMAN	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	C + B
XRP2_HUMAN	Protein XRP2	C + B
XRCC6_HUMAN	X-ray repair cross-complementing protein 6	C + B
LYAM3_HUMAN	P-selectin	C + B
LIMS1_HUMAN	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	C + B
HXK3_HUMAN	Hexokinase-3	C + B
ILF2_HUMAN	Interleukin enhancer-binding factor 2	C + B
TBA1C_HUMAN	Tubulin alpha-1C chain	C + B
VAPA_HUMAN	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	C + B
ASC_HUMAN	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	C + B
GRAP2_HUMAN	GRB2-related adapter protein 2	C + B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AP2A1_HUMAN	AP-2 complex subunit alpha-1	C + B
HXK1_HUMAN	Hexokinase-1	C + B
PSB10_HUMAN	Proteasome subunit beta type-10	C + B
IF4G2_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	C + B
FHL1_HUMAN	Four and a half LIM domains protein 1	C + B
EPN4_HUMAN	Clathrin interactor 1	C + B
MARE1_HUMAN	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	C + B
EFHD2_HUMAN	EF-hand domain-containing protein D2	C + B
PITH1_HUMAN	PITH domain-containing protein 1	C + B
LHPP_HUMAN	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	C + B
PARVB_HUMAN	Beta-parvin	C + B
TMOD3_HUMAN	Tropomodulin-3	C + B
COR1C_HUMAN	Coronin-1C	C + B
APEX1_HUMAN	DNA-	C + B
GDIA_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	C + B
GDIR1_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	C + B
SHRM3_HUMAN	Protein Shroom3	C + B
ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb	C + B
MMP9_HUMAN	Matrix metalloproteinase-9	C + B
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	C + B
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	C + B
CALR_HUMAN	Calreticulin	C + B
PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	C + B
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	C + B
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	C + B
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	C + B
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	C + B
PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase	C + B
TTHY_HUMAN	Transthyretin	C + B
FBLN1_HUMAN	Fibulin-1	C + B
GPV_HUMAN	Platelet glycoprotein V	C + B
CH3L1_HUMAN	Chitinase-3-like protein 1	C + B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TIMP1_HUMAN	Metalloproteinase inhibitor 1	C + B
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component	C + B
CFAH_HUMAN	Complement factor H	C + B
BGH3_HUMAN	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	C + B
ENDD1_HUMAN	Endonuclease domain-containing 1 protein	C + B
CLUS_HUMAN	Clusterin	C + B
THRB_HUMAN	Prothrombin	C + B
FBLN3_HUMAN	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	C + B
PRTN3_HUMAN	Myeloblastin	C + B
VTNC_HUMAN	Vitronectin	C + B
NID2_HUMAN	Nidogen-2	C + B
FGL1_HUMAN	Fibrinogen-like protein 1	C + B
JAM1_HUMAN	Junctional adhesion molecule A	C + B
LG3BP_HUMAN	Galectin-3-binding protein	C + B
CATD_HUMAN	Cathepsin D	C + B
CAP7_HUMAN	Azurocidin	C + B
NNRE_HUMAN	NAD	C + B
MYDGF_HUMAN	Myeloid-derived growth factor	C + B
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	C + B
IPSP_HUMAN	Plasma serine protease inhibitor	C + B
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	C + B
CD9_HUMAN	CD9 antigen	C + B
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	C + B
CAMP_HUMAN	Cathelicidin antimicrobial peptide	C + B
DEF3_HUMAN	Neutrophil defensin 3	C + B
FETUB_HUMAN	Fetuin-B	C + B
HV323_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-23	C + B
ITB1_HUMAN	Integrin beta-1	C + B
KV230_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2-30	C + B
LV321_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-21	C + B
PAI1_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 1	C + B
PECA1_HUMAN	Platelet endothelial cell adhesion molecule	C + B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

GDN_HUMAN	Glia-derived nexin	C + B
SPRC_HUMAN	SPARC	C + B
PLF4_HUMAN	Platelet factor 4	C + B
F13B_HUMAN	Coagulation factor XIII B chain	C + B
CD36_HUMAN	Platelet glycoprotein 4	C + B
MMP8_HUMAN	Neutrophil collagenase	C + B
LC1L1_HUMAN	Putative lipocalin 1-like protein 1	C + B
PRG4_HUMAN	Proteoglycan 4	C + B
COL10_HUMAN	Collectin-10	C + B
GP1BB_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib beta chain	C + B
FLNA_HUMAN	Filamin-A	C + B
MYH9_HUMAN	Myosin-9	C + B
TLN1_HUMAN	Talin-1	C + B
ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	C + B
VINC_HUMAN	Vinculin	C + B
PLSL_HUMAN	Plastin-2	C + B
MOES_HUMAN	Moesin	C + B
TKT_HUMAN	Transketolase	C + B
IGHM_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant mu	C + B
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	C + B
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	C + B
IGHA1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	C + B
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	C + B
TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	C + B
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	C + B
IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	C + B
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	C + B
URP2_HUMAN	Fermitin family homolog 3	C + B
RL40_HUMAN	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	C + B
ANXA6_HUMAN	Annexin A6	C + B
HS71B_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1B	C + B
F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	C + B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta	C + B
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain	C + B
FINC_HUMAN	Fibronectin	C + B
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	C + B
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	C + B
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	C + B
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	C + B
CO3_HUMAN	Complement C3	C + B
TSP1_HUMAN	Thrombospondin-1	C + B
VWF_HUMAN	von Willebrand factor	C + B
ALBU_HUMAN	Albumin	C + B
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	C + B
PLMN_HUMAN	Plasminogen	C + B
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	C + B
PERM_HUMAN	Myeloperoxidase	C + B
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	C + B
CO4B_HUMAN	Complement C4-B	C + B
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	C + B
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	C + B
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	C + B
CPN2_HUMAN	Carboxypeptidase N subunit 2	C + B
BIP_HUMAN	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	C + B
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	C + B
FBLN5_HUMAN	Fibulin-5	C + B
LYSC_HUMAN	Lysozyme C	C + B
HEMO_HUMAN	Hemopexin	C + B
TRY1_HUMAN	Trypsin-1	C + B
MMRN1_HUMAN	Multimerin-1	C + B
MASP1_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 1	C + B
HLAB_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain	C + B
K2C6A_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A	C
K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B	C

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	C
ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	C
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	C
ILEU_HUMAN	Leukocyte elastase inhibitor	C
LDHB_HUMAN	L-lactate dehydrogenase B chain	C
TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	C
IGHG1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	C
PROF1_HUMAN	Profilin-1	C
SPB6_HUMAN	Serpin B6	C
PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	C
SPB9_HUMAN	Serpin B9	C
CAH1_HUMAN	Carbonic anhydrase 1	C
1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha	C
RB27B_HUMAN	Ras-related protein Rab-27B	C
PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	C
TWF2_HUMAN	Twinfilin-2	C
KAD2_HUMAN	Adenylate kinase 2, mitochondrial	C
GRB2_HUMAN	Growth factor receptor-bound protein 2	C
S10A8_HUMAN	Protein S100-A8	C
SPTB2_HUMAN	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	C
RAP1B_HUMAN	Ras-related protein Rap-1b	C
PSME2_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 2	C
PARK7_HUMAN	Parkinson disease protein 7	C
6PGL_HUMAN	6-phosphogluconolactonase	C
PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	C
PTPA_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	C
TPM3_HUMAN	Tropomyosin alpha-3 chain	C
GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	C
ARF1_HUMAN	ADP-ribosylation factor 1	C
ARP2_HUMAN	Actin-related protein 2	C
PSA7_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-7	C
PEBP1_HUMAN	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	C

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ARPC4_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	C
GSTO1_HUMAN	Glutathione S-transferase omega-1	C
PLEC_HUMAN	Plectin	C
H4_HUMAN	Histone H4	C
HDHD2_HUMAN	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	C
PTBP1_HUMAN	Polypyrimidine tract-binding protein 1	C
IGHG2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	C
WDR1_HUMAN	WD repeat-containing protein 1	C
UB2V2_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	C
K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	C
1433G_HUMAN	14-3-3 protein gamma	C
H2A2A_HUMAN	Histone H2A type 2-A	C
GSHR_HUMAN	Glutathione reductase, mitochondrial	C
EZRI_HUMAN	Ezrin	C
H33_HUMAN	Histone H3.3	C
RHG01_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 1	C
1433T_HUMAN	14-3-3 protein theta	C
CNN2_HUMAN	Calponin-2	C
MIF_HUMAN	Macrophage migration inhibitory factor	C
PSA4_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-4	C
PSA1_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-1	C
ANXA5_HUMAN	Annexin A5	C
IQGA2_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	C
VASP_HUMAN	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	C
S10AB_HUMAN	Protein S100-A11	C
LTOR3_HUMAN	Ragulator complex protein LAMTOR3	C
ACPH_HUMAN	Acylamino-acid-releasing enzyme	C
SYWC_HUMAN	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	C
S10A4_HUMAN	Protein S100-A4	C
DOPD_HUMAN	D-dopachrome decarboxylase	C
ATPB_HUMAN	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	C
PSB9_HUMAN	Proteasome subunit beta type-9	C

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NUCL_HUMAN	Nucleolin	C
HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	C
IGHA2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	C
CAZA2_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-2	C
1433F_HUMAN	14-3-3 protein eta	C
A16A1_HUMAN	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	C
ANX11_HUMAN	Annexin A11	C
BID_HUMAN	BH3-interacting domain death agonist	C
DPP3_HUMAN	Dipeptidyl peptidase 3	C
EF2_HUMAN	Elongation factor 2	C
GBB4_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	C
H31_HUMAN	Histone H3.1	C
HNRPD_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	C
IGLL5_HUMAN	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	C
LEG3_HUMAN	Galectin-3	C
MOB1A_HUMAN	MOB kinase activator 1A	C
ODO2_HUMAN	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	C
PGM1_HUMAN	Phosphoglucomutase-1	C
PIMT_HUMAN	Protein-L-isoaspartate	C
PUR6_HUMAN	Multifunctional protein ADE2	C
RAN_HUMAN	GTP-binding nuclear protein Ran	C
RL12_HUMAN	60S ribosomal protein L12	C
SUCA_HUMAN	Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	C
TBA4A_HUMAN	Tubulin alpha-4A chain	C
TPT1L_HUMAN	TPT1-like protein	C
TTYH3_HUMAN	Protein tweety homolog 3	C
UBP14_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	C
HBG2_HUMAN	Hemoglobin subunit gamma-2	C
PAI2_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 2	C
PLEK_HUMAN	Pleckstrin	C
AP2B1_HUMAN	AP-2 complex subunit beta	C

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AP1B1_HUMAN	AP-1 complex subunit beta-1	C
PICAL_HUMAN	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	C
UN13D_HUMAN	Protein unc-13 homolog D	C
BIN2_HUMAN	Bridging integrator 2	C
PDLI1_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 1	C
GLSK_HUMAN	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	C
AIFM1_HUMAN	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	C
TYPH_HUMAN	Thymidine phosphorylase	C
LMNB1_HUMAN	Lamin-B1	C
PPIF_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	C
AFAD_HUMAN	Afadin	C
SET_HUMAN	Protein SET	C
TSN_HUMAN	Translin	C
HNRL2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	C
FBX15_HUMAN	F-box only protein 15	C
WBP2_HUMAN	WW domain-binding protein 2	C
MGLL_HUMAN	Monoglyceride lipase	C
PDLI7_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 7	C
ABRAL_HUMAN	Costars family protein ABRACL	C
MED23_HUMAN	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23	C
GELS_HUMAN	Gelsolin	C
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	C
ITB3_HUMAN	Integrin beta-3	C
PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6	C
NID1_HUMAN	Nidogen-1	C
ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	C
HPT_HUMAN	Haptoglobin	C
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	C
EMIL1_HUMAN	EMILIN-1	C
CD14_HUMAN	Monocyte differentiation antigen CD14	C
GP1BA_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	C

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ERP29_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 29	C
ELNE_HUMAN	Neutrophil elastase	C
PROS_HUMAN	Vitamin K-dependent protein S	C
ITAM_HUMAN	Integrin alpha-M	C
NGAL_HUMAN	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	C
TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5	C
KV320_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-20	C
IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor	C
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	C
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	C
ANGL6_HUMAN	Angiopoietin-related protein 6	C
FHR1_HUMAN	Complement factor H-related protein 1	C
CATG_HUMAN	Cathepsin G	C
A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	C
IL1RA_HUMAN	Interleukin-1 receptor antagonist protein	C
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	C
AMBP_HUMAN	Protein AMBP [Cleaved into: Alpha-1-microglobulin	C
B2MG_HUMAN	Beta-2-microglobulin	C
C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit B	C
CD63_HUMAN	CD63 antigen	C
ENPL_HUMAN	Endoplasmin	C
FBLN4_HUMAN	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	C
HV307_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-7	C
KV105_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-5	C
PIP_HUMAN	Prolactin-inducible protein	C
QSOX1_HUMAN	Sulfhydryl oxidase 1	C
SLAF5_HUMAN	SLAM family member 5	C
TGFB1_HUMAN	Transforming growth factor beta-1 proprotein	C
CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein	C
FA5_HUMAN	Coagulation factor V	C
IL8_HUMAN	Interleukin-8	C
CSPG2_HUMAN	Versican core protein	C

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PDIA4_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A4	C
CBPN_HUMAN	Carboxypeptidase N catalytic chain	C
CXCL5_HUMAN	C-X-C motif chemokine 5	C
LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	C
LY66F_HUMAN	Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6f	C
ITA6_HUMAN	Integrin alpha-6	C
SYHM_HUMAN	Histidine--tRNA ligase, mitochondrial	C
MLEC_HUMAN	Malectin	C
ITA2_HUMAN	Integrin alpha-2	B
AMPN_HUMAN	Aminopeptidase N	B
LCAP_HUMAN	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	B
TPP2_HUMAN	Tripeptidyl-peptidase 2	B
EGF_HUMAN	Pro-epidermal growth factor	B
ATG2B_HUMAN	Autophagy-related protein 2 homolog B	B
ZBT37_HUMAN	Zinc finger and BTB domain-containing protein 37	B
EEA1_HUMAN	Early endosome antigen 1	B
CASPE_HUMAN	Caspase-14	B
PLXB2_HUMAN	Plexin-B2	B
CO5_HUMAN	Complement C5	B
CD109_HUMAN	CD109 antigen	B
DDB1_HUMAN	DNA damage-binding protein 1	B
CAND1_HUMAN	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	B
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	B
MA2A1_HUMAN	Alpha-mannosidase 2	B
UBA1_HUMAN	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	B
SEM4D_HUMAN	Semaphorin-4D	B
COL11_HUMAN	Collectin-11	B
ITA5_HUMAN	Integrin alpha-5	B
IPO5_HUMAN	Importin-5	B
NRP1_HUMAN	Neuropilin-1	B
CO6_HUMAN	Complement component C6	B
ACLY_HUMAN	ATP-citrate synthase	B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PTPRC_HUMAN	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	B
HVC05_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-30-5	B
SF3B3_HUMAN	Splicing factor 3B subunit 3	B
LMNB2_HUMAN	Lamin-B2	B
PSA5_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-5	B
RPIA_HUMAN	Ribose-5-phosphate isomerase	B
UBE2K_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	B
IGL1_HUMAN	Immunoglobulin lambda-1 light chain	B
TSN14_HUMAN	Tetraspanin-14	B
KAD3_HUMAN	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	B
CYTA_HUMAN	Cystatin-A	B
IGG1_HUMAN	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	B
RL10A_HUMAN	60S ribosomal protein L10a	B
PLIN3_HUMAN	Perilipin-3	B
KV401_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 4-1	B
NPS3A_HUMAN	Protein NipSnap homolog 3A	B
AP3B1_HUMAN	AP-3 complex subunit beta-1	B
CPSF5_HUMAN	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	B
IAH1_HUMAN	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	B
PGRP1_HUMAN	Peptidoglycan recognition protein 1	B
KVD39_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-39	B
LRC57_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 57	B
OSTF1_HUMAN	Osteoclast-stimulating factor 1	B
HDHD1_HUMAN	Pseudouridine-5'-phosphatase	B
PCBP1_HUMAN	Poly	B
CPNE3_HUMAN	Copine-3	B
NSF_HUMAN	Vesicle-fusing ATPase	B
CD151_HUMAN	CD151 antigen	B
MSRA_HUMAN	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase	B
NQO2_HUMAN	Ribosyldihydronicotinamide dehydrogenase	B
LV147_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-47	B
RALA_HUMAN	Ras-related protein Ral-A	B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RAB5C_HUMAN	Ras-related protein Rab-5C	B
PSB7_HUMAN	Proteasome subunit beta type-7	B
HARS1_HUMAN	Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	B
PAIP1_HUMAN	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1	B
SSRP1_HUMAN	FACT complex subunit SSRP1	B
KVD12_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-12	B
KVD28_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-28	B
KV133_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-33	B
KV113_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-13	B
UB2J1_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1	B
PUF60_HUMAN	Poly	B
TMED8_HUMAN	Protein TMED8	B
IF6_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 6	B
GAL3B_HUMAN	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3B, mitochondrial	B
GAL3A_HUMAN	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3A, mitochondrial	B
F16P1_HUMAN	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	B
PAXX_HUMAN	Protein PAXX	B
LMNA_HUMAN	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C	B
KV311_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-11	B
HDHD3_HUMAN	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	B
DCHS_HUMAN	Histidine decarboxylase	B
OTUB1_HUMAN	Ubiquitin thioesterase OTUB1	B
TAD2B_HUMAN	Transcriptional adapter 2-beta	B
RA1L2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	B
H90B2_HUMAN	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2	B
RPN1_HUMAN	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	B
LRC15_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 15	B
PPCT_HUMAN	Phosphatidylcholine transfer protein	B
CERT_HUMAN	Ceramide transfer protein	B
H32_HUMAN	Histone H3.2	B
LV151_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-51	B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TSN9_HUMAN	Tetraspanin-9	B
ACSF2_HUMAN	Medium-chain acyl-CoA ligase ACSF2, mitochondrial	B
YJ001_HUMAN	Putative uncharacterized protein PRO1933	B
TBB2B_HUMAN	Tubulin beta-2B chain	B
WFKN1_HUMAN	WAP, Kazal, immunoglobulin, Kunitz and NTR domain-containing protein 1	B
MESD_HUMAN	LRP chaperone MESD	B
HORN_HUMAN	Hornerin	B
C1QA_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit A	B
FCN3_HUMAN	Ficolin-3	B
AFAM_HUMAN	Afamin	B
ITIH3_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	B
CO9_HUMAN	Complement component C9	B
APOF_HUMAN	Apolipoprotein F	B
APOA_HUMAN	Apolipoprotein	B
APOM_HUMAN	Apolipoprotein M	B
PHLD_HUMAN	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	B
AT7L2_HUMAN	Ataxin-7-like protein 2	B
LAMC1_HUMAN	Laminin subunit gamma-1	B
GTR3_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	B
UGGG1_HUMAN	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	B
LAMB1_HUMAN	Laminin subunit beta-1	B
LAMA4_HUMAN	Laminin subunit alpha-4	B
ZN761_HUMAN	Zinc finger protein 761	B
ITB2_HUMAN	Integrin beta-2	B
HSP74_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 4	B
PYGM_HUMAN	Glycogen phosphorylase, muscle form	B
ICAM3_HUMAN	Intercellular adhesion molecule 3	B
CSF1R_HUMAN	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	B
DPYD_HUMAN	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP	B
GPR18_HUMAN	N-arachidonyl glycine receptor	B
CTL2_HUMAN	Choline transporter-like protein 2	B
GBP1_HUMAN	Guanylate-binding protein 1	B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AMPB_HUMAN	Aminopeptidase B	B
IGD_HUMAN	Immunoglobulin delta heavy chain	B
GLU2B_HUMAN	Glucosidase 2 subunit beta	B
VATA_HUMAN	V-type proton ATPase catalytic subunit A	B
GSHB_HUMAN	Glutathione synthetase	B
AMPL_HUMAN	Cytosol aminopeptidase	B
DPYL2_HUMAN	Dihydropyrimidinase-related protein 2	B
GPVI_HUMAN	Platelet glycoprotein VI	B
IGHG4_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	B
HVC33_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3	B
CTL1_HUMAN	Choline transporter-like protein 1	B
SBP1_HUMAN	Methanethiol oxidase	B
ICAM2_HUMAN	Intercellular adhesion molecule 2	B
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	B
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	B
RO60_HUMAN	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	B
FAT2_HUMAN	Protocadherin Fat 2	B
PURA2_HUMAN	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	B
ANXA7_HUMAN	Annexin A7	B
AP1M1_HUMAN	AP-1 complex subunit mu-1	B
BLMH_HUMAN	Bleomycin hydrolase	B
ERF1_HUMAN	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	B
RINI_HUMAN	Ribonuclease inhibitor	B
FUMH_HUMAN	Fumarate hydratase, mitochondrial	B
IF4A2_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-II	B
BPI_HUMAN	Bactericidal permeability-increasing protein	B
TBB4B_HUMAN	Tubulin beta-4B chain	B
CISY_HUMAN	Citrate synthase, mitochondrial	B
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	B
ERP44_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 44	B
AATC_HUMAN	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	B
FAAA_HUMAN	Fumarylacetoacetase	B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HLAC_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain	B
CATB_HUMAN	Cathepsin B	B
ALDOC_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase C	B
CD5L_HUMAN	CD5 antigen-like	B
ACTBL_HUMAN	Beta-actin-like protein 2	B
AATM_HUMAN	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	B
LRC36_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 36	B
HEM3_HUMAN	Porphobilinogen deaminase	B
DCUP_HUMAN	Uroporphyrinogen decarboxylase	B
ANXA3_HUMAN	Annexin A3	B
HEM2_HUMAN	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	B
ANXA2_HUMAN	Annexin A2	B
ARGI1_HUMAN	Arginase-1	B
NAGK_HUMAN	N-acetyl-D-glucosamine kinase	B
ALDR_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member B1	B
FPPS_HUMAN	Farnesyl pyrophosphate synthase	B
VP26B_HUMAN	Vacuolar protein sorting-associated protein 26B	B
BIEA_HUMAN	Biliverdin reductase A	B
EPS15_HUMAN	Epidermal growth factor receptor substrate 15	B
CK054_HUMAN	Ester hydrolase C11orf54	B
ARC1B_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	B
TSG6_HUMAN	Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein	B
BPNT1_HUMAN	3'	B
CATZ_HUMAN	Cathepsin Z	B
PP1A_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	B
GBB1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G	B
VP26A_HUMAN	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	B
AK1A1_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member A1	B
RLA0_HUMAN	60S acidic ribosomal protein P0	B
LRC32_HUMAN	Transforming growth factor beta activator LRRC32	B
ADA10_HUMAN	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	B
ADPRH_HUMAN	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase	B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

KCAB2_HUMAN	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	B
COPB2_HUMAN	Coatomer subunit beta'	B
QORX_HUMAN	Quinone oxidoreductase PIG3	B
ARK72_HUMAN	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	B
CATL1_HUMAN	Procathepsin L	B
DEOC_HUMAN	Deoxyribose-phosphate aldolase	B
NIF3L_HUMAN	NIF3-like protein 1	B
CPPED_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1	B
KCD12_HUMAN	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	B
AK1C1_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member C1	B
EM55_HUMAN	55 kDa erythrocyte membrane protein	B
FCN1_HUMAN	Ficolin-1	B
CIP4_HUMAN	Cdc42-interacting protein 4	B
DHB4_HUMAN	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	B
F16P2_HUMAN	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2	B
HDGF_HUMAN	Hepatoma-derived growth factor	B
CSN5_HUMAN	COP9 signalosome complex subunit 5	B
U5S1_HUMAN	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	B
P85A_HUMAN	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	B
OLFM4_HUMAN	Olfactomedin-4	B
TTBK1_HUMAN	Tau-tubulin kinase 1	B
DDAH2_HUMAN	N	B
ECH1_HUMAN	Delta	B
SNAA_HUMAN	Alpha-soluble NSF attachment protein	B
NUDT5_HUMAN	ADP-sugar pyrophosphatase	B
GNPI1_HUMAN	Glucosamine-6-phosphate isomerase 1	B
ENOPH_HUMAN	Enolase-phosphatase E1	B
ISOC1_HUMAN	Isochorismatase domain-containing protein 1	B
IGLC2_HUMAN	Immunoglobulin lambda constant 2	B
MYCT1_HUMAN	Myc target protein 1	B
CBR1_HUMAN	Carbonyl reductase [NADPH] 1	B
LACB2_HUMAN	Endoribonuclease LACTB2	B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RLA0L_HUMAN	60S acidic ribosomal protein P0-like	B
TIPRL_HUMAN	TIP41-like protein	B
RS3_HUMAN	40S ribosomal protein S3	B
LMAN2_HUMAN	Vesicular integral-membrane protein VIP36	B
ADT4_HUMAN	ADP/ATP translocase 4	B
HYI_HUMAN	Putative hydroxypyruvate isomerase	B
CLCB_HUMAN	Clathrin light chain B	B
UBP15_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	B
CAH13_HUMAN	Carbonic anhydrase 13	B
LXN_HUMAN	Latexin	B
GLO2_HUMAN	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	B
IMPA1_HUMAN	Inositol monophosphatase 1	B
DSC1_HUMAN	Desmocollin-1	B
PA1B2_HUMAN	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha2	B
LV214_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 2-14	B
DSG1_HUMAN	Desmoglein-1	B
LV319_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-19	B
ABHDB_HUMAN	Protein ABHD11	B
DRC11_HUMAN	Dynein regulatory complex protein 11	B
CUTC_HUMAN	Copper homeostasis protein cutC homolog	B
ECI1_HUMAN	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	B
ABHEB_HUMAN	Protein ABHD14B	B
TCTP_HUMAN	Translationally-controlled tumor protein	B
PSB6_HUMAN	Proteasome subunit beta type-6	B
RAB6A_HUMAN	Ras-related protein Rab-6A	B
CZIB_HUMAN	CXXC motif containing zinc binding protein	B
BLVRB_HUMAN	Flavin reductase	B
RAB1B_HUMAN	Ras-related protein Rab-1B	B
RAB10_HUMAN	Ras-related protein Rab-10	B
GGCT_HUMAN	Gamma-glutamylcyclotransferase	B
CDC42_HUMAN	Cell division control protein 42 homolog	B
RGS10_HUMAN	Regulator of G-protein signaling 10	B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CHP1_HUMAN	Calcineurin B homologous protein 1	B
SAR1B_HUMAN	GTP-binding protein SAR1b	B
HEBP1_HUMAN	Heme-binding protein 1	B
LYPA1_HUMAN	Acyl-protein thioesterase 1	B
FABP5_HUMAN	Fatty acid-binding protein 5	B
H2A1C_HUMAN	Histone H2A type 1-C	B
H2A3_HUMAN	Histone H2A type 3	B
H2A1B_HUMAN	Histone H2A type 1-B/E	B
H2B2E_HUMAN	Histone H2B type 2-E	B
CYC_HUMAN	Cytochrome c	B
TRML1_HUMAN	Trem-like transcript 1 protein	B
CYTB_HUMAN	Cystatin-B	B
LEG10_HUMAN	Galectin-10	B
GMFB_HUMAN	Glia maturation factor beta	B
GMFG_HUMAN	Glia maturation factor gamma	B
LEG1_HUMAN	Galectin-1	B
FIS1_HUMAN	Mitochondrial fission 1 protein	B
CYTC_HUMAN	Cystatin-C	B
EHD3_HUMAN	EH domain-containing protein 3	B
PDLI5_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 5	B
SUMO4_HUMAN	Small ubiquitin-related modifier 4	B
SRC8_HUMAN	Src substrate cortactin	B
LSM3_HUMAN	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3	B
NPM_HUMAN	Nucleophosmin	B
CUTA_HUMAN	Protein CutA	B
CALM3_HUMAN	Calmodulin-3	B
MYL9_HUMAN	Myosin regulatory light polypeptide 9	B
LEGL_HUMAN	Galectin-related protein	B
EHD1_HUMAN	EH domain-containing protein 1	B
GBRL2_HUMAN	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	B
COPZ1_HUMAN	Coatomer subunit zeta-1	B
FKBP2_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	B

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

VAMP7_HUMAN	Vesicle-associated membrane protein 7	B
CYBP_HUMAN	Calcyclin-binding protein	B
PDGFA_HUMAN	Platelet-derived growth factor subunit A	B
LASP1_HUMAN	LIM and SH3 domain protein 1	B
TS101_HUMAN	Tumor susceptibility gene 101 protein	B
NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B	B
IGM_HUMAN	Immunoglobulin mu heavy chain	B
DCD_HUMAN	Dermcidin	B
ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	B
DESP_HUMAN	Desmoplakin	B
PLAK_HUMAN	Junction plakoglobin	B
DHE4_HUMAN	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	B
S10A7_HUMAN	Protein S100-A7	B
LCN1_HUMAN	Lipocalin-1	B
CDSN_HUMAN	Corneodesmosin	B
GLGB_HUMAN	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	B
CALL5_HUMAN	Calmodulin-like protein 5	B
SHC1_HUMAN	SHC-transforming protein 1	B
H2AJ_HUMAN	Histone H2A.J	B
GSLG1_HUMAN	Golgi apparatus protein 1	B

Anexo V.II Resultados ampliados del análisis diferencial 1D-SDS-PAGE del perfil del secretoma recogido a días 3 y 7

Tabla suplementaria 4. Proteínas identificadas en el análisis diferencial 1D-SDS-PAGE del perfil del secretoma recogido a días 3 y 7. La columna condición indica en que momento del almacenamiento se identificaron las proteínas; día 3 y día 7 (d3 + d7), solamente a día 3 (d3), solamente a día 7 (d7).

Código Uniprot	Nombre	Condición
FINC_HUMAN	Fibronectin	d3 + d7
MYH9_HUMAN	Myosin-9	d3 + d7
VWF_HUMAN	von Willebrand factor	d3 + d7
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	d3 + d7
TSP1_HUMAN	Thrombospondin-1	d3 + d7
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	d3 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain [Cleaved into: Fibrinopeptide B; Fibrinogen beta chain]	d3 + d7
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain [Cleaved into: Fibrinopeptide A; Fibrinogen alpha chain]	d3 + d7
FLNA_HUMAN	Filamin-A	d3 + d7
VINC_HUMAN	Vinculin	d3 + d7
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	d3 + d7
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	d3 + d7
ALBU_HUMAN	Albumin	d3 + d7
AMPN_HUMAN	Aminopeptidase N	d3 + d7
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	d3 + d7
ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	d3 + d7
MMRN1_HUMAN	Multimerin-1	d3 + d7
CO3_HUMAN	Complement C3	d3 + d7
F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	d3 + d7
TLN1_HUMAN	Talin-1	d3 + d7
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	d3 + d7
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	d3 + d7
CFAH_HUMAN	Complement factor H	d3 + d7
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	d3 + d7
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	d3 + d7
ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	d3 + d7
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	d3 + d7
IGHM_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant mu	d3 + d7
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	d3 + d7
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	d3 + d7
PLMN_HUMAN	Plasminogen	d3 + d7
K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	d3 + d7
ITAM_HUMAN	Integrin alpha-M	d3 + d7
ITA2_HUMAN	Integrin alpha-2	d3 + d7
SPTN1_HUMAN	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	d3 + d7
PLSL_HUMAN	Plastin-2	d3 + d7
CPN2_HUMAN	Carboxypeptidase N subunit 2	d3 + d7
LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	d3 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NID1_HUMAN	Nidogen-1	d3 + d7
EMIL1_HUMAN	EMILIN-1	d3 + d7
IGHG1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	d3 + d7
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	d3 + d7
MMP9_HUMAN	Matrix metalloproteinase-9	d3 + d7
PERM_HUMAN	Myeloperoxidase	d3 + d7
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	d3 + d7
GTR3_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	d3 + d7
THRB_HUMAN	Prothrombin	d3 + d7
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	d3 + d7
ELNE_HUMAN	Neutrophil elastase	d3 + d7
CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1	d3 + d7
SPTB2_HUMAN	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	d3 + d7
LYAM3_HUMAN	P-selectin	d3 + d7
URP2_HUMAN	Fermitin family homolog 3	d3 + d7
ITB1_HUMAN	Integrin beta-1	d3 + d7
RL40_HUMAN	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	d3 + d7
TRY1_HUMAN	Trypsin-1	d3 + d7
FILA2_HUMAN	Filaggrin-2	d3 + d7
GELS_HUMAN	Gelsolin	d3 + d7
PLXB2_HUMAN	Plexin-B2	d3 + d7
K1C16_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 16	d3 + d7
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	d3 + d7
ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb	d3 + d7
DCD_HUMAN	Dermcidin	d3 + d7
LCAP_HUMAN	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	d3 + d7
CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein	d3 + d7
IGHA1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	d3 + d7
IGHG2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	d3 + d7
PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2	d3 + d7
ITA6_HUMAN	Integrin alpha-6	d3 + d7
CO4B_HUMAN	Complement C4-B	d3 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

UBA1_HUMAN	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	d3 + d7
DDB1_HUMAN	DNA damage-binding protein 1	d3 + d7
PECA1_HUMAN	Platelet endothelial cell adhesion molecule	d3 + d7
GSHR_HUMAN	Glutathione reductase, mitochondrial	d3 + d7
ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4	d3 + d7
CAND1_HUMAN	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	d3 + d7
IGG1_HUMAN	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	d3 + d7
ACLY_HUMAN	ATP-citrate synthase	d3 + d7
TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	d3 + d7
K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14	d3 + d7
CO5_HUMAN	Complement C5	d3 + d7
MOES_HUMAN	Moesin	d3 + d7
TKT_HUMAN	Transketolase	d3 + d7
GP1BA_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	d3 + d7
NID2_HUMAN	Nidogen-2	d3 + d7
SF3B3_HUMAN	Splicing factor 3B subunit 3	d3 + d7
ITB3_HUMAN	Integrin beta-3	d3 + d7
TRY2_HUMAN	Trypsin-2	d3 + d7
ANO3_HUMAN	Anoctamin-3	d3 + d7
CD109_HUMAN	CD109 antigen	d3 + d7
MA2A1_HUMAN	Alpha-mannosidase 2	d3 + d7
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	d3 + d7
NRP1_HUMAN	Neuropilin-1	d3 + d7
IPO5_HUMAN	Importin-5	d3 + d7
TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	d3 + d7
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	d3 + d7
PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	d3 + d7
PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	d3 + d7
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	d3 + d7
VIME_HUMAN	Vimentin	d3 + d7
LMNB1_HUMAN	Lamin-B1	d3 + d7
BIN2_HUMAN	Bridging integrator 2	d3 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NGAL_HUMAN	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	d3 + d7
PIMT_HUMAN	Protein-L-isoaspartate	d3 + d7
PSA6_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-6	d3 + d7
IGK_HUMAN	Immunoglobulin kappa light chain	d3 + d7
RB27B_HUMAN	Ras-related protein Rab-27B	d3 + d7
KAD2_HUMAN	Adenylate kinase 2, mitochondrial	d3 + d7
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	d3 + d7
PSA2_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-2	d3 + d7
HPRT_HUMAN	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	d3 + d7
BIP_HUMAN	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	d3 + d7
PSA5_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-5	d3 + d7
1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha	d3 + d7
RPIA_HUMAN	Ribose-5-phosphate isomerase	d3 + d7
PSA7_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-7	d3 + d7
TSN_HUMAN	Translin	d3 + d7
PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase	d3 + d7
STOM_HUMAN	Stomatin	d3 + d7
PSA3_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-3	d3 + d7
LMNA_HUMAN	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C	d3 + d7
CRKL_HUMAN	Crk-like protein	d3 + d7
CAN1_HUMAN	Calpain-1 catalytic subunit	d3 + d7
LMNB2_HUMAN	Lamin-B2	d3 + d7
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	d3 + d7
GSTO1_HUMAN	Glutathione S-transferase omega-1	d3 + d7
GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	d3 + d7
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	d3 + d7
TPM3_HUMAN	Tropomyosin alpha-3 chain	d3 + d7
GRB2_HUMAN	Growth factor receptor-bound protein 2	d3 + d7
HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta	d3 + d7
1433G_HUMAN	14-3-3 protein gamma	d3 + d7
CAPZB_HUMAN	F-actin-capping protein subunit beta	d3 + d7
EFHD2_HUMAN	EF-hand domain-containing protein D2	d3 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NNRE_HUMAN	NAD	d3 + d7
PSB10_HUMAN	Proteasome subunit beta type-10	d3 + d7
PARVB_HUMAN	Beta-parvin	d3 + d7
PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	d3 + d7
IGLC3_HUMAN	Immunoglobulin lambda constant 3	d3 + d7
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component	d3 + d7
UBE2K_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	d3 + d7
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	d3 + d7
1433T_HUMAN	14-3-3 protein theta	d3 + d7
CAPG_HUMAN	Macrophage-capping protein	d3 + d7
PARK7_HUMAN	Parkinson disease protein 7	d3 + d7
1433F_HUMAN	14-3-3 protein eta	d3 + d7
CATS_HUMAN	Cathepsin S	d3 + d7
NPS3A_HUMAN	Protein NipSnap homolog 3A	d3 + d7
CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	d3 + d7
CBPN_HUMAN	Carboxypeptidase N catalytic chain	d3 + d7
S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	d3 + d7
RSU1_HUMAN	Ras suppressor protein 1	d3 + d7
MLEC_HUMAN	Malectin	d3 + d7
GDIR2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	d3 + d7
RB11B_HUMAN	Ras-related protein Rab-11B	d3 + d7
PSB4_HUMAN	Proteasome subunit beta type-4	d3 + d7
KV401_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 4-1	d3 + d7
RPN1_HUMAN	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	d3 + d7
IAH1_HUMAN	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	d3 + d7
KV320_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-20	d3 + d7
PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase 1	d3 + d7
CAZA1_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-1	d3 + d7
PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	d3 + d7
AP1B1_HUMAN	AP-1 complex subunit beta-1	d3 + d7
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	d3 + d7
PNPH_HUMAN	Purine nucleoside phosphorylase	d3 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

GDIR1_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	d3 + d7
ROA2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	d3 + d7
EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma	d3 + d7
S10A8_HUMAN	Protein S100-A8	d3 + d7
CAH2_HUMAN	Carbonic anhydrase 2	d3 + d7
LGUL_HUMAN	Lactoylglutathione lyase	d3 + d7
CPSF5_HUMAN	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	d3 + d7
PGRP1_HUMAN	Peptidoglycan recognition protein 1	d3 + d7
NAMPT_HUMAN	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	d3 + d7
RHG01_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 1	d3 + d7
KV230_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2-30	d3 + d7
KVD39_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-39	d3 + d7
CPNE3_HUMAN	Copine-3	d3 + d7
H2AY_HUMAN	Core histone macro-H2A.1	d3 + d7
KAD3_HUMAN	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	d3 + d7
PRDX4_HUMAN	Peroxiredoxin-4	d3 + d7
6PGD_HUMAN	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	d3 + d7
TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain	d3 + d7
NUCL_HUMAN	Nucleolin	d3 + d7
GP1BB_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib beta chain	d3 + d7
UN13D_HUMAN	Protein unc-13 homolog D	d3 + d7
TSN14_HUMAN	Tetraspanin-14	d3 + d7
CATG_HUMAN	Cathepsin G	d3 + d7
LYSC_HUMAN	Lysozyme C	d3 + d7
PTBP1_HUMAN	Polypyrimidine tract-binding protein 1	d3 + d7
PROF1_HUMAN	Profilin-1	d3 + d7
TPM4_HUMAN	Tropomyosin alpha-4 chain	d3 + d7
CAP7_HUMAN	Azurocidin	d3 + d7
IST1_HUMAN	IST1 homolog	d3 + d7
HARS1_HUMAN	Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	d3 + d7
KV311_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-11	d3 + d7
C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C	d3 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PSME1_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 1	d3 + d7
NQO2_HUMAN	Ribosyldihydronicotinamide dehydrogenase [quinone]	d3 + d7
PRG4_HUMAN	Proteoglycan 4	d3 + d7
IF6_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 6	d3 + d7
UFD1_HUMAN	Ubiquitin recognition factor in ER-associated degradation protein 1	d3 + d7
PLIN3_HUMAN	Perilipin-3	d3 + d7
H2B1L_HUMAN	Histone H2B type 1-L	d3 + d7
CD9_HUMAN	CD9 antigen	d3 + d7
K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B	d3 + d7
PUF60_HUMAN	Poly	d3 + d7
IGKC_HUMAN	Immunoglobulin kappa constant	d3 + d7
OSTF1_HUMAN	Osteoclast-stimulating factor 1	d3 + d7
H90B2_HUMAN	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2	d3 + d7
PCBP1_HUMAN	Poly	d3 + d7
HDHD1_HUMAN	Pseudouridine-5'-phosphatase	d3 + d7
VTNC_HUMAN	Vitronectin	d3 + d7
TBA1C_HUMAN	Tubulin alpha-1C chain	d3 + d7
LV147_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-47	d3 + d7
IGL1_HUMAN	Immunoglobulin lambda-1 light chain	d3 + d7
TIMP1_HUMAN	Metalloproteinase inhibitor 1	d3 + d7
CAZA2_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-2	d3 + d7
H4_HUMAN	Histone H4	d3 + d7
CASP3_HUMAN	Caspase-3	d3 + d7
FGL1_HUMAN	Fibrinogen-like protein 1	d3 + d7
H2AJ_HUMAN	Histone H2A.J	d3 + d7
TAD2B_HUMAN	Transcriptional adapter 2-beta	d3 + d7
HS71B_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1B	d3 + d7
TSN9_HUMAN	Tetraspanin-9	d3 + d7
MMP8_HUMAN	Neutrophil collagenase	d3 + d7
KV315_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-15	d3 + d7
H32_HUMAN	Histone H3.2	d3 + d7
PEBP1_HUMAN	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	d3 + d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SHRM3_HUMAN	Protein Shroom3	d3 + d7
PRTN3_HUMAN	Myeloblastin	d3 + d7
ARP3_HUMAN	Actin-related protein 3	d3 + d7
RL10A_HUMAN	60S ribosomal protein L10a	d3 + d7
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	d3 + d7
RAN_HUMAN	GTP-binding nuclear protein Ran	d3 + d7
CD151_HUMAN	CD151 antigen	d3 + d7
ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A	d3 + d7
PLEC_HUMAN	Plectin	d3 + d7
PSB7_HUMAN	Proteasome subunit beta type-7	d3 + d7
PDC10_HUMAN	Programmed cell death protein 10	d3 + d7
LY66F_HUMAN	Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6f	d3 + d7
IL6_HUMAN	Interleukin-6	d3 + d7
ANXA6_HUMAN	Annexin A6	d3 + d7
PGM2_HUMAN	Phosphoglucomutase-2	d3 + d7
LKHA4_HUMAN	Leukotriene A-4 hydrolase	d3 + d7
K2C6A_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A	d3 + d7
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	d3 + d7
BGH3_HUMAN	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	d3 + d7
IGHG3_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	d3 + d7
FBLN5_HUMAN	Fibulin-5	d3 + d7
LG3BP_HUMAN	Galectin-3-binding protein	d3 + d7
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	d3 + d7
HORN_HUMAN	Hornerin	d3 + d7
CYTA_HUMAN	Cystatin-A	d3 + d7
MASP1_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 1	d3 + d7
IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	d3 + d7
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain	d3 + d7
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	d3
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	d3
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	d3
TPP2_HUMAN	Tripeptidyl-peptidase 2	d3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EGF_HUMAN	Pro-epidermal growth factor	d3
PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	d3
ATG2B_HUMAN	Autophagy-related protein 2 homolog B	d3
ZBT37_HUMAN	Zinc finger and BTB domain-containing protein 37	d3
ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	d3
EEA1_HUMAN	Early endosome antigen 1	d3
CASPE_HUMAN	Caspase-14	d3
LC1L1_HUMAN	Putative lipocalin 1-like protein 1	d3
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	d3
SEM4D_HUMAN	Semaphorin-4D	d3
COL11_HUMAN	Collectin-11	d3
ITA5_HUMAN	Integrin alpha-5	d3
FBLN1_HUMAN	Fibulin-1	d3
COL10_HUMAN	Collectin-10	d3
ERAP1_HUMAN	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	d3
ATPB_HUMAN	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	d3
COR1C_HUMAN	Coronin-1C	d3
PARP9_HUMAN	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP9	d3
CO6_HUMAN	Complement component C6	d3
PTPRC_HUMAN	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	d3
HVC05_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-30-5	d3
AP2B1_HUMAN	AP-2 complex subunit beta	d3
KRT81_HUMAN	Keratin, type II cuticular Hb1	d3
6PGL_HUMAN	6-phosphogluconolactonase	d3
PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	d3
ERP29_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 29	d3
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	d3
AP3B1_HUMAN	AP-3 complex subunit beta-1	d3
AP2A1_HUMAN	AP-2 complex subunit alpha-1	d3
HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	d3
JAM1_HUMAN	Junctional adhesion molecule A	d3
LRC57_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 57	d3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FHL1_HUMAN	Four and a half LIM domains protein 1	d3
CLIC1_HUMAN	Chloride intracellular channel protein 1	d3
COR1A_HUMAN	Coronin-1A	d3
NSF_HUMAN	Vesicle-fusing ATPase	d3
MSRA_HUMAN	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase	d3
RALA_HUMAN	Ras-related protein Ral-A	d3
RAB5C_HUMAN	Ras-related protein Rab-5C	d3
COTL1_HUMAN	Coactosin-like protein	d3
PAIP1_HUMAN	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1	d3
LV321_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-21	d3
SSRP1_HUMAN	FACT complex subunit SSRP1	d3
KVD12_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1D-12	d3
KVD28_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-28	d3
KV133_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-33	d3
KV113_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-13	d3
UB2J1_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1	d3
MOB1A_HUMAN	MOB kinase activator 1A	d3
ARAP1_HUMAN	Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	d3
TMED8_HUMAN	Protein TMED8	d3
HNRPD_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	d3
GAL3B_HUMAN	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3B, mitochondrial	d3
GAL3A_HUMAN	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3A, mitochondrial	d3
F16P1_HUMAN	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	d3
HNRPQ_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	d3
LV325_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-25	d3
PAXX_HUMAN	Protein PAXX	d3
DTD1_HUMAN	D-aminoacyl-tRNA deacylase 1	d3
TWF2_HUMAN	Twinfilin-2	d3
HDHD3_HUMAN	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	d3
DCHS_HUMAN	Histidine decarboxylase	d3
CLUS_HUMAN	Clusterin	d3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OTUB1_HUMAN	Ubiquitin thioesterase OTUB1	d3
GRAN_HUMAN	Grancalcin	d3
RA1L2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	d3
LRC15_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 15	d3
PPCT_HUMAN	Phosphatidylcholine transfer protein	d3
CERT_HUMAN	Ceramide transfer protein	d3
LV151_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 1-51	d3
CKAP5_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 5	d3
ACSF2_HUMAN	Medium-chain acyl-CoA ligase ACSF2, mitochondrial	d3
YJ001_HUMAN	Putative uncharacterized protein PRO1933	d3
TBB2B_HUMAN	Tubulin beta-2B chain	d3
ZYX_HUMAN	Zyxin	d3
TAGL2_HUMAN	Transgelin-2	d3
LV743_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 7-43	d3
KT33A_HUMAN	Keratin, type I cuticular Ha3-I	d3
WFKN1_HUMAN	WAP, Kazal, immunoglobulin, Kunitz and NTR domain-containing protein 1	d3
MESD_HUMAN	LRP chaperone MESD	d3
B2L13_HUMAN	Bcl-2-like protein 13	d3
KR151_HUMAN	Keratin-associated protein 15-1	d3
KRT83_HUMAN	Keratin, type II cuticular Hb3	d3
K1C17_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 17	d3
IGM_HUMAN	Immunoglobulin mu heavy chain	d3
DSG1_HUMAN	Desmoglein-1	d3
DESP_HUMAN	Desmoplakin	d3
ARGI1_HUMAN	Arginase-1	d3
PLAK_HUMAN	Junction plakoglobin	d3
K1H1_HUMAN	Keratin, type I cuticular Ha1	d3
KRT35_HUMAN	Keratin, type I cuticular Ha5	d3
GPV_HUMAN	Platelet glycoprotein V	d3
DHE4_HUMAN	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	d3
FABP5_HUMAN	Fatty acid-binding protein 5	d3
KRT36_HUMAN	Keratin, type I cuticular Ha6	d3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PYGM_HUMAN	Glycogen phosphorylase, muscle form	d3
FBLN3_HUMAN	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	d3
S10A7_HUMAN	Protein S100-A7	d3
LCN1_HUMAN	Lipocalin-1	d3
HEMO_HUMAN	Hemopexin	d3
KRT82_HUMAN	Keratin, type II cuticular Hb2	d3
CDSN_HUMAN	Corneodesmosin	d3
GLGB_HUMAN	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	d3
CALL5_HUMAN	Calmodulin-like protein 5	d3
KRT85_HUMAN	Keratin, type II cuticular Hb5	d3
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	d3
SHC1_HUMAN	SHC-transforming protein 1	d3
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	d3
GSLG1_HUMAN	Golgi apparatus protein 1	d7
ICAM3_HUMAN	Intercellular adhesion molecule 3	d7
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	d7
CATA_HUMAN	Catalase	d7
PMGE_HUMAN	Bisphosphoglycerate mutase	d7
EF1A3_HUMAN	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	d7
SODM_HUMAN	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	d7
MYL6_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	d7
MYL9_HUMAN	Myosin regulatory light polypeptide 9	d7
HCD2_HUMAN	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	d7
ORN_HUMAN	Oligoribonuclease, mitochondrial	d7
FAHD1_HUMAN	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	d7
TPM1_HUMAN	Tropomyosin alpha-1 chain	d7
CDC42_HUMAN	Cell division control protein 42 homolog	d7
ALDOC_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase C	d7
U2AF2_HUMAN	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	d7
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM	d7
GILT_HUMAN	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	d7
KCAB2_HUMAN	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	d7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RAP1A_HUMAN	Ras-related protein Rap-1A	d7
ACTS_HUMAN	Actin, alpha skeletal muscle	d7
SAP3_HUMAN	Ganglioside GM2 activator	d7
DRC11_HUMAN	Dynein regulatory complex protein 11	d7

Anexo V.III Resultados ampliados del análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF mediante SWATH-MS

Tabla suplementaria 5. Proteínas identificadas en el análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF por SWATH entre las condiciones día 3 vs día 7.

Código Uniprot	Proteína	p-value	Log (p)	Mean 1	Mean 2	Fold Change
ALBU_HUMAN	Albumin	1,0E-07	-7,0E+00	9,1E+07	1,1E+07	7,9E+00
URP2_HUMAN	Fermitin family homolog 3	4,3E-07	-6,4E+00	4,9E+05	1,7E+05	2,8E+00
MOES_HUMAN	Moesin	5,0E-07	-6,3E+00	6,7E+05	2,1E+05	3,2E+00
IGHM_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant mu	6,0E-07	-6,2E+00	9,6E+06	2,8E+06	3,5E+00
HV374_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-74	6,5E-07	-6,2E+00	4,2E+05	8,7E+04	4,8E+00
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	7,4E-07	-6,1E+00	3,1E+06	5,0E+05	6,1E+00
TSP1_HUMAN	Thrombospondin-1	7,7E-07	-6,1E+00	3,5E+07	7,8E+06	4,5E+00
PERM_HUMAN	Myeloperoxidase	8,0E-07	-6,1E+00	2,2E+06	6,8E+05	3,3E+00
FBLN1_HUMAN	Fibulin-1	1,0E-06	-6,0E+00	4,9E+05	1,4E+05	3,6E+00
PLF4_HUMAN	Platelet factor 4	2,3E-06	-5,6E+00	5,3E+05	8,2E+04	6,4E+00
CALR_HUMAN	Calreticulin	4,2E-06	-5,4E+00	3,5E+05	7,8E+04	4,5E+00
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	4,5E-06	-5,3E+00	1,4E+06	5,1E+05	2,7E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	5,5E-06	-5,3E+00	1,6E+07	9,2E+06	1,7E+00
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	7,1E-06	-5,1E+00	4,3E+06	1,3E+06	3,2E+00
CD9_HUMAN	CD9 antigen	7,8E-06	-5,1E+00	1,2E+05	2,7E+04	4,6E+00
KV320_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-20	1,0E-05	-5,0E+00	5,3E+05	8,2E+04	6,4E+00
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	1,1E-05	-5,0E+00	5,6E+05	2,3E+05	2,5E+00
COF1_HUMAN	Cofilin-1	1,3E-05	-4,9E+00	2,6E+05	8,7E+04	3,0E+00
GP1BA_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	1,9E-05	-4,7E+00	8,2E+05	1,5E+05	5,6E+00
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	1,9E-05	-4,7E+00	2,2E+05	7,5E+04	2,9E+00
CAH1_HUMAN	Carbonic anhydrase 1	2,1E-05	-4,7E+00	2,1E+05	7,0E+05	3,0E-01
IGHG2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	2,2E-05	-4,7E+00	9,6E+05	1,7E+05	5,7E+00
H2B1L_HUMAN	Histone H2B type 1-L	2,9E-05	-4,5E+00	3,1E+05	1,4E+05	2,2E+00
PROF1_HUMAN	Profilin-1	3,1E-05	-4,5E+00	4,0E+06	1,4E+06	2,9E+00
PROS_HUMAN	Vitamin K-dependent protein S	3,7E-05	-4,4E+00	4,5E+05	1,9E+05	2,3E+00
RAP1A_HUMAN	Ras-related protein Rap-1A	3,8E-05	-4,4E+00	3,5E+05	8,4E+04	4,1E+00
IGHG1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	3,9E-05	-4,4E+00	4,7E+06	7,7E+05	6,2E+00
ITB3_HUMAN	Integrin beta-3	3,9E-05	-4,4E+00	6,2E+05	1,4E+05	4,3E+00
KVD28_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-28	5,5E-05	-4,3E+00	2,2E+05	7,6E+04	2,9E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SPB9_HUMAN	Serpin B9	5,6E-05	-4,3E+00	1,7E+05	0,0E+00	Infinity
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain	5,7E-05	-4,2E+00	1,5E+05	3,1E+04	4,9E+00
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component	6,0E-05	-4,2E+00	3,4E+05	1,3E+05	2,6E+00
ARPC2_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	6,2E-05	-4,2E+00	2,7E+04	0,0E+00	Infinity
IGKC_HUMAN	Immunoglobulin kappa constant	6,4E-05	-4,2E+00	4,8E+06	8,6E+05	5,6E+00
IGHA1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	6,5E-05	-4,2E+00	2,3E+06	6,1E+05	3,8E+00
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	6,7E-05	-4,2E+00	3,0E+05	6,3E+04	4,7E+00
FA5_HUMAN	Coagulation factor V	6,8E-05	-4,2E+00	2,0E+05	9,4E+04	2,1E+00
H2AJ_HUMAN	Histone H2A.J	6,9E-05	-4,2E+00	2,2E+06	4,0E+05	5,4E+00
HEMO_HUMAN	Hemopexin	6,9E-05	-4,2E+00	8,4E+05	1,6E+05	5,1E+00
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	7,3E-05	-4,1E+00	1,1E+07	2,7E+07	4,3E-01
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	8,2E-05	-4,1E+00	4,1E+04	1,6E+04	2,5E+00
CO3_HUMAN	Complement C3	9,5E-05	-4,0E+00	2,5E+06	8,3E+05	3,0E+00
PRTN3_HUMAN	Myeloblastin	1,0E-04	-4,0E+00	9,2E+04	1,6E+04	5,7E+00
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	1,1E-04	-4,0E+00	1,7E+05	6,0E+04	2,8E+00
HV335_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-30-5	1,2E-04	-3,9E+00	1,1E+05	3,4E+04	3,2E+00
HV349_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-49	1,2E-04	-3,9E+00	3,9E+04	8,4E+03	4,6E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FRPD1_HUMAN	FERM and PDZ domain-containing protein 1	1,4E-04	-3,9E+00	1,2E+05	2,1E+04	5,7E+00
SPB6_HUMAN	Serpin B6	1,6E-04	-3,8E+00	2,3E+05	1,3E+05	1,8E+00
GPV_HUMAN	Platelet glycoprotein V	1,6E-04	-3,8E+00	1,7E+05	2,6E+04	6,7E+00
GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	1,6E-04	-3,8E+00	1,5E+05	4,7E+04	3,3E+00
CFAH_HUMAN	Complement factor H	2,0E-04	-3,7E+00	4,3E+05	1,3E+05	3,2E+00
LYAM3_HUMAN	P-selectin	2,1E-04	-3,7E+00	9,2E+04	1,7E+04	5,5E+00
HVD82_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-38-2	2,2E-04	-3,7E+00	2,1E+05	2,1E+04	1,0E+01
TAGL2_HUMAN	Transgelin-2	2,2E-04	-3,7E+00	1,7E+06	6,7E+05	2,5E+00
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain [Cleaved into: Fibrinopeptide B; Fibrinogen beta chain]	2,4E-04	-3,6E+00	8,9E+07	1,5E+08	5,9E-01
KV311_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-11	2,6E-04	-3,6E+00	3,0E+05	5,5E+04	5,5E+00
C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C	2,8E-04	-3,6E+00	6,4E+04	4,0E+03	1,6E+01
FHR1_HUMAN	Complement factor H-related protein 1	2,8E-04	-3,6E+00	1,5E+05	1,2E+04	1,2E+01
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	3,2E-04	-3,5E+00	9,0E+07	1,4E+08	6,3E-01
UE2NL_HUMAN	Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like	3,3E-04	-3,5E+00	7,1E+04	4,5E+04	1,6E+00
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	3,6E-04	-3,4E+00	2,8E+06	8,1E+05	3,4E+00
IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor	3,7E-04	-3,4E+00	2,8E+05	6,5E+04	4,3E+00
CAP7_HUMAN	Azurocidin	3,9E-04	-3,4E+00	1,1E+05	2,7E+04	4,0E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HPT_HUMAN	Haptoglobin	3,9E-04	-3,4E+00	1,4E+06	2,6E+05	5,3E+00
TGFB1_HUMAN	Transforming growth factor beta-1 proprotein [Cleaved into: Latency-associated peptide	3,9E-04	-3,4E+00	2,5E+05	6,0E+04	4,1E+00
ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	4,0E-04	-3,4E+00	7,4E+05	2,3E+05	3,2E+00
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	4,1E-04	-3,4E+00	6,7E+06	5,1E+06	1,3E+00
TKT_HUMAN	Transketolase	4,2E-04	-3,4E+00	8,2E+05	3,5E+05	2,4E+00
HEAT4_HUMAN	HEAT repeat-containing protein 4	4,3E-04	-3,4E+00	5,1E+05	1,2E+05	4,4E+00
GDIR2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	4,4E-04	-3,4E+00	6,4E+05	2,6E+05	2,4E+00
VINC_HUMAN	Vinculin	4,4E-04	-3,4E+00	1,8E+06	8,8E+05	2,1E+00
SH3L2_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 2	4,5E-04	-3,4E+00	7,7E+04	4,4E+04	1,8E+00
G6B_HUMAN	Megakaryocyte and platelet inhibitory receptor G6b	4,5E-04	-3,3E+00	1,9E+04	0,0E+00	Infinity
MMP9_HUMAN	Matrix metalloproteinase-9	4,7E-04	-3,3E+00	5,3E+05	2,7E+05	2,0E+00
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	6,0E-04	-3,2E+00	5,0E+05	2,8E+05	1,8E+00
PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	6,0E-04	-3,2E+00	1,8E+06	8,6E+05	2,1E+00
PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	6,2E-04	-3,2E+00	9,3E+05	3,4E+05	2,8E+00
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	6,4E-04	-3,2E+00	2,7E+06	5,9E+06	4,6E-01
CAB39_HUMAN	Calcium-binding protein 39	6,5E-04	-3,2E+00	4,8E+04	1,7E+04	2,8E+00
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain [Cleaved into: Fibrinopeptide A; Fibrinogen alpha chain]	6,5E-04	-3,2E+00	7,3E+07	1,2E+08	6,3E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TLN1_HUMAN	Talin-1	7,4E-04	-3,1E+00	4,0E+06	2,3E+06	1,8E+00
NGAL_HUMAN	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	8,0E-04	-3,1E+00	3,5E+05	1,9E+05	1,9E+00
SPTB2_HUMAN	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	8,9E-04	-3,1E+00	2,9E+04	1,6E+04	1,8E+00
RSU1_HUMAN	Ras suppressor protein 1	9,6E-04	-3,0E+00	2,0E+06	1,0E+06	2,0E+00
IGHA2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	1,0E-03	-3,0E+00	3,6E+04	2,5E+03	1,5E+01
PARVB_HUMAN	Beta-parvin	1,0E-03	-3,0E+00	1,1E+05	3,6E+04	3,0E+00
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	1,1E-03	-3,0E+00	6,2E+04	2,9E+04	2,1E+00
S10A8_HUMAN	Protein S100-A8	1,2E-03	-2,9E+00	4,5E+06	2,8E+06	1,6E+00
IGHG3_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	1,2E-03	-2,9E+00	3,3E+05	4,6E+04	7,2E+00
TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain	1,3E-03	-2,9E+00	4,7E+04	1,2E+04	3,8E+00
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	1,3E-03	-2,9E+00	2,1E+05	3,0E+04	7,0E+00
PGRP1_HUMAN	Peptidoglycan recognition protein 1	1,3E-03	-2,9E+00	2,2E+04	1,1E+04	2,0E+00
LDHB_HUMAN	L-lactate dehydrogenase B chain	1,6E-03	-2,8E+00	5,4E+05	3,1E+05	1,8E+00
LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain	1,6E-03	-2,8E+00	5,1E+05	2,6E+05	2,0E+00
ENPL_HUMAN	Endoplasmin	1,6E-03	-2,8E+00	1,4E+05	5,6E+04	2,5E+00
PLEK_HUMAN	Pleckstrin	1,7E-03	-2,8E+00	2,5E+05	1,4E+05	1,7E+00
GP1BB_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib beta chain	1,7E-03	-2,8E+00	1,0E+05	6,3E+04	1,6E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,8E-03	-2,7E+00	2,0E+05	3,3E+04	6,1E+00
ARP3_HUMAN	Actin-related protein 3	2,0E-03	-2,7E+00	5,6E+04	9,5E+03	5,8E+00
PNPH_HUMAN	Purine nucleoside phosphorylase	2,0E-03	-2,7E+00	3,5E+05	9,0E+04	3,9E+00
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	2,1E-03	-2,7E+00	4,1E+05	3,1E+05	1,3E+00
PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	2,1E-03	-2,7E+00	2,5E+05	7,8E+04	3,1E+00
HV601_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 6-1	2,2E-03	-2,7E+00	1,9E+05	1,3E+04	1,4E+01
TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	2,8E-03	-2,6E+00	2,1E+06	1,2E+06	1,9E+00
AMBP_HUMAN	Protein AMBP [Cleaved into: Alpha-1-microglobulin	3,2E-03	-2,5E+00	2,8E+04	5,5E+03	5,1E+00
TBA4A_HUMAN	Tubulin alpha-4A chain	3,3E-03	-2,5E+00	1,0E+05	1,8E+04	5,7E+00
HV43D_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-43D	3,5E-03	-2,5E+00	7,1E+04	3,0E+04	2,4E+00
HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta	3,8E-03	-2,4E+00	3,0E+05	6,8E+05	4,3E-01
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	4,0E-03	-2,4E+00	1,9E+06	1,3E+06	1,5E+00
NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B	4,1E-03	-2,4E+00	8,4E+04	4,0E+04	2,1E+00
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	4,1E-03	-2,4E+00	1,2E+05	5,2E+04	2,2E+00
DEF3_HUMAN	Neutrophil defensin 3	4,1E-03	-2,4E+00	9,7E+05	4,1E+05	2,3E+00
TYPH_HUMAN	Thymidine phosphorylase	4,3E-03	-2,4E+00	7,4E+03	2,2E+03	3,4E+00
CATD_HUMAN	Cathepsin D	4,3E-03	-2,4E+00	8,1E+02	1,7E+04	4,8E-02

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

VTNC_HUMAN	Vitronectin	4,3E-03	-2,4E+00	3,0E+05	1,6E+05	1,8E+00
CD5L_HUMAN	CD5 antigen-like	4,3E-03	-2,4E+00	1,3E+05	3,8E+04	3,4E+00
H32_HUMAN	Histone H3.2	4,4E-03	-2,4E+00	9,8E+05	4,9E+05	2,0E+00
IGLC3_HUMAN	Immunoglobulin lambda constant 3	4,7E-03	-2,3E+00	1,1E+06	2,2E+05	5,0E+00
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	4,7E-03	-2,3E+00	3,2E+04	6,0E+03	5,4E+00
PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase 1	4,9E-03	-2,3E+00	6,1E+04	1,0E+04	5,9E+00
PDLI1_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 1	5,5E-03	-2,3E+00	1,6E+04	0,0E+00	Infinity
ARPC4_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	5,5E-03	-2,3E+00	1,1E+05	4,1E+04	2,6E+00
ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A	5,6E-03	-2,3E+00	4,1E+05	1,4E+05	2,9E+00
ARC1B_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	6,1E-03	-2,2E+00	2,1E+04	8,7E+03	2,4E+00
THIO_HUMAN	Thioredoxin	6,2E-03	-2,2E+00	7,1E+04	3,1E+04	2,3E+00
FA49B_HUMAN	CYFIP-related Rac1 interactor B	6,6E-03	-2,2E+00	4,8E+04	8,4E+03	5,7E+00
GSTO1_HUMAN	Glutathione S-transferase omega-1	7,1E-03	-2,1E+00	2,5E+05	2,2E+05	1,2E+00
CATS_HUMAN	Cathepsin S	7,4E-03	-2,1E+00	4,6E+04	8,0E+04	5,7E-01
PYGL_HUMAN	Glycogen phosphorylase, liver form	7,6E-03	-2,1E+00	2,9E+04	9,3E+03	3,1E+00
PLSL_HUMAN	Plastin-2	7,7E-03	-2,1E+00	1,1E+06	6,5E+05	1,7E+00
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	9,2E-03	-2,0E+00	8,8E+05	1,2E+06	7,5E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SH3L3_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	1,0E-02	-2,0E+00	2,6E+05	9,0E+04	2,9E+00
UB2L3_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	1,1E-02	-2,0E+00	2,3E+04	6,7E+03	
SLAF5_HUMAN	SLAM family member 5	1,1E-02	-2,0E+00	9,2E+03	2,4E+03	3,8E+00
HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2	1,1E-02	-2,0E+00	1,3E+05	8,4E+04	1,5E+00
RB11B_HUMAN	Ras-related protein Rab-11B	1,1E-02	-2,0E+00	1,7E+05	1,1E+05	1,7E+00
ANXA3_HUMAN	Annexin A3	1,1E-02	-2,0E+00	1,9E+04	7,8E+03	2,5E+00
KV105_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-5	1,1E-02	-1,9E+00	6,2E+04	3,7E+03	1,7E+01
GTR14_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14	1,2E-02	-1,9E+00	3,2E+04	8,3E+03	3,8E+00
COTL1_HUMAN	Coactosin-like protein	1,2E-02	-1,9E+00	4,2E+04	1,7E+04	2,5E+00
BIN2_HUMAN	Bridging integrator 2	1,2E-02	-1,9E+00	1,4E+05	3,8E+04	3,7E+00
COR1C_HUMAN	Coronin-1C	1,3E-02	-1,9E+00	1,8E+04	8,3E+02	2,1E+01
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	1,3E-02	-1,9E+00	4,4E+05	2,5E+05	1,8E+00
GSHR_HUMAN	Glutathione reductase, mitochondrial	1,3E-02	-1,9E+00	5,7E+04	4,9E+04	1,2E+00
CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein	1,3E-02	-1,9E+00	4,9E+04	2,9E+04	1,7E+00
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	1,4E-02	-1,9E+00	3,0E+04	1,5E+04	2,0E+00
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	1,4E-02	-1,9E+00	1,4E+05	5,6E+04	2,4E+00
ELNE_HUMAN	Neutrophil elastase	1,4E-02	-1,8E+00	4,5E+04	5,2E+03	8,6E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

H4_HUMAN	Histone H4	1,5E-02	-1,8E+00	9,2E+05	6,5E+05	1,4E+00
PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2	1,6E-02	-1,8E+00	7,9E+04	1,8E+05	4,3E-01
ERP29_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 29	1,7E-02	-1,8E+00	1,8E+04	3,1E+03	5,9E+00
CAH2_HUMAN	Carbonic anhydrase 2	1,8E-02	-1,7E+00	3,3E+05	2,4E+05	1,4E+00
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	1,9E-02	-1,7E+00	6,3E+04	3,5E+04	1,8E+00
CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	2,0E-02	-1,7E+00	8,8E+05	4,3E+05	2,0E+00
ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb	2,1E-02	-1,7E+00	1,7E+06	7,0E+05	2,4E+00
IQCA1_HUMAN	Dynein regulatory complex protein 11	2,2E-02	-1,7E+00	5,2E+05	8,2E+05	6,3E-01
ILEU_HUMAN	Leukocyte elastase inhibitor	2,2E-02	-1,7E+00	1,2E+06	7,8E+05	1,5E+00
F13B_HUMAN	Coagulation factor XIII B chain	2,2E-02	-1,7E+00	2,9E+05	3,8E+05	7,6E-01
GRB2_HUMAN	Growth factor receptor-bound protein 2	2,7E-02	-1,6E+00	9,1E+04	4,3E+04	2,1E+00
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	2,8E-02	-1,5E+00	9,5E+04	1,4E+04	6,9E+00
MO4L2_HUMAN	Mortality factor 4-like protein 2	3,0E-02	-1,5E+00	8,1E+04	1,1E+05	7,4E-01
PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	3,1E-02	-1,5E+00	3,6E+04	2,6E+04	1,4E+00
ITB1_HUMAN	Integrin beta-1	3,3E-02	-1,5E+00	2,5E+04	5,7E+03	4,3E+00
ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	3,3E-02	-1,5E+00	5,4E+04	3,6E+04	1,5E+00
GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	3,4E-02	-1,5E+00	8,8E+04	6,3E+04	1,4E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	3,5E-02	-1,5E+00	1,5E+06	7,1E+05	2,1E+00
GLOD4_HUMAN	Glyoxalase domain-containing protein 4	3,6E-02	-1,4E+00	2,9E+04	1,8E+04	1,6E+00
TALDO_HUMAN	Transaldolase	4,0E-02	-1,4E+00	2,3E+05	1,2E+05	2,0E+00
TWF2_HUMAN	Twinfilin-2	4,2E-02	-1,4E+00	4,2E+04	8,4E+03	5,0E+00
IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	4,2E-02	-1,4E+00	1,1E+04	3,0E+03	3,7E+00
F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	4,5E-02	-1,3E+00	1,7E+06	1,5E+06	1,2E+00
CO4B_HUMAN	Complement C4-B	4,5E-02	-1,3E+00	6,8E+04	3,7E+04	1,8E+00
THRB_HUMAN	Prothrombin	4,5E-02	-1,3E+00	7,0E+04	4,6E+04	1,5E+00
VASP_HUMAN	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	4,6E-02	-1,3E+00	1,6E+04	6,8E+03	2,4E+00
MYH9_HUMAN	Myosin-9	4,6E-02	-1,3E+00	2,4E+06	2,0E+06	1,2E+00
CO5_HUMAN	Complement C5	4,9E-02	-1,3E+00	7,0E+04	2,9E+04	2,4E+00
FGL1_HUMAN	Fibrinogen-like protein 1	5,1E-02	-1,3E+00	2,5E+05	1,8E+05	1,4E+00
CAN1_HUMAN	Calpain-1 catalytic subunit	5,8E-02	-1,2E+00	7,7E+04	3,2E+04	2,4E+00
LKHA4_HUMAN	Leukotriene A-4 hydrolase	5,9E-02	-1,2E+00	6,7E+04	2,7E+04	2,5E+00
GELS_HUMAN	Gelsolin	7,0E-02	-1,2E+00	1,9E+06	1,4E+06	1,3E+00
S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	7,3E-02	-1,1E+00	4,5E+05	3,2E+05	1,4E+00
RB27B_HUMAN	Ras-related protein Rab-27B	7,8E-02	-1,1E+00	4,1E+05	5,0E+05	8,3E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MASP1_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 1	8,1E-02	-1,1E+00	1,8E+04	5,1E+03	3,5E+00
SH3L1_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	8,2E-02	-1,1E+00	2,3E+04	1,3E+04	1,7E+00
MYL6_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	8,7E-02	-1,1E+00	2,2E+05	2,7E+05	7,9E-01
TPM4_HUMAN	Tropomyosin alpha-4 chain	9,4E-02	-1,0E+00	1,0E+06	7,0E+05	1,5E+00
CBPN_HUMAN	Carboxypeptidase N catalytic chain	9,9E-02	-1,0E+00	1,4E+05	1,2E+05	1,2E+00
VWF_HUMAN	von Willebrand factor	1,1E-01	-9,7E-01	2,3E+06	1,6E+06	1,4E+00
TPM3_HUMAN	Tropomyosin alpha-3 chain	1,1E-01	-9,6E-01	7,9E+04	2,8E+04	2,9E+00
CD36_HUMAN	Platelet glycoprotein 4	1,1E-01	-9,6E-01	8,1E+04	3,4E+04	2,4E+00
LV325_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-25	1,2E-01	-9,3E-01	4,4E+03	0,0E+00	Infinity
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	1,2E-01	-9,3E-01	4,3E+05	3,3E+05	1,3E+00
BGH3_HUMAN	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	1,2E-01	-9,1E-01	1,9E+04	2,4E+04	7,9E-01
CATG_HUMAN	Cathepsin G	1,3E-01	-8,9E-01	5,6E+04	2,8E+04	2,0E+00
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	1,3E-01	-8,9E-01	2,4E+03	7,4E+02	3,2E+00
ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	1,3E-01	-8,8E-01	1,7E+06	2,2E+06	7,9E-01
NID1_HUMAN	Nidogen-1	1,3E-01	-8,8E-01	2,3E+05	1,7E+05	1,4E+00
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	1,3E-01	-8,8E-01	1,2E+05	8,0E+04	1,4E+00
FLNA_HUMAN	Filamin-A	1,3E-01	-8,7E-01	4,2E+06	3,9E+06	1,1E+00
CFAB_HUMAN	Complement factor B	1,6E-01	-8,1E-01	5,1E+03	0,0E+00	Infinity
SODC_HUMAN	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	1,6E-01	-7,9E-01	2,2E+04	2,6E+03	8,5E+00
CPN2_HUMAN	Carboxypeptidase N subunit 2	1,7E-01	-7,8E-01	5,7E+05	4,9E+05	1,2E+00
HV372_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-72	1,8E-01	-7,5E-01	6,0E+04	1,9E+04	3,2E+00
TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5	2,0E-01	-7,0E-01	3,3E+04	2,4E+04	1,4E+00
PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6	2,1E-01	-6,9E-01	4,7E+05	3,6E+05	1,3E+00
CAMP_HUMAN	Cathelicidin antimicrobial peptide	2,2E-01	-6,5E-01	4,3E+04	1,5E+04	2,8E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6PGD_HUMAN	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	2,5E-01	-6,1E-01	4,6E+03	9,4E+02	4,9E+00
LEGL_HUMAN	Galectin-related protein	2,5E-01	-6,1E-01	6,4E+03	1,7E+03	3,7E+00
LMNB1_HUMAN	Lamin-B1	2,8E-01	-5,6E-01	5,1E+03	2,9E+03	1,8E+00
FINC_HUMAN	Fibronectin	2,8E-01	-5,5E-01	2,7E+07	2,9E+07	9,3E-01
CYC_HUMAN	Cytochrome c	2,9E-01	-5,3E-01	4,7E+04	3,7E+04	1,3E+00
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	2,9E-01	-5,3E-01	7,5E+03	6,0E+03	1,2E+00
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	3,0E-01	-5,3E-01	1,2E+07	1,3E+07	9,4E-01
1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha	3,0E-01	-5,2E-01	1,0E+05	7,0E+04	1,4E+00
CATA_HUMAN	Catalase	3,1E-01	-5,1E-01	2,1E+05	2,5E+05	8,2E-01
GBB1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G	3,4E-01	-4,6E-01	1,0E+05	1,1E+05	9,0E-01
ARF1_HUMAN	ADP-ribosylation factor 1	3,7E-01	-4,3E-01	8,5E+03	0,0E+00	Infinity
ARPC3_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	3,7E-01	-4,3E-01	3,4E+03	0,0E+00	Infinity
COL10_HUMAN	Collectin-10	3,8E-01	-4,2E-01	5,2E+04	5,6E+04	9,3E-01
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	4,0E-01	-4,0E-01	4,5E+04	3,5E+04	1,3E+00
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	4,1E-01	-3,9E-01	4,5E+04	6,5E+04	6,8E-01
ACTS_HUMAN	Actin, alpha skeletal muscle	4,4E-01	-3,6E-01	3,0E+04	2,4E+04	1,3E+00
MMRN1_HUMAN	Multimerin-1	4,4E-01	-3,5E-01	9,1E+05	1,4E+06	6,5E-01
CLUS_HUMAN	Clusterin	4,6E-01	-3,4E-01	3,0E+03	6,8E+03	4,5E-01
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	4,7E-01	-3,3E-01	3,6E+06	4,0E+06	9,1E-01
PLMN_HUMAN	Plasminogen	4,7E-01	-3,3E-01	2,9E+06	3,0E+06	9,7E-01
LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	4,9E-01	-3,1E-01	1,0E+04	4,4E+03	2,3E+00
PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase	4,9E-01	-3,1E-01	2,8E+04	2,2E+04	1,3E+00
TTHY_HUMAN	Transthyretin	5,2E-01	-2,9E-01	1,9E+04	3,8E+04	5,0E-01
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	5,3E-01	-2,8E-01	4,5E+04	3,7E+04	1,2E+00
CAPZB_HUMAN	F-actin-capping protein subunit beta	5,9E-01	-2,3E-01	2,9E+04	4,1E+04	7,0E-01
ITLN1_HUMAN	Intelectin-1	5,9E-01	-2,3E-01	2,2E+04	1,7E+04	1,3E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	6,6E-01	-1,8E-01	2,4E+05	2,5E+05	9,5E-01
LG3BP_HUMAN	Galectin-3-binding protein	6,7E-01	-1,8E-01	1,9E+04	2,0E+04	9,5E-01
MDHC_HUMAN	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6,8E-01	-1,7E-01	2,1E+04	2,8E+04	7,4E-01
ANGL6_HUMAN	Angiopoietin-related protein 6	7,2E-01	-1,4E-01	1,6E+04	1,5E+04	1,1E+00
ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4	7,3E-01	-1,4E-01	2,0E+05	2,3E+05	8,7E-01
EMIL1_HUMAN	EMILIN-1	7,5E-01	-1,3E-01	1,8E+05	1,5E+05	1,2E+00
ABRAL_HUMAN	Costars family protein ABRACL	8,0E-01	-9,7E-02	1,5E+03	1,1E+03	1,4E+00
ARPC5_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	8,3E-01	-8,0E-02	3,0E+04	2,7E+04	1,1E+00
FBLN5_HUMAN	Fibulin-5	8,4E-01	-7,6E-02	8,9E+04	8,0E+04	1,1E+00
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	8,6E-01	-6,6E-02	3,5E+05	3,5E+05	9,9E-01
FBLN3_HUMAN	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	8,7E-01	-6,2E-02	3,0E+05	3,0E+05	1,0E+00
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	9,2E-01	-3,7E-02	3,8E+05	3,8E+05	1,0E+00
ECP_HUMAN	Eosinophil cationic protein	9,8E-01	-9,0E-03	2,7E+04	2,6E+04	1,0E+00
PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	9,9E-01	-5,5E-03	3,3E+04	3,3E+04	1,0E+00

Tabla suplementaria 6. Proteínas identificadas en el análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF por SWATH entre las condiciones día 3 vs día 21.

Código Uniprot	Proteína	p-value	Log (p)	Mean 1	Mean 2	Fold Change
MOES_HUMAN	Moesin	3,4E-08	-7,5E+00	6,7E+05	1,1E+05	5,9E+00
PERM_HUMAN	Myeloperoxidase	1,5E-07	-6,8E+00	2,2E+06	4,4E+04	5,0E+01
ALBU_HUMAN	Albumin	1,8E-07	-6,8E+00	9,1E+07	1,4E+07	6,4E+00
TSP1_HUMAN	Thrombospondin-1	3,4E-07	-6,5E+00	3,5E+07	1,8E+06	2,0E+01
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	5,0E-07	-6,3E+00	1,7E+05	5,3E+04	3,2E+00
IGHM_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant mu	6,3E-07	-6,2E+00	9,6E+06	1,7E+06	5,8E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

UE2NL_HUMAN	Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like	7,9E-07	-6,1E+00	7,1E+04	1,8E+04	4,0E+00
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	8,4E-07	-6,1E+00	1,4E+06	1,2E+05	1,2E+01
URP2_HUMAN	Fermitin family homolog 3	1,3E-06	-5,9E+00	4,9E+05	9,4E+04	5,3E+00
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	1,3E-06	-5,9E+00	1,6E+07	7,5E+06	2,1E+00
PLF4_HUMAN	Platelet factor 4	1,7E-06	-5,8E+00	5,3E+05	2,4E+04	2,2E+01
H2B1L_HUMAN	Histone H2B type 1-L	2,2E-06	-5,7E+00	3,1E+05	1,8E+04	1,7E+01
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	2,5E-06	-5,6E+00	4,3E+06	3,7E+05	1,1E+01
HVD82_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-38-2	2,9E-06	-5,5E+00	2,1E+05	0,0E+00	Infinity
CD9_HUMAN	CD9 antigen	3,0E-06	-5,5E+00	1,2E+05	1,4E+03	8,6E+01
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3,3E-06	-5,5E+00	2,0E+05	1,4E+04	1,5E+01
SPB6_HUMAN	Serpin B6	4,6E-06	-5,3E+00	2,3E+05	4,5E+04	5,1E+00
PROS_HUMAN	Vitamin K-dependent protein S	5,0E-06	-5,3E+00	4,5E+05	6,0E+04	7,6E+00
PROF1_HUMAN	Profilin-1	5,0E-06	-5,3E+00	4,0E+06	1,8E+05	2,1E+01
H32_HUMAN	Histone H3.2	5,4E-06	-5,3E+00	9,8E+05	1,6E+05	6,3E+00
TKT_HUMAN	Transketolase	8,8E-06	-5,1E+00	8,2E+05	1,6E+05	5,2E+00
KV320_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-20	9,2E-06	-5,0E+00	5,3E+05	6,4E+04	8,2E+00
GP1BA_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	9,7E-06	-5,0E+00	8,2E+05	1,1E+04	7,3E+01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	1,0E-05	-5,0E+00	5,6E+05	1,6E+05	3,6E+00
IGHA1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	1,1E-05	-5,0E+00	2,3E+06	3,5E+05	6,5E+00
LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain	1,2E-05	-4,9E+00	5,1E+05	1,2E+05	4,4E+00
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component	1,3E-05	-4,9E+00	3,4E+05	6,3E+04	5,4E+00
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	1,3E-05	-4,9E+00	1,5E+06	3,3E+05	4,6E+00
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	1,4E-05	-4,9E+00	3,1E+06	5,2E+05	5,9E+00
HV374_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-74	1,4E-05	-4,8E+00	4,2E+05	5,0E+04	8,4E+00
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	1,5E-05	-4,8E+00	6,2E+04	7,0E+03	8,8E+00
ITB3_HUMAN	Integrin beta-3	1,5E-05	-4,8E+00	6,2E+05	1,1E+05	5,7E+00
TLN1_HUMAN	Talin-1	1,6E-05	-4,8E+00	4,0E+06	1,1E+06	3,6E+00
IGHG2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	1,6E-05	-4,8E+00	9,6E+05	1,4E+05	6,7E+00
ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	1,6E-05	-4,8E+00	7,4E+05	9,2E+04	8,0E+00
RAP1A_HUMAN	Ras-related protein Rap-1A	1,7E-05	-4,8E+00	3,5E+05	3,7E+04	9,3E+00
GPV_HUMAN	Platelet glycoprotein V	1,9E-05	-4,7E+00	1,7E+05	2,8E+03	6,3E+01
H2AJ_HUMAN	Histone H2A.J	2,0E-05	-4,7E+00	2,2E+06	6,1E+04	3,5E+01
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	2,1E-05	-4,7E+00	4,1E+04	1,3E+03	3,2E+01
HVC05_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-30-5	2,4E-05	-4,6E+00	1,1E+05	0,0E+00	Infinity

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

S10A8_HUMAN	Protein S100-A8	2,5E-05	-4,6E+00	4,5E+06	2,8E+05	1,6E+01
PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	2,6E-05	-4,6E+00	2,5E+05	1,2E+04	2,1E+01
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain [Cleaved into: Fibrinopeptide B; Fibrinogen beta chain]	2,9E-05	-4,5E+00	8,9E+07	1,6E+08	5,5E-01
NGAL_HUMAN	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	3,3E-05	-4,5E+00	3,5E+05	4,1E+04	8,6E+00
IGHG1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	3,4E-05	-4,5E+00	4,7E+06	6,3E+05	7,6E+00
RSU1_HUMAN	Ras suppressor protein 1	3,4E-05	-4,5E+00	2,0E+06	1,4E+05	1,4E+01
F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	3,7E-05	-4,4E+00	1,7E+06	8,4E+05	2,0E+00
GP1BB_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib beta chain	3,8E-05	-4,4E+00	1,0E+05	3,2E+04	3,2E+00
ITB1_HUMAN	Integrin beta-1	4,0E-05	-4,4E+00	2,5E+04	0,0E+00	Infinity
HV349_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-49	4,1E-05	-4,4E+00	3,9E+04	4,8E+03	8,0E+00
FBLN1_HUMAN	Fibulin-1	4,3E-05	-4,4E+00	4,9E+05	8,9E+04	5,5E+00
SH3L2_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 2	4,5E-05	-4,3E+00	7,7E+04	1,8E+04	4,3E+00
CO3_HUMAN	Complement C3	4,8E-05	-4,3E+00	2,5E+06	4,5E+05	5,4E+00
IGKC_HUMAN	Immunoglobulin kappa constant	5,1E-05	-4,3E+00	4,8E+06	6,0E+05	8,1E+00
GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	5,6E-05	-4,3E+00	1,5E+05	2,0E+04	7,6E+00
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain	5,7E-05	-4,2E+00	1,5E+05	9,4E+03	1,6E+01
GDIR2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	5,9E-05	-4,2E+00	6,4E+05	5,3E+04	1,2E+01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	5,9E-05	-4,2E+00	6,7E+06	3,6E+06	1,9E+00
SPB9_HUMAN	Serpin B9	6,3E-05	-4,2E+00	1,7E+05	1,8E+03	9,2E+01
PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	6,3E-05	-4,2E+00	1,8E+06	1,3E+05	1,4E+01
H4_HUMAN	Histone H4	6,6E-05	-4,2E+00	9,2E+05	1,4E+05	6,5E+00
VINC_HUMAN	Vinculin	7,2E-05	-4,1E+00	1,8E+06	7,3E+05	2,5E+00
PRTN3_HUMAN	Myeloblastin	7,2E-05	-4,1E+00	9,2E+04	2,1E+03	4,3E+01
TAGL2_HUMAN	Transgelin-2	7,3E-05	-4,1E+00	1,7E+06	4,4E+05	3,8E+00
MYH9_HUMAN	Myosin-9	7,5E-05	-4,1E+00	2,4E+06	1,3E+06	1,9E+00
FRPD1_HUMAN	FERM and PDZ domain-containing protein 1	7,7E-05	-4,1E+00	1,2E+05	4,6E+03	2,7E+01
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain [Cleaved into: Fibrinopeptide A; Fibrinogen alpha chain]	8,5E-05	-4,1E+00	7,3E+07	1,5E+08	5,0E-01
LYAM3_HUMAN	P-selectin	8,5E-05	-4,1E+00	9,2E+04	2,7E+03	3,5E+01
MMP9_HUMAN	Matrix metalloproteinase-9	8,6E-05	-4,1E+00	5,3E+05	1,4E+05	3,8E+00
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	9,3E-05	-4,0E+00	4,1E+05	1,7E+05	2,5E+00
PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	9,5E-05	-4,0E+00	9,3E+05	1,6E+05	5,8E+00
ARPC4_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	9,7E-05	-4,0E+00	1,1E+05	3,3E+03	3,3E+01
CFAH_HUMAN	Complement factor H	9,9E-05	-4,0E+00	4,3E+05	9,9E+04	4,4E+00
FA5_HUMAN	Coagulation factor V	1,0E-04	-4,0E+00	2,0E+05	4,2E+04	4,7E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	1,0E-04	-4,0E+00	3,0E+05	6,8E+04	4,3E+00
CAH1_HUMAN	Carbonic anhydrase 1	1,1E-04	-4,0E+00	2,1E+05	1,3E+06	1,6E-01
CATD_HUMAN	Cathepsin D	1,1E-04	-3,9E+00	8,1E+02	1,0E+05	7,8E-03
KVD28_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-28	1,2E-04	-3,9E+00	2,2E+05	7,9E+04	2,9E+00
PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2	1,3E-04	-3,9E+00	7,9E+04	3,5E+05	2,2E-01
CAB39_HUMAN	Calcium-binding protein 39	1,4E-04	-3,8E+00	4,8E+04	4,6E+03	1,0E+01
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	1,5E-04	-3,8E+00	9,0E+07	1,6E+08	5,6E-01
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	1,6E-04	-3,8E+00	5,0E+05	2,7E+05	1,8E+00
TGFB1_HUMAN	Transforming growth factor beta-1 proprotein [Cleaved into: Latency-associated peptide	1,6E-04	-3,8E+00	2,5E+05	1,9E+04	1,3E+01
HEMO_HUMAN	Hemopexin	1,9E-04	-3,7E+00	8,4E+05	9,2E+04	9,2E+00
PLEK_HUMAN	Pleckstrin	1,9E-04	-3,7E+00	2,5E+05	6,6E+04	3,8E+00
CAP7_HUMAN	Azurocidin	2,0E-04	-3,7E+00	1,1E+05	5,8E+03	1,9E+01
KV311_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-11	2,2E-04	-3,7E+00	3,0E+05	4,1E+04	7,4E+00
IGHA2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	3,0E-04	-3,5E+00	3,6E+04	0,0E+00	Infinity
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	3,2E-04	-3,5E+00	2,8E+06	8,1E+05	3,4E+00
FHR1_HUMAN	Complement factor H-related protein 1	3,5E-04	-3,5E+00	1,5E+05	2,5E+04	6,0E+00
TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	3,6E-04	-3,4E+00	2,1E+06	4,6E+05	4,6E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor	3,6E-04	-3,4E+00	2,8E+05	7,5E+04	3,7E+00
FLNA_HUMAN	Filamin-A	3,8E-04	-3,4E+00	4,2E+06	2,4E+06	1,8E+00
PARVB_HUMAN	Beta-parvin	3,8E-04	-3,4E+00	1,1E+05	1,2E+04	9,0E+00
HPT_HUMAN	Haptoglobin	4,4E-04	-3,4E+00	1,4E+06	3,0E+05	4,7E+00
PGRP1_HUMAN	Peptidoglycan recognition protein 1	4,5E-04	-3,3E+00	2,2E+04	3,1E+03	7,3E+00
ARPC2_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	4,5E-04	-3,3E+00	2,7E+04	3,3E+03	8,3E+00
G6B_HUMAN	Megakaryocyte and platelet inhibitory receptor G6b	4,5E-04	-3,3E+00	1,9E+04	0,0E+00	Infinity
ILEU_HUMAN	Leukocyte elastase inhibitor	4,5E-04	-3,3E+00	1,2E+06	3,6E+05	3,2E+00
FGL1_HUMAN	Fibrinogen-like protein 1	5,0E-04	-3,3E+00	2,5E+05	5,0E+04	5,0E+00
COF1_HUMAN	Cofilin-1	5,1E-04	-3,3E+00	2,6E+05	6,9E+04	3,7E+00
ARC1B_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	5,2E-04	-3,3E+00	2,1E+04	3,6E+03	5,7E+00
LKHA4_HUMAN	Leukotriene A-4 hydrolase	5,3E-04	-3,3E+00	6,7E+04	5,4E+03	1,2E+01
HEAT4_HUMAN	HEAT repeat-containing protein 4	6,1E-04	-3,2E+00	5,1E+05	1,5E+05	3,4E+00
TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain	6,7E-04	-3,2E+00	4,7E+04	8,6E+03	5,4E+00
PLSL_HUMAN	Plastin-2	6,7E-04	-3,2E+00	1,1E+06	2,8E+05	3,9E+00
RB11B_HUMAN	Ras-related protein Rab-11B	7,4E-04	-3,1E+00	1,7E+05	2,3E+04	7,4E+00
GTR14_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14	7,5E-04	-3,1E+00	3,2E+04	1,3E+03	2,5E+01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LDHB_HUMAN	L-lactate dehydrogenase B chain	7,6E-04	-3,1E+00	5,4E+05	2,5E+05	2,2E+00
CAH2_HUMAN	Carbonic anhydrase 2	7,7E-04	-3,1E+00	3,3E+05	1,7E+05	1,9E+00
VTNC_HUMAN	Vitronectin	7,8E-04	-3,1E+00	3,0E+05	6,4E+04	4,7E+00
GRB2_HUMAN	Growth factor receptor-bound protein 2	7,9E-04	-3,1E+00	9,1E+04	1,6E+04	5,7E+00
IGHG3_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	8,9E-04	-3,0E+00	3,3E+05	2,3E+04	1,5E+01
DEF3_HUMAN	Neutrophil defensin 3	1,0E-03	-3,0E+00	9,7E+05	2,2E+05	4,5E+00
S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	1,1E-03	-2,9E+00	4,5E+05	2,3E+04	2,0E+01
DRC11_HUMAN	Dynein regulatory complex protein 11	1,2E-03	-2,9E+00	5,2E+05	9,2E+05	5,6E-01
AMBP_HUMAN	Protein AMBP [Cleaved into: Alpha-1-microglobulin	1,2E-03	-2,9E+00	2,8E+04	3,7E+03	7,8E+00
GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	1,2E-03	-2,9E+00	8,8E+04	3,9E+04	2,3E+00
SPTB2_HUMAN	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	1,3E-03	-2,9E+00	2,9E+04	5,4E+03	5,3E+00
PNPH_HUMAN	Purine nucleoside phosphorylase	1,4E-03	-2,9E+00	3,5E+05	4,8E+04	7,3E+00
THIO_HUMAN	Thioredoxin	1,4E-03	-2,9E+00	7,1E+04	1,2E+04	6,1E+00
HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2	1,5E-03	-2,8E+00	1,3E+05	5,0E+04	2,6E+00
ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb	1,6E-03	-2,8E+00	1,7E+06	3,9E+05	4,2E+00
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	1,7E-03	-2,8E+00	3,2E+04	2,0E+03	1,6E+01
HV43D_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-43D	1,7E-03	-2,8E+00	7,1E+04	1,1E+04	6,7E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COTL1_HUMAN	Coactosin-like protein	1,8E-03	-2,7E+00	4,2E+04	3,3E+03	1,3E+01
TYPH_HUMAN	Thymidine phosphorylase	1,9E-03	-2,7E+00	7,4E+03	6,0E+02	1,2E+01
PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase 1	1,9E-03	-2,7E+00	6,1E+04	8,3E+03	7,4E+00
HV601_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 6-1	2,0E-03	-2,7E+00	1,9E+05	1,4E+04	1,3E+01
ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A	2,2E-03	-2,7E+00	4,1E+05	6,9E+04	6,0E+00
TBA4A_HUMAN	Tubulin alpha-4A chain	2,3E-03	-2,6E+00	1,0E+05	1,0E+04	9,7E+00
GSTO1_HUMAN	Glutathione S-transferase omega-1	2,3E-03	-2,6E+00	2,5E+05	1,7E+05	1,5E+00
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	2,4E-03	-2,6E+00	4,4E+05	1,3E+05	3,5E+00
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	2,4E-03	-2,6E+00	2,2E+05	8,3E+04	2,6E+00
ENPL_HUMAN	Endoplasmin	2,4E-03	-2,6E+00	1,4E+05	2,7E+04	5,2E+00
ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	2,5E-03	-2,6E+00	5,4E+04	2,0E+04	2,7E+00
CYRIB_HUMAN	CYFIP-related Rac1 interactor B	2,5E-03	-2,6E+00	4,8E+04	4,0E+03	1,2E+01
CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein	2,5E-03	-2,6E+00	4,9E+04	2,1E+04	2,4E+00
SH3L3_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	2,6E-03	-2,6E+00	2,6E+05	1,2E+04	2,3E+01
SH3L1_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	2,7E-03	-2,6E+00	2,3E+04	8,9E+02	2,6E+01
CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	2,7E-03	-2,6E+00	8,8E+05	1,3E+05	6,8E+00
NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B	2,8E-03	-2,5E+00	8,4E+04	3,7E+04	2,3E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CD5L_HUMAN	CD5 antigen-like	2,9E-03	-2,5E+00	1,3E+05	2,6E+04	4,9E+00
PYGL_HUMAN	Glycogen phosphorylase, liver form	2,9E-03	-2,5E+00	2,9E+04	1,7E+03	1,8E+01
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	3,0E-03	-2,5E+00	4,5E+04	2,0E+05	2,2E-01
ARP3_HUMAN	Actin-related protein 3	3,2E-03	-2,5E+00	5,6E+04	1,2E+04	4,5E+00
BIN2_HUMAN	Bridging integrator 2	3,4E-03	-2,5E+00	1,4E+05	3,1E+03	4,5E+01
CAN1_HUMAN	Calpain-1 catalytic subunit	3,4E-03	-2,5E+00	7,7E+04	4,0E+04	1,9E+00
ERP29_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 29	3,7E-03	-2,4E+00	1,8E+04	1,5E+03	1,2E+01
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	3,7E-03	-2,4E+00	1,4E+05	2,1E+04	6,6E+00
GSHR_HUMAN	Glutathione reductase, mitochondrial	3,7E-03	-2,4E+00	5,7E+04	3,9E+04	1,5E+00
GLOD4_HUMAN	Glyoxalase domain-containing protein 4	3,8E-03	-2,4E+00	2,9E+04	4,9E+03	5,8E+00
VASP_HUMAN	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	4,1E-03	-2,4E+00	1,6E+04	4,8E+03	3,4E+00
IGLC3_HUMAN	Immunoglobulin lambda constant 3	4,2E-03	-2,4E+00	1,1E+06	2,1E+05	5,2E+00
NID1_HUMAN	Nidogen-1	4,3E-03	-2,4E+00	2,3E+05	1,1E+05	2,2E+00
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	4,3E-03	-2,4E+00	6,3E+04	2,7E+04	2,4E+00
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	4,3E-03	-2,4E+00	1,2E+05	4,7E+04	2,5E+00
CPN2_HUMAN	Carboxypeptidase N subunit 2	4,7E-03	-2,3E+00	5,7E+05	2,8E+05	2,1E+00
TPM4_HUMAN	Tropomyosin alpha-4 chain	4,7E-03	-2,3E+00	1,0E+06	2,7E+05	3,8E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ELNE_HUMAN	Neutrophil elastase	5,0E-03	-2,3E+00	4,5E+04	0,0E+00	Infinity
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	5,0E-03	-2,3E+00	2,1E+05	4,2E+04	4,9E+00
CATS_HUMAN	Cathepsin S	5,2E-03	-2,3E+00	4,6E+04	9,0E+04	5,1E-01
TWF2_HUMAN	Twinfilin-2	5,2E-03	-2,3E+00	4,2E+04	0,0E+00	Infinity
PDLI1_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 1	5,5E-03	-2,3E+00	1,6E+04	0,0E+00	Infinity
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	6,3E-03	-2,2E+00	3,5E+05	1,8E+05	1,9E+00
CALR_HUMAN	Calreticulin	6,3E-03	-2,2E+00	3,5E+05	7,7E+04	4,5E+00
FBLN5_HUMAN	Fibulin-5	6,4E-03	-2,2E+00	8,9E+04	1,1E+04	7,9E+00
ANXA3_HUMAN	Annexin A3	7,4E-03	-2,1E+00	1,9E+04	4,8E+03	4,0E+00
TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5	7,8E-03	-2,1E+00	3,3E+04	8,4E+03	4,0E+00
KV105_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-5	8,0E-03	-2,1E+00	6,2E+04	0,0E+00	Infinity
PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6	8,2E-03	-2,1E+00	4,7E+05	1,2E+05	4,0E+00
CATG_HUMAN	Cathepsin G	8,7E-03	-2,1E+00	5,6E+04	1,7E+03	3,3E+01
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	8,8E-03	-2,1E+00	1,9E+06	1,0E+06	1,9E+00
FINC_HUMAN	Fibronectin	9,7E-03	-2,0E+00	2,7E+07	2,2E+07	1,3E+00
COR1C_HUMAN	Coronin-1C	9,8E-03	-2,0E+00	1,8E+04	0,0E+00	Infinity
ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	1,2E-02	-1,9E+00	1,7E+06	1,2E+06	1,4E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CO4B_HUMAN	Complement C4-B	1,3E-02	-1,9E+00	6,8E+04	2,3E+04	2,9E+00
LMNB1_HUMAN	Lamin-B1	1,4E-02	-1,9E+00	5,1E+03	2,6E+02	2,0E+01
IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	1,5E-02	-1,8E+00	1,1E+04	1,1E+03	1,0E+01
PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	1,5E-02	-1,8E+00	3,6E+04	2,4E+04	1,5E+00
SLAF5_HUMAN	SLAM family member 5	1,6E-02	-1,8E+00	9,2E+03	1,7E+03	5,3E+00
CBPN_HUMAN	Carboxypeptidase N catalytic chain	1,9E-02	-1,7E+00	1,4E+05	1,0E+05	1,4E+00
CO5_HUMAN	Complement C5	1,9E-02	-1,7E+00	7,0E+04	2,6E+04	2,7E+00
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	2,2E-02	-1,7E+00	9,5E+04	6,8E+03	1,4E+01
MMRN1_HUMAN	Multimerin-1	2,4E-02	-1,6E+00	9,1E+05	1,9E+06	4,8E-01
THRB_HUMAN	Prothrombin	2,7E-02	-1,6E+00	7,0E+04	3,9E+04	1,8E+00
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	2,8E-02	-1,6E+00	3,0E+04	1,6E+04	1,9E+00
ITLN1_HUMAN	Intelectin-1	2,8E-02	-1,6E+00	2,2E+04	1,1E+04	2,0E+00
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	3,0E-02	-1,5E+00	7,5E+03	3,4E+03	2,2E+00
TALDO_HUMAN	Transaldolase	3,7E-02	-1,4E+00	2,3E+05	1,5E+05	1,6E+00
VWF_HUMAN	von Willebrand factor	4,3E-02	-1,4E+00	2,3E+06	1,3E+06	1,7E+00
TPM3_HUMAN	Tropomyosin alpha-3 chain	5,8E-02	-1,2E+00	7,9E+04	3,6E+04	2,2E+00
LG3BP_HUMAN	Galectin-3-binding protein	6,2E-02	-1,2E+00	1,9E+04	1,4E+04	1,3E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CD36_HUMAN	Platelet glycoprotein 4	6,4E-02	-1,2E+00	8,1E+04	1,8E+04	4,4E+00
CAMP_HUMAN	Cathelicidin antimicrobial peptide	6,7E-02	-1,2E+00	4,3E+04	1,2E+03	3,6E+01
GBB1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G	7,2E-02	-1,1E+00	1,0E+05	1,3E+05	7,6E-01
PLMN_HUMAN	Plasminogen	7,3E-02	-1,1E+00	2,9E+06	2,5E+06	1,2E+00
PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase	9,4E-02	-1,0E+00	2,8E+04	7,7E+03	3,7E+00
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	9,8E-02	-1,0E+00	4,3E+05	3,3E+05	1,3E+00
1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha	1,0E-01	-1,0E+00	1,0E+05	5,5E+04	1,8E+00
LV325_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-25	1,2E-01	-9,3E-01	4,4E+03	0,0E+00	Infinity
ANGL6_HUMAN	Angiopoietin-related protein 6	1,2E-01	-9,3E-01	1,6E+04	7,1E+03	2,3E+00
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	1,2E-01	-9,1E-01	2,7E+06	2,2E+06	1,2E+00
GELS_HUMAN	Gelsolin	1,3E-01	-9,0E-01	1,9E+06	1,6E+06	1,2E+00
BGH3_HUMAN	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	1,3E-01	-8,7E-01	1,9E+04	1,4E+04	1,4E+00
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	1,5E-01	-8,3E-01	4,5E+04	2,2E+04	2,0E+00
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	1,5E-01	-8,3E-01	1,2E+07	1,1E+07	1,1E+00
CFAB_HUMAN	Complement factor B	1,6E-01	-8,1E-01	5,1E+03	0,0E+00	Infinity
HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta	1,6E-01	-8,1E-01	3,0E+05	3,9E+05	7,6E-01
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	1,6E-01	-7,9E-01	2,4E+03	8,9E+02	2,7E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	1,6E-01	-7,9E-01	1,0E+04	0,0E+00	Infinity
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	1,7E-01	-7,7E-01	2,4E+05	2,9E+05	8,2E-01
MDHC_HUMAN	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	1,9E-01	-7,2E-01	2,1E+04	0,0E+00	Infinity
LEGL_HUMAN	Galectin-related protein	2,1E-01	-6,7E-01	6,4E+03	1,4E+03	4,5E+00
6PGD_HUMAN	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	2,2E-01	-6,6E-01	4,6E+03	8,7E+02	5,3E+00
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	2,4E-01	-6,2E-01	1,2E+05	9,0E+04	1,3E+00
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	2,4E-01	-6,1E-01	1,1E+07	1,3E+07	8,8E-01
COL10_HUMAN	Collectin-10	2,5E-01	-6,1E-01	5,2E+04	3,1E+04	1,7E+00
C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C	2,8E-01	-5,6E-01	6,4E+04	2,9E+04	2,3E+00
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	2,8E-01	-5,5E-01	3,6E+06	3,1E+06	1,2E+00
CYC_HUMAN	Cytochrome c	2,8E-01	-5,5E-01	4,7E+04	3,9E+04	1,2E+00
FBLN3_HUMAN	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	2,9E-01	-5,4E-01	3,0E+05	3,3E+05	9,2E-01
RB27B_HUMAN	Ras-related protein Rab-27B	3,2E-01	-5,0E-01	4,1E+05	5,0E+05	8,2E-01
MASP1_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 1	3,2E-01	-4,9E-01	1,8E+04	1,1E+04	1,6E+00
ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4	4,0E-01	-4,0E-01	2,0E+05	2,6E+05	7,7E-01
TTHY_HUMAN	Transthyretin	4,0E-01	-4,0E-01	1,9E+04	4,1E+04	4,7E-01
SODC_HUMAN	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	4,3E-01	-3,6E-01	2,2E+04	9,5E+03	2,3E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CATA_HUMAN	Catalase	4,4E-01	-3,6E-01	2,1E+05	1,5E+05	1,3E+00
ARPC5_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	4,6E-01	-3,4E-01	3,0E+04	1,7E+04	1,7E+00
HV372_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-72	4,6E-01	-3,4E-01	6,0E+04	3,9E+04	1,5E+00
ARF1_HUMAN	ADP-ribosylation factor 1	5,3E-01	-2,8E-01	8,5E+03	1,7E+04	5,1E-01
ACTS_HUMAN	Actin, alpha skeletal muscle	6,0E-01	-2,2E-01	3,0E+04	2,3E+04	1,3E+00
PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	6,5E-01	-1,8E-01	3,3E+04	2,9E+04	1,1E+00
ABRAL_HUMAN	Costars family protein ABRACL	6,9E-01	-1,6E-01	1,5E+03	8,2E+02	1,8E+00
EMIL1_HUMAN	EMILIN-1	7,3E-01	-1,4E-01	1,8E+05	1,6E+05	1,1E+00
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	7,7E-01	-1,1E-01	3,8E+05	4,1E+05	9,5E-01
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	8,0E-01	-9,6E-02	8,8E+05	9,1E+05	9,7E-01
ECP_HUMAN	Eosinophil cationic protein	8,2E-01	-8,7E-02	2,7E+04	2,1E+04	1,3E+00
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	8,3E-01	-7,9E-02	4,5E+04	4,2E+04	1,1E+00
MO4L2_HUMAN	Mortality factor 4-like protein 2	8,4E-01	-7,4E-02	8,1E+04	8,3E+04	9,7E-01
MYL6_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	9,0E-01	-4,5E-02	2,2E+05	2,1E+05	1,0E+00
CLUS_HUMAN	Clusterin	9,1E-01	-4,1E-02	3,0E+03	2,6E+03	1,2E+00
CAPZB_HUMAN	F-actin-capping protein subunit beta	9,6E-01	-1,6E-02	2,9E+04	2,7E+04	1,0E+00
F13B_HUMAN	Coagulation factor XIII B chain	1,0E+00	-1,1E-03	2,9E+05	2,9E+05	1,0E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla suplementaria 7. Proteínas identificadas en el análisis cuantitativo del secretoma de las membranas L-PRF por SWATH entre las condiciones día 7 vs día 21.						
Código Uniprot	Proteína	p-value	Log (p)	Mean 1	Mean 2	Fold Change
PERM_HUMAN	Myeloperoxidase	6,9E-07	-6,2E+00	6,8E+05	4,4E+04	1,5E+01
H2B1L_HUMAN	Histone H2B type 1-L	4,0E-06	-5,4E+00	1,4E+05	1,8E+04	7,8E+00
HVC05_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-30-5	6,8E-06	-5,2E+00	3,4E+04	0,0E+00	Infinity
S10A8_HUMAN	Protein S100-A8	8,2E-06	-5,1E+00	2,8E+06	2,8E+05	9,9E+00
TSP1_HUMAN	Thrombospondin-1	9,6E-06	-5,0E+00	7,8E+06	1,8E+06	4,4E+00
PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	1,4E-05	-4,9E+00	8,6E+05	1,3E+05	6,8E+00
PROS_HUMAN	Vitamin K-dependent protein S	1,9E-05	-4,7E+00	1,9E+05	6,0E+04	3,3E+00
GP1BA_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	3,7E-05	-4,4E+00	1,5E+05	1,1E+04	1,3E+01
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	5,2E-05	-4,3E+00	1,3E+06	3,7E+05	3,6E+00
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	6,0E-05	-4,2E+00	2,7E+07	1,3E+07	2,0E+00
TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	7,0E-05	-4,2E+00	1,2E+06	4,6E+05	2,5E+00
S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	7,8E-05	-4,1E+00	3,2E+05	2,3E+04	1,4E+01
PLEK_HUMAN	Pleckstrin	8,4E-05	-4,1E+00	1,4E+05	6,6E+04	2,2E+00
SH3L3_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	8,4E-05	-4,1E+00	9,0E+04	1,2E+04	7,8E+00
PROF1_HUMAN	Profilin-1	8,8E-05	-4,1E+00	1,4E+06	1,8E+05	7,4E+00
GDIR2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	9,7E-05	-4,0E+00	2,6E+05	5,3E+04	5,0E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NGAL_HUMAN	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	1,1E-04	-4,0E+00	1,9E+05	4,1E+04	4,6E+00
SPB6_HUMAN	Serpin B6	1,5E-04	-3,8E+00	1,3E+05	4,5E+04	2,8E+00
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	1,9E-04	-3,7E+00	6,5E+04	2,0E+05	3,3E-01
RAP1A_HUMAN	Ras-related protein Rap-1A	2,0E-04	-3,7E+00	8,4E+04	3,7E+04	2,3E+00
IGHG3_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	2,4E-04	-3,6E+00	4,6E+04	2,3E+04	2,0E+00
CD9_HUMAN	CD9 antigen	2,4E-04	-3,6E+00	2,7E+04	1,4E+03	1,9E+01
CO3_HUMAN	Complement C3	2,6E-04	-3,6E+00	8,3E+05	4,5E+05	1,8E+00
IGKC_HUMAN	Immunoglobulin kappa constant	2,6E-04	-3,6E+00	8,6E+05	6,0E+05	1,4E+00
CATD_HUMAN	Cathepsin D	2,8E-04	-3,6E+00	1,7E+04	1,0E+05	1,6E-01
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	2,8E-04	-3,5E+00	5,1E+05	1,2E+05	4,4E+00
PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6	3,1E-04	-3,5E+00	3,6E+05	1,2E+05	3,1E+00
MOES_HUMAN	Moesin	3,2E-04	-3,5E+00	2,1E+05	1,1E+05	1,9E+00
URP2_HUMAN	Fermitin family homolog 3	3,2E-04	-3,5E+00	1,7E+05	9,4E+04	1,9E+00
IGHM_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant mu	3,3E-04	-3,5E+00	2,8E+06	1,7E+06	1,7E+00
RSU1_HUMAN	Ras suppressor protein 1	3,3E-04	-3,5E+00	1,0E+06	1,4E+05	7,2E+00
UE2NL_HUMAN	Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like	3,5E-04	-3,5E+00	4,5E+04	1,8E+04	2,5E+00
MMP9_HUMAN	Matrix metalloproteinase-9	3,7E-04	-3,4E+00	2,7E+05	1,4E+05	1,9E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

H4_HUMAN	Histone H4	5,3E-04	-3,3E+00	6,5E+05	1,4E+05	4,5E+00
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain [Cleaved into: Fibrinopeptide A; Fibrinogen alpha chain]	5,8E-04	-3,2E+00	1,2E+08	1,5E+08	8,0E-01
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	5,8E-04	-3,2E+00	3,1E+05	1,7E+05	1,9E+00
FRPD1_HUMAN	FERM and PDZ domain-containing protein 1	6,1E-04	-3,2E+00	2,1E+04	4,6E+03	4,7E+00
HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2	6,3E-04	-3,2E+00	8,4E+04	5,0E+04	1,7E+00
FLNA_HUMAN	Filamin-A	7,1E-04	-3,1E+00	3,9E+06	2,4E+06	1,6E+00
SH3L2_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 2	7,4E-04	-3,1E+00	4,4E+04	1,8E+04	2,4E+00
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	7,7E-04	-3,1E+00	5,9E+06	2,2E+06	2,7E+00
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	8,0E-04	-3,1E+00	1,6E+04	1,3E+03	1,3E+01
PLSL_HUMAN	Plastin-2	8,8E-04	-3,1E+00	6,5E+05	2,8E+05	2,3E+00
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	1,0E-03	-3,0E+00	9,2E+06	7,5E+06	1,2E+00
TGFB1_HUMAN	Transforming growth factor beta-1 proprotein [Cleaved into: Latency-associated peptide	1,1E-03	-2,9E+00	6,0E+04	1,9E+04	3,2E+00
CAB39_HUMAN	Calcium-binding protein 39	1,2E-03	-2,9E+00	1,7E+04	4,6E+03	3,7E+00
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component	1,2E-03	-2,9E+00	1,3E+05	6,3E+04	2,1E+00
VTNC_HUMAN	Vitronectin	1,3E-03	-2,9E+00	1,6E+05	6,4E+04	2,6E+00
CAH1_HUMAN	Carbonic anhydrase 1	1,3E-03	-2,9E+00	7,0E+05	1,3E+06	5,4E-01
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	1,3E-03	-2,9E+00	5,1E+06	3,6E+06	1,4E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PLF4_HUMAN	Platelet factor 4	1,8E-03	-2,8E+00	8,2E+04	2,4E+04	3,4E+00
TLN1_HUMAN	Talin-1	2,0E-03	-2,7E+00	2,3E+06	1,1E+06	2,0E+00
CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	2,3E-03	-2,6E+00	4,3E+05	1,3E+05	3,3E+00
F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	2,4E-03	-2,6E+00	1,5E+06	8,4E+05	1,7E+00
FGL1_HUMAN	Fibrinogen-like protein 1	2,4E-03	-2,6E+00	1,8E+05	5,0E+04	3,5E+00
H2AJ_HUMAN	Histone H2A.J	2,6E-03	-2,6E+00	4,0E+05	6,1E+04	6,6E+00
CAP7_HUMAN	Azurocidin	2,8E-03	-2,5E+00	2,7E+04	5,8E+03	4,6E+00
PRTN3_HUMAN	Myeloblastin	2,9E-03	-2,5E+00	1,6E+04	2,1E+03	7,6E+00
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	3,1E-03	-2,5E+00	5,6E+04	2,1E+04	2,7E+00
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	3,2E-03	-2,5E+00	3,5E+05	1,8E+05	1,9E+00
ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	3,3E-03	-2,5E+00	3,6E+04	2,0E+04	1,8E+00
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha	3,3E-03	-2,5E+00	2,9E+04	7,0E+03	4,1E+00
VWF_HUMAN	von Willebrand factor	3,7E-03	-2,4E+00	1,6E+06	1,3E+06	1,2E+00
COTL1_HUMAN	Coactosin-like protein	4,3E-03	-2,4E+00	1,7E+04	3,3E+03	5,1E+00
PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2	4,5E-03	-2,3E+00	1,8E+05	3,5E+05	5,2E-01
FA5_HUMAN	Coagulation factor V	4,8E-03	-2,3E+00	9,4E+04	4,2E+04	2,2E+00
ALBU_HUMAN	Albumin	4,8E-03	-2,3E+00	1,1E+07	1,4E+07	8,1E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TPM4_HUMAN	Tropomyosin alpha-4 chain	4,8E-03	-2,3E+00	7,0E+05	2,7E+05	2,6E+00
HEAT4_HUMAN	HEAT repeat-containing protein 4	6,2E-03	-2,2E+00	1,2E+05	1,5E+05	7,8E-01
FINC_HUMAN	Fibronectin	6,5E-03	-2,2E+00	2,9E+07	2,2E+07	1,3E+00
DEF3_HUMAN	Neutrophil defensin 3	6,6E-03	-2,2E+00	4,1E+05	2,2E+05	1,9E+00
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	6,7E-03	-2,2E+00	2,3E+05	1,6E+05	1,4E+00
CO4B_HUMAN	Complement C4-B	7,6E-03	-2,1E+00	3,7E+04	2,3E+04	1,6E+00
RB11B_HUMAN	Ras-related protein Rab-11B	7,8E-03	-2,1E+00	1,1E+05	2,3E+04	4,5E+00
CPN2_HUMAN	Carboxypeptidase N subunit 2	7,9E-03	-2,1E+00	4,9E+05	2,8E+05	1,8E+00
GP1BB_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib beta chain	8,0E-03	-2,1E+00	6,3E+04	3,2E+04	2,0E+00
TKT_HUMAN	Transketolase	8,4E-03	-2,1E+00	3,5E+05	1,6E+05	2,2E+00
TYPH_HUMAN	Thymidine phosphorylase	8,8E-03	-2,1E+00	2,2E+03	6,0E+02	3,6E+00
TAGL2_HUMAN	Transgelin-2	9,0E-03	-2,0E+00	6,7E+05	4,4E+05	1,5E+00
F13B_HUMAN	Coagulation factor XIII B chain	9,5E-03	-2,0E+00	3,8E+05	2,9E+05	1,3E+00
GLOD4_HUMAN	Glyoxalase domain-containing protein 4	1,1E-02	-2,0E+00	1,8E+04	4,9E+03	3,7E+00
MYH9_HUMAN	Myosin-9	1,1E-02	-2,0E+00	2,0E+06	1,3E+06	1,5E+00
ILEU_HUMAN	Leukocyte elastase inhibitor	1,1E-02	-1,9E+00	7,8E+05	3,6E+05	2,2E+00
LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain	1,3E-02	-1,9E+00	2,6E+05	1,2E+05	2,2E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SH3L1_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	1,3E-02	-1,9E+00	1,3E+04	8,9E+02	1,5E+01
THIO_HUMAN	Thioredoxin	1,3E-02	-1,9E+00	3,1E+04	1,2E+04	2,7E+00
HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta	1,4E-02	-1,9E+00	6,8E+05	3,9E+05	1,8E+00
PYGL_HUMAN	Glycogen phosphorylase, liver form	1,4E-02	-1,9E+00	9,3E+03	1,7E+03	5,6E+00
IGHG1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	1,4E-02	-1,9E+00	7,7E+05	6,3E+05	1,2E+00
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain	1,4E-02	-1,9E+00	3,1E+04	9,4E+03	3,3E+00
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	1,5E-02	-1,8E+00	6,0E+03	3,4E+03	1,8E+00
PGRP1_HUMAN	Peptidoglycan recognition protein 1	1,5E-02	-1,8E+00	1,1E+04	3,1E+03	3,6E+00
H32_HUMAN	Histone H3.2	1,5E-02	-1,8E+00	4,9E+05	1,6E+05	3,1E+00
CAH2_HUMAN	Carbonic anhydrase 2	1,5E-02	-1,8E+00	2,4E+05	1,7E+05	1,4E+00
ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	1,7E-02	-1,8E+00	2,2E+06	1,2E+06	1,8E+00
GSHR_HUMAN	Glutathione reductase, mitochondrial	1,8E-02	-1,7E+00	4,9E+04	3,9E+04	1,3E+00
SPTB2_HUMAN	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	2,1E-02	-1,7E+00	1,6E+04	5,4E+03	3,0E+00
ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	2,1E-02	-1,7E+00	2,3E+05	9,2E+04	2,5E+00
GSTO1_HUMAN	Glutathione S-transferase omega-1	2,2E-02	-1,7E+00	2,2E+05	1,7E+05	1,2E+00
BIN2_HUMAN	Bridging integrator 2	2,4E-02	-1,6E+00	3,8E+04	3,1E+03	1,2E+01
BGH3_HUMAN	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	2,4E-02	-1,6E+00	2,4E+04	1,4E+04	1,7E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ARPC4_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	2,4E-02	-1,6E+00	4,1E+04	3,3E+03	1,2E+01
IGHA1_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	2,7E-02	-1,6E+00	6,1E+05	3,5E+05	1,7E+00
GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	2,8E-02	-1,5E+00	6,3E+04	3,9E+04	1,6E+00
LYAM3_HUMAN	P-selectin	2,9E-02	-1,5E+00	1,7E+04	2,7E+03	6,3E+00
LDHB_HUMAN	L-lactate dehydrogenase B chain	3,2E-02	-1,5E+00	3,1E+05	2,5E+05	1,2E+00
HV43D_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-43D	3,2E-02	-1,5E+00	3,0E+04	1,1E+04	2,8E+00
ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A	3,3E-02	-1,5E+00	1,4E+05	6,9E+04	2,0E+00
GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	3,4E-02	-1,5E+00	4,7E+04	2,0E+04	2,3E+00
ARC1B_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	3,5E-02	-1,5E+00	8,7E+03	3,6E+03	2,4E+00
TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5	3,6E-02	-1,4E+00	2,4E+04	8,4E+03	2,9E+00
CD5L_HUMAN	CD5 antigen-like	3,6E-02	-1,4E+00	3,8E+04	2,6E+04	1,5E+00
PNPH_HUMAN	Purine nucleoside phosphorylase	3,8E-02	-1,4E+00	9,0E+04	4,8E+04	1,9E+00
PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	3,8E-02	-1,4E+00	3,4E+05	1,6E+05	2,1E+00
MDHC_HUMAN	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	4,0E-02	-1,4E+00	2,8E+04	0,0E+00	Infinity
PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4,0E-02	-1,4E+00	7,8E+04	1,2E+04	6,7E+00
PLMN_HUMAN	Plasminogen	4,1E-02	-1,4E+00	3,0E+06	2,5E+06	1,2E+00
GPV_HUMAN	Platelet glycoprotein V	4,8E-02	-1,3E+00	2,6E+04	2,8E+03	9,4E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CATG_HUMAN	Cathepsin G	5,0E-02	-1,3E+00	2,8E+04	1,7E+03	1,7E+01
PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase	5,1E-02	-1,3E+00	2,2E+04	7,7E+03	2,8E+00
CFAH_HUMAN	Complement factor H	5,1E-02	-1,3E+00	1,3E+05	9,9E+04	1,4E+00
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	5,8E-02	-1,2E+00	1,4E+08	1,6E+08	8,9E-01
KV311_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-11	6,1E-02	-1,2E+00	5,5E+04	4,1E+04	1,3E+00
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain [Cleaved into: Fibrinopeptide B; Fibrinogen beta chain]	6,1E-02	-1,2E+00	1,5E+08	1,6E+08	9,3E-01
TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain	6,1E-02	-1,2E+00	1,2E+04	8,6E+03	1,4E+00
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	6,2E-02	-1,2E+00	1,2E+06	9,1E+05	1,3E+00
TBA4A_HUMAN	Tubulin alpha-4A chain	6,4E-02	-1,2E+00	1,8E+04	1,0E+04	1,7E+00
ARPC5_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	7,0E-02	-1,2E+00	2,7E+04	1,7E+04	1,5E+00
MYL6_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	7,4E-02	-1,1E+00	2,7E+05	2,1E+05	1,3E+00
FBLN1_HUMAN	Fibulin-1	7,7E-02	-1,1E+00	1,4E+05	8,9E+04	1,5E+00
IGHG2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	7,7E-02	-1,1E+00	1,7E+05	1,4E+05	1,2E+00
HV374_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-74	7,7E-02	-1,1E+00	8,7E+04	5,0E+04	1,7E+00
HV349_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-49	8,1E-02	-1,1E+00	8,4E+03	4,8E+03	1,7E+00
HPT_HUMAN	Haptoglobin	8,2E-02	-1,1E+00	2,6E+05	3,0E+05	8,8E-01
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	8,5E-02	-1,1E+00	1,3E+07	1,1E+07	1,2E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LG3BP_HUMAN	Galectin-3-binding protein	8,7E-02	-1,1E+00	2,0E+04	1,4E+04	1,4E+00
PARVB_HUMAN	Beta-parvin	8,8E-02	-1,1E+00	3,6E+04	1,2E+04	3,0E+00
VINC_HUMAN	Vinculin	1,0E-01	-9,9E-01	8,8E+05	7,3E+05	1,2E+00
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	1,1E-01	-9,5E-01	2,5E+05	1,3E+05	2,0E+00
CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein	1,1E-01	-9,5E-01	2,9E+04	2,1E+04	1,4E+00
ANXA3_HUMAN	Annexin A3	1,2E-01	-9,3E-01	7,8E+03	4,8E+03	1,6E+00
ARF1_HUMAN	ADP-ribosylation factor 1	1,2E-01	-9,3E-01	0,0E+00	1,7E+04	0,0E+00
ARPC2_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	1,2E-01	-9,3E-01	0,0E+00	3,3E+03	0,0E+00
CATA_HUMAN	Catalase	1,2E-01	-9,0E-01	2,5E+05	1,5E+05	1,6E+00
GRB2_HUMAN	Growth factor receptor-bound protein 2	1,3E-01	-8,9E-01	4,3E+04	1,6E+04	2,7E+00
ENPL_HUMAN	Endoplasmin	1,3E-01	-8,8E-01	5,6E+04	2,7E+04	2,1E+00
MO4L2_HUMAN	Mortality factor 4-like protein 2	1,3E-01	-8,8E-01	1,1E+05	8,3E+04	1,3E+00
CATS_HUMAN	Cathepsin S	1,5E-01	-8,3E-01	8,0E+04	9,0E+04	8,9E-01
LMNB1_HUMAN	Lamin-B1	1,5E-01	-8,3E-01	2,9E+03	2,6E+02	1,1E+01
CBPN_HUMAN	Carboxypeptidase N catalytic chain	1,5E-01	-8,3E-01	1,2E+05	1,0E+05	1,2E+00
NID1_HUMAN	Nidogen-1	1,5E-01	-8,2E-01	1,7E+05	1,1E+05	1,6E+00
ANGL6_HUMAN	Angiopoietin-related protein 6	1,6E-01	-8,1E-01	1,5E+04	7,1E+03	2,1E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	1,6E-01	-8,0E-01	1,4E+04	6,8E+03	2,0E+00
GBB1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G	1,6E-01	-8,0E-01	1,1E+05	1,3E+05	8,5E-01
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	1,6E-01	-7,9E-01	3,5E+04	2,2E+04	1,6E+00
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	1,7E-01	-7,7E-01	4,0E+06	3,1E+06	1,3E+00
FBLN5_HUMAN	Fibulin-5	1,7E-01	-7,6E-01	8,0E+04	1,1E+04	7,2E+00
COL10_HUMAN	Collectin-10	1,8E-01	-7,5E-01	5,6E+04	3,1E+04	1,8E+00
IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor	1,9E-01	-7,3E-01	6,5E+04	7,5E+04	8,6E-01
HEMO_HUMAN	Hemopexin	1,9E-01	-7,3E-01	1,6E+05	9,2E+04	1,8E+00
GELS_HUMAN	Gelsolin	1,9E-01	-7,2E-01	1,4E+06	1,6E+06	9,2E-01
GTR14_HUMAN	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14	1,9E-01	-7,1E-01	8,3E+03	1,3E+03	6,5E+00
ITB3_HUMAN	Integrin beta-3	2,0E-01	-7,0E-01	1,4E+05	1,1E+05	1,3E+00
HVD82_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 4-38-2	2,0E-01	-7,0E-01	2,1E+04	0,0E+00	Infinity
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	2,0E-01	-6,9E-01	7,1E+05	3,3E+05	2,2E+00
LKHA4_HUMAN	Leukotriene A-4 hydrolase	2,1E-01	-6,7E-01	2,7E+04	5,4E+03	5,0E+00
ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb	2,2E-01	-6,7E-01	7,0E+05	3,9E+05	1,8E+00
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	2,2E-01	-6,6E-01	1,3E+06	1,0E+06	1,2E+00
CAMP_HUMAN	Cathelicidin antimicrobial peptide	2,3E-01	-6,5E-01	1,5E+04	1,2E+03	1,3E+01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FBLN3_HUMAN	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	2,3E-01	-6,5E-01	3,0E+05	3,3E+05	9,1E-01
FHR1_HUMAN	Complement factor H-related protein 1	2,4E-01	-6,2E-01	1,2E+04	2,5E+04	4,9E-01
DRC11_HUMAN	Dynein regulatory complex protein 11	2,6E-01	-5,8E-01	8,2E+05	9,2E+05	8,9E-01
KV320_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 3-20	2,9E-01	-5,3E-01	8,2E+04	6,4E+04	1,3E+00
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	3,2E-01	-4,9E-01	2,5E+05	2,9E+05	8,6E-01
1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha	3,3E-01	-4,8E-01	7,0E+04	5,5E+04	1,3E+00
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	3,3E-01	-4,7E-01	6,0E+03	2,0E+03	3,0E+00
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	3,4E-01	-4,6E-01	3,7E+04	4,2E+04	8,8E-01
LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	3,7E-01	-4,3E-01	4,4E+03	0,0E+00	Infinity
TWF2_HUMAN	Twinfilin-2	3,7E-01	-4,3E-01	8,4E+03	0,0E+00	Infinity
ELNE_HUMAN	Neutrophil elastase	3,7E-01	-4,3E-01	5,2E+03	0,0E+00	Infinity
SPB9_HUMAN	Serpin B9	3,7E-01	-4,3E-01	0,0E+00	1,8E+03	0,0E+00
KV105_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 1-5	3,7E-01	-4,3E-01	3,7E+03	0,0E+00	Infinity
ITB1_HUMAN	Integrin beta-1	3,7E-01	-4,3E-01	5,7E+03	0,0E+00	Infinity
IGHA2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	3,7E-01	-4,3E-01	2,5E+03	0,0E+00	Infinity
COR1C_HUMAN	Coronin-1C	3,7E-01	-4,3E-01	8,3E+02	0,0E+00	Infinity
PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	3,8E-01	-4,3E-01	2,6E+04	2,4E+04	1,1E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

KNG1_HUMAN	Kininogen-1	3,8E-01	-4,2E-01	6,0E+04	5,3E+04	1,1E+00
CLUS_HUMAN	Clusterin	3,8E-01	-4,2E-01	6,8E+03	2,6E+03	2,6E+00
TALDO_HUMAN	Transaldolase	3,9E-01	-4,1E-01	1,2E+05	1,5E+05	7,9E-01
CD36_HUMAN	Platelet glycoprotein 4	3,9E-01	-4,1E-01	3,4E+04	1,8E+04	1,9E+00
IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	3,9E-01	-4,0E-01	3,0E+03	1,1E+03	2,8E+00
MMRN1_HUMAN	Multimerin-1	4,0E-01	-4,0E-01	1,4E+06	1,9E+06	7,4E-01
COF1_HUMAN	Cofilin-1	4,1E-01	-3,9E-01	8,7E+04	6,9E+04	1,3E+00
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	4,2E-01	-3,8E-01	8,0E+04	9,0E+04	8,9E-01
CYRIB_HUMAN	CYFIP-related Rac1 interactor B	4,2E-01	-3,7E-01	8,4E+03	4,0E+03	2,1E+00
C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C	4,4E-01	-3,5E-01	4,0E+03	2,9E+04	1,4E-01
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	4,4E-01	-3,5E-01	3,5E+04	2,7E+04	1,3E+00
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4,5E-01	-3,5E-01	3,3E+04	1,4E+04	2,4E+00
PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	4,6E-01	-3,4E-01	3,3E+04	2,9E+04	1,1E+00
MASP1_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 1	4,7E-01	-3,2E-01	5,1E+03	1,1E+04	4,6E-01
HV372_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 3-72	5,1E-01	-3,0E-01	1,9E+04	3,9E+04	4,9E-01
VASP_HUMAN	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	5,2E-01	-2,8E-01	6,8E+03	4,8E+03	1,4E+00
SODC_HUMAN	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	5,2E-01	-2,8E-01	2,6E+03	9,5E+03	2,8E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

THRB_HUMAN	Prothrombin	5,2E-01	-2,8E-01	4,6E+04	3,9E+04	1,2E+00
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	5,3E-01	-2,7E-01	3,8E+05	4,1E+05	9,3E-01
ITLN1_HUMAN	Intelectin-1	5,6E-01	-2,5E-01	1,7E+04	1,1E+04	1,5E+00
AMBP_HUMAN	Protein AMBP [Cleaved into: Alpha-1-microglobulin	6,1E-01	-2,1E-01	5,5E+03	3,7E+03	1,5E+00
NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B	6,1E-01	-2,1E-01	4,0E+04	3,7E+04	1,1E+00
CAN1_HUMAN	Calpain-1 catalytic subunit	6,5E-01	-1,9E-01	3,2E+04	4,0E+04	7,9E-01
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	6,7E-01	-1,8E-01	2,8E+05	2,7E+05	1,0E+00
ERP29_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 29	6,7E-01	-1,7E-01	3,1E+03	1,5E+03	2,1E+00
CAPZB_HUMAN	F-actin-capping protein subunit beta	6,7E-01	-1,7E-01	4,1E+04	2,7E+04	1,5E+00
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	6,8E-01	-1,7E-01	3,0E+04	4,2E+04	7,0E-01
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	6,9E-01	-1,6E-01	5,2E+04	4,7E+04	1,1E+00
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	7,0E-01	-1,6E-01	6,3E+04	6,8E+04	9,2E-01
TPM3_HUMAN	Tropomyosin alpha-3 chain	7,2E-01	-1,4E-01	2,8E+04	3,6E+04	7,8E-01
ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4	7,3E-01	-1,4E-01	2,3E+05	2,6E+05	8,9E-01
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	7,3E-01	-1,4E-01	7,5E+04	8,3E+04	9,1E-01
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	7,4E-01	-1,3E-01	7,4E+02	8,9E+02	8,3E-01
CYC_HUMAN	Cytochrome c	7,4E-01	-1,3E-01	3,7E+04	3,9E+04	9,5E-01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SLAF5_HUMAN	SLAM family member 5	7,6E-01	-1,2E-01	2,4E+03	1,7E+03	1,4E+00
ARP3_HUMAN	Actin-related protein 3	7,6E-01	-1,2E-01	9,5E+03	1,2E+04	7,8E-01
ABRAL_HUMAN	Costars family protein ABRACL	7,7E-01	-1,2E-01	1,1E+03	8,2E+02	1,3E+00
LEGL_HUMAN	Galectin-related protein	7,8E-01	-1,1E-01	1,7E+03	1,4E+03	1,2E+00
KVD28_HUMAN	Immunoglobulin kappa variable 2D-28	8,1E-01	-9,1E-02	7,6E+04	7,9E+04	9,7E-01
CO5_HUMAN	Complement C5	8,3E-01	-7,9E-02	2,9E+04	2,6E+04	1,1E+00
IGLC3_HUMAN	Immunoglobulin lambda constant 3	8,6E-01	-6,8E-02	2,2E+05	2,1E+05	1,0E+00
PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase 1	8,6E-01	-6,7E-02	1,0E+04	8,3E+03	1,2E+00
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	8,6E-01	-6,6E-02	5,0E+05	5,2E+05	9,7E-01
ECP_HUMAN	Eosinophil cationic protein	8,8E-01	-5,5E-02	2,6E+04	2,1E+04	1,3E+00
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	8,9E-01	-5,2E-02	1,5E+04	1,6E+04	9,7E-01
HV601_HUMAN	Immunoglobulin heavy variable 6-1	9,1E-01	-4,1E-02	1,3E+04	1,4E+04	9,4E-01
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	9,1E-01	-3,9E-02	3,3E+05	3,3E+05	9,9E-01
TTHY_HUMAN	Transthyretin	9,2E-01	-3,8E-02	3,8E+04	4,1E+04	9,4E-01
ACTS_HUMAN	Actin, alpha skeletal muscle	9,2E-01	-3,5E-02			
EMIL1_HUMAN	EMILIN-1	9,3E-01	-3,3E-02	1,5E+05	1,6E+05	9,4E-01
6PGD_HUMAN	6 phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	9,5E-01	-2,5E-02	9,4E+02	8,7E+02	1,1E+00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	9,6E-01	-1,8E-02	8,1E+05	8,1E+05	1,0E+00
RB27B_HUMAN	Ras-related protein Rab-27B	9,8E-01	-9,4E-03	5,0E+05	5,0E+05	1,0E+00
CALR_HUMAN	Calreticulin	9,9E-01	-3,1E-03	7,8E+04	7,7E+04	1,0E+00
PDLI1_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 1	1,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	NaN
G6B_HUMAN	Megakaryocyte and platelet inhibitory receptor G6b	1,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	NaN
CFAB_HUMAN	Complement factor B	1,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	NaN
LV325_HUMAN	Immunoglobulin lambda variable 3-25	1,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	NaN

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO VI. LISTA DE PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PERIODO DE TESIS

Publicaciones cuyo contenido se incluye en la presente tesis doctoral:

Hermida-Nogueira L, Barrachina MN, Izquierdo I, García-Vence M, Lacerenza S, Bravo S, Castrillo A, García Á. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with Mirasol® identifies biomarkers of platelet storage lesion. J Proteomics. 2020 Jan 6;210:103529. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103529. Epub 2019 Oct 9.

Hermida-Nogueira L, Barrachina MN, Morán LA, Bravo S, Diz P, García Á, Blanco J. Deciphering the secretome of leukocyte-platelet rich fibrin: towards a better understanding of its wound healing properties. Sci Rep. 2020 Sep 3;10(1):14571. doi: 10.1038/s41598-020-71419-7

Otras publicaciones de la doctoranda como autora principal:

Hermida-Nogueira L, García Á. Extracellular vesicles in the transfusion medicine field: The potential of proteomics. Proteomics. 2021 Jul;21(13-14):e2000089. doi: 10.1002/pmic.202000089. Epub 2021 May 4.

Otras publicaciones:

Barrachina MN, Sueiro AM, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Guitián E, Casanueva FF, Farndale RW, Moroi M, Jung SM, Pardo M, García Á. GPVI surface expression and signalling pathway activation are increased in platelets from obese patients: Elucidating potential anti-atherothrombotic targets in obesity. Atherosclerosis. 2019 Feb;281:62-70. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.023. Epub 2018 Dec 25.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Barrachina MN, Sueiro AM, Casas V, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Guitián E, Casanueva FF, Abián J, Carrascal M, Pardo M, García Á. A Combination of Proteomic Approaches Identifies A Panel of Circulating Extracellular Vesicle Proteins Related to the Risk of Suffering Cardiovascular Disease in Obese Patients. Proteomics. 2019 Jan;19(1-2):e1800248. doi: 10.1002/pmic.201800248. Epub 2018 Dec 27.

Izquierdo I, Barrachina MN, Hermida-Nogueira L, Casas V, Eble JA, Carrascal M, Abián J, García Á. Platelet membrane lipid rafts protein composition varies following GPVI and CLEC-2 receptors activation. J Proteomics. 2019 Mar 20;195:88-97. doi: 10.1016/j.jprot.2019.01.014. Epub 2019 Jan 22.

Barrachina MN, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Sueiro AM, Guitián E, Casanueva FF, Farndale RW, Moroi M, Jung SM, Pardo M, García Á. Data on hyper-activation of GPVI signalling in obese patients: Towards the identification of novel antiplatelet targets in obesity. Data Brief. 2019 Feb 28;23:103784. doi: 10.1016/j.dib.2019.103784.

Izquierdo I, Barrachina MN, Hermida-Nogueira L, Casas V, Morán LA, Lacerenza S, Pinto-Llorente R, Eble JA, de Los Ríos V, Domínguez E, Loza MI, Casal JI, Carrascal M, Abián J, García A. A Comprehensive Tyrosine Phosphoproteomic Analysis Reveals Novel Components of the Platelet CLEC-2 Signaling Cascade. Thromb Haemost. 2020 Feb;120(2):262-276. doi: 10.1055/s-0039-3400295. Epub 2020 Jan 4.

Barrachina MN, Hermida-Nogueira L, Moran LA, Casas V, Hicks SM, Sueiro AM, Di Y, Andrews RK, Watson SP, Gardiner EE, Abian J, Carrascal M, Pardo M, García Á. Phosphoproteomic Analysis of Platelets in Severe Obesity Uncovers Platelet Reactivity and Signaling Pathways Alterations. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2021 Jan;41(1):478-490. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314485. Epub 2020 Nov 5.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Barrachina MN, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Morán LA, Pérez A, Arroyo AB, García-Barberá N, González-Conejero R, Troitiño S, Eble JA, Rivera J, Martínez C, Loza MI, Domínguez E, García Á. The PI3Kδ Inhibitor Idelalisib Diminishes Platelet Function and Shows Antithrombotic Potential. Int J Mol Sci. 2021 Mar 24;22(7):3304. doi: 10.3390/ijms22073304.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO VII. TESIS MONOGRÁFICA CON REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE PUBLICACIONES

Publicaciones cuyo contenido se incluye en la presente tesis doctoral:

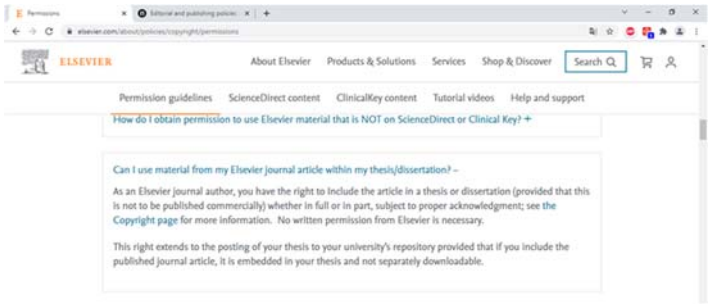
Hermida-Nogueira L, Barrachina MN, Izquierdo I, García-Vence M, Lacerenza S, Bravo S, Castrillo A, García Á.Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with Mirasol® identifies biomarkers of platelet storage lesion. J Proteomics. 2020 Jan 6;210:103529. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103529. Epub 2019 Oct 9.

La revista Journal of Proteomics tiene un índice de impacto de 4,044. Pertenece a la categoría Biochemical Research Methods y se encuentra en la posición 20 de 77. El año de publicación de este artículo en la revista fue el 2019.

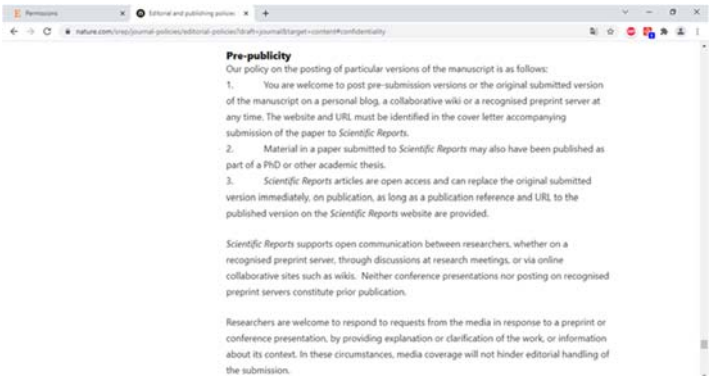
Hermida-Nogueira L, Barrachina MN, Morán LA, Bravo S, Diz P, García Á, Blanco J.Deciphering the secretome of leukocyte-platelet rich fibrin: towards a better understanding of its wound healing properties. Sci Rep. 2020 Sep 3;10(1):14571. doi: 10.1038/s41598-020-71419-7

La revista Scientific Reports tiene un índice de impacto de 4,379. Pertenece a la categoría Multidisciplinary Sciences y se encuentra en la posición 10 de 135. El año de publicación de este artículo en la revista fue 2020.

Ambas revistas permiten el uso de las publicaciones en la tesis doctoral.



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Pre-publicity

Our policy on the posting of particular versions of the manuscript is as follows:

1. You are welcome to post pre-submission versions or the original submitted version of the manuscript on a personal blog, a collaborative wiki or a recognised preprint server at any time. The website and URL must be identified in the cover letter accompanying submission of the paper to *Scientific Reports*.
2. Material in a paper submitted to *Scientific Reports* may also have been published as part of a PhD or other academic thesis.
3. *Scientific Reports* articles are open access and can replace the original submitted version immediately, on publication, as long as a publication reference and URL to the published version on the *Scientific Reports* website are provided.

Scientific Reports supports open communication between researchers, whether on a recognised preprint server, through discussions at research meetings, or via online collaborative sites such as wikis. Neither conference presentations nor posting on recognised preprint servers constitute prior publication.

Researchers are welcome to respond to requests from the media in response to a preprint or conference presentation, by providing explanation or clarification of the work, or information about its context. In these circumstances, media coverage will not hinder editorial handling of the submission.

En ambas publicaciones la contribución de la autora de esta tesis doctoral fue la realización de los experimentos, el análisis de los datos y la escritura de los artículos.

El capítulo de la tesis donde se reproduce el contenido de la publicación "Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with Mirasol® identifies biomarkers of platelet storage lesion" es el 4.1 titulado: Estudio del contenido de las VEs liberadas por los CP tratados con Mirasol durante el almacenamiento.

Los autores y su afiliación es la siguiente:

Lidia Hermida-Nogueira[1], María N Barrachina[1], Irene Izquierdo[1], María García-Vence[2], Serena Lacerenza[3], Susana Bravo[2], Azucena Castrillo[4], Ángel García[5]

[1]Platelet Proteomics Group, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, and Instituto de Investigación Sanitaria(IDIS), Santiago de Compostela, Spain.

[2]Proteomics Unit, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela, Spain.

[3]Department of Pharmacy, University of Pisa, Pisa, Italy.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[4]Axencia Galega de Sangue, Órganos e Tecidos, Galicia, Spain.

[5]Platelet Proteomics Group, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, and Instituto de Investigación

Hermida-Nogueira L, Barrachina MN, Izquierdo I, García-Vence M, Lacerenza S, Bravo S, Castrillo A, García Á. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with Mirasol® identifies biomarkers of platelet storage lesion. J Proteomics. 2020 Jan 6;210:103529. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103529. Epub 2019 Oct 9.

El ISSN de Journal of Proteomics es 1874-3919 y pertenece a la editorial Elsevier.

El capítulo de la tesis donde se reproduce el contenido de la publicación "Deciphering the secretome of leukocyte-platelet rich fibrin: towards a better understanding of its wound healing properties" es el 4.2 titulado: Estudio de caracterización del perfil proteómico del secretoma de las membranas L-PRF.

Los autores y su afiliación es la siguiente:

Lidia Hermida-Nogueira[1], María N. Barrachina[1], Luis A. Morán[1], Susana Bravo[2], Pedro Diz[3], Ángel García[1], and Juan Blanco[4]

[1]Platelet Proteomics Group, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS), and Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, Avda de Barcelona s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

[2]Proteomics Unit, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela, Spain

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[3]Medical-Surgical Dentistry Research Group (OMEQUI), Faculty of Medicine and Odontology, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela, Spain

[4]Periodontology Unit, Medical-Surgical Dentistry Research Group (OMEQUI), Faculty of Medicine and Odontology, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela, Spain

Hermida-Nogueira L, Barrachina MN, Morán LA, Bravo S, Diz P, García Á, Blanco J. Deciphering the secretome of leukocyte-platelet rich fibrin: towards a better understanding of its wound healing properties. Sci Rep. 2020 Sep 3;10(1):14571. doi: 10.1038/s41598-020-71419-7

El ISSN de Scientific Reports es 2045-2322 y pertenece a la editorial Nature Publishing Group.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Declaración de conflicto de interés

La doctoranda declara que no existe ningún tipo de conflicto de interés en el desarrollo de la presente tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 11 de Noviembre de 2021

Fdo. Lidia Hermida Nogueira

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA