



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR**

JERSEY HEITOR DA SILVA MAUÉS

**PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MicroRNAs DURANTE O
ARMAZENAMENTO PROLONGADO DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS COMO
FERRAMENTA DE MEDIÇÃO DE QUALIDADE EM BANCOS DE SANGUE**

BELÉM-PA

2019

JERSEY HEITOR DA SILVA MAUÉS

**PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MicroRNAs DURANTE O
ARMAZENAMENTO PROLONGADO DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS COMO
FERRAMENTA DE MEDIÇÃO DE QUALIDADE EM BANCOS DE SANGUE**

Tese de Doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA – como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular – Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano

BELÉM-PA

2019

COMPOSIÇÃO INTITUCIONAL E FICHA CATALOGRÁFICA

- 1- Universidade Federal do Pará – UFPA
Laboratório de Citogenética Humana – LCH
Laboratório de Biologia Molecular – Hospital Ophir Loyola
- 2- Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Pará – HEMOPA
- 3- Fontes Financiadoras:
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará - FAPESPA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M447p Maués, Jersey Heitor da Silva.
PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MicroRNAs DURANTE O ARMAZENAMENTO PROLONGADO DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS COMO FERRAMENTA DE MEDIÇÃO DE QUALIDADE EM BANCOS DE SANGUE : Perfil de microRNAs em plaquetas armazenadas em bancos de sangue / Jersey Heitor da Silva Maués, . — 2019.
148 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.
1. Concentrado de plaquetas. 2. Danos celulares. 3. Biomarcadores. 4. microRNA. 5. Bancos de sangue. I. Título.

CDD 574.88

JERSEY HEITOR DA SILVA MAUÉS

**PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MicroRNAs DURANTE O
ARMAZENAMENTO PROLONGADO DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS COMO
FERRAMENTA DE MEDIÇÃO DE QUALIDADE EM BANCOS DE SANGUE**

Tese de Doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA – como requisito para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular – Área de concentração: Biologia Celular.

Orientação:

Prof. Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano

Banca Examinadora:

Dra. Bárbara do Nascimento Borges
Laboratório de Biologia Molecular

Dra. Priscilla Cristina Moura Vieira
Laboratório de Biologia Molecular – Hospital Ophir Loyola

Dra. Letícia Martins Lamarão – Membro externo (suplente)
Laboratório de Ácidos Nucléicos – Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do
Estado do Pará (HEMOPA)

Dra. Thais Brilhante Pontes
Laboratório de Biologia Molecular – Hospital Ophir Loyola

Belém, 28 de fevereiro de 2019

Dedico este trabalho aos meus Pais *Josenor e Graça* e as minhas queridas irmãs: *Gerany e Carla* que estiveram ao meu lado durante esta trajetória.

Ao Meu Pai:

“Aqui, o resultado de uma luta solitária entre momentos bons e difíceis que enfrentamos juntos durante essa caminhada. Isso foi resiliente para o andamento e a conclusão desse trabalho”.

Jersey Heitor da Silva Maués

Hoje, nesta fase muito especial da minha vida, eu chego à conclusão deste trabalho e quero fazer alguns agradecimentos.

Eu agradeço a Universidade Federal do Pará pela aquisição desse conhecimento e pelo apoio financeiro concedido as nossas publicações científicas. Da mesma forma, eu sou grato à coordenação da Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, sempre disposta atender as nossas solicitações.

Muito obrigado ao meu grande amigo e orientador Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano, pela paciência dedicada a esta orientação. Das reuniões em sua casa com muitos cafés, correções de artigos, discussões de problemáticas e, além de tudo, muitos conselhos que foram valiosos para o meu aperfeiçoamento. Tio, você é um profissional INCRÍVEL. Muito obrigado por tudo.

Quero dedicar a minha gratidão e amor a toda minha família que acreditou e me apoiou nessa jornada. Meu Pai: Josenor Maués e minha Mãe: Maria das Graças Maués. As minhas maninhas, Gerany e Carla Maués, obrigado pelos incentivos e muitas conversas. Agradeço a todos os meus tios, primos e primas, em especial, à minha tia Dra. Auxiliadora Maués que dedicou seu prestígio e apoio com muitas palavras de motivação.

Eu tenho um agradecimento valoroso a fazer a Dra. Marisa Fabiana Nicolás, diretora da equipe do Laboratório Nacional de Computação Científica – LNCC, pelo enorme incentivo, que me motivou a seleção do CBAB 2017 em Petrópolis, onde coordenou o curso de RNA-Seq, nos dedicou total atenção logística, receptiva e com uma política de produção científica que é um exemplo para todos nós pesquisadores. Uma pessoa extraordinária.

Hoje o meu sentimento de felicidade é enorme pela conclusão de meu doutorado. Eu faço um agradecimento muito especial a Dra. Caroline Aquino Moreira-Nunes que foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho. É uma grande amiga, parceira de equipe e pesquisadora exemplar. Muito obrigado pelos conselhos e sugestões que foram muito produtivos. Que a nossa parceria continue.

Assim como os amigos da nossa equipe de pesquisa que colaboraram com as nossas publicações, a única forma que vejo de retribuir, é lhe oferecendo aquilo que de maior valor eu posso dar, a minha amizade!

Quero agradecer, a Dra. Cibele Moreira e a Dra. Sheila Maysa, ambas professoras na Universidade Federal do Oeste e Sudeste do Pará, que a mim, depositaram confiança para seguir nossos trabalhos paralelos, uma parceria regada a muitos cafés.

Aos professores. Os meus mais profundos agradecimentos e também a expressão da minha estima e do meu maior respeito. Eu, vos reconheço, um esforço incessante com uma paciência e sabedoria admirável em nossas aulas. “São vocês que nos dão os recursos e ferramentas para evoluir rumo ao conhecimento todos os dias”.

À banca. Recebam meus sinceros agradecimentos pela paciência e contribuição dedicada a esta tese. Todas as considerações serão valiosas para o aprimoramento deste trabalho.

Finalizo os meus sinceros agradecimentos a Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Pará – HEMOPA, pela parceria nesse estudo com UFPA e o Laboratório de Citogenética Humana. Muito obrigado às fontes financiadoras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará – FAPESPA.

Jersey Heitor da Silva Maués

“É meu sincero desejo que alguns de vocês continuem com este trabalho científico e mantenham para sua ambição a determinação de fazer uma contribuição permanente para a ciência”.

Marie Curie (1867-1934)

RESUMO

O concentrado de plaquetas (CP) é um componente essencial do sangue que, mesmo em boas condições ideais de armazenamento, é suscetível a danos celulares ao longo do tempo. Assim, os bancos de sangue descartam bolsas de CP não utilizadas após cinco dias de armazenamento. Os biomarcadores da qualidade do CP são, portanto, muito procurados na governança do banco de sangue. Nesse trabalho foram usados os dados (*Gene Expression Omnibus*: GSE61856) gerados com NGS – *Next Generation Sequencing* (Sequenciamento de Próxima Geração) para examinar os perfis de expressão de microRNAs (miRNAs) de CPs que foram armazenados por seis dias em um banco de sangue, ou seja, um dia a mais do que é normalmente armazenado o CP. Foram identificados 14 miRNAs diferencialmente expressos, comparando um CP controle do primeiro dia de armazenamento com os CPs alvos de cada um dos cinco dias subsequentes de armazenamento (do primeiro ao sexto dia). Ao todo, foram identificados nove miRNAs com o perfil *downregulated* ou diminuição de expressão (*miR-145-5p*, *miR-150-5p*, *miR-183-5p*, *miR-26a-5p*, *miR-331-3p*, *miR-338-5p*, *miR-451a*, *miR-501-3p* e *miR-99b-5p*) e cinco miRNAs com o perfil *upregulated* ou aumento de expressão (*miR-1304-3p*, *miR-411-5p*, *miR-432-5p*, *miR-668-3p* e *miR-939-5p*). Esses miRNAs foram validados por PCR quantitativo em tempo real em 100 unidades de CPs. Como cada unidade de CP é composta por plaquetas de cinco indivíduos, a validação foi realizada em 500 indivíduos (250 homens e 250 mulheres, com idade entre 18 e 40 anos). Os dados foram analisados com agrupamento hierárquico e Análise de Componentes Principais (PCA), que revelaram como variação da média da expressão relativa refletiu a instabilidade da meia-vida dos miRNAs no quarto dia de armazenamento dos CPs, coincidido com o tempo de aparecimento das lesões de armazenamento plaquetário. Essas novas observações podem informar de maneira útil a futura tomada de decisões na governança dos bancos de sangue sobre a qualidade dos CPs.

Palavras-chave: Concentrado de plaquetas, Danos celulares, Biomarcadores, microRNA, Bancos de sangue.

ABSTRACT

Platelet concentrate (PC) is a key blood component, which even in good storage conditions, susceptible to cellular damage over time. Hence, blood banks discard unused PC bags after 5 days of storage. Biomarkers of PC quality are therefore highly sought after in blood bank governance. We used the data (Gene Expression Omnibus: GSE61856) generated with next-generation sequencing to examine the expression profiles of microRNAs (miRNAs) from PCs that were stored for 6 days in a blood bank, that is, 1 day longer than is normally stored PC. We identified the 14 most differentially expressed miRNAs by comparing a control PC on the first day of storage with the PCs on each of the subsequent 5 days of storage from day 1 to 6. In all, we identified nine miRNAs with the downregulated profile (miR-145-5p, miR-150-5p, miR-183-5p, miR-26a-5p, miR-331-3p, miR-338-5p, miR-451a, miR-501-3p, and miR-99b-5p) and five upregulated miRNAs (miR-1304-3p, miR-411-5p, miR-432-5p, miR-668-3p, and miR-939-5p). These miRNAs were validated by real-time quantitative PCR in 100 PC units. As each PC unit is composed of platelets of five individuals, the validation was thus performed in 500 individuals (250 men and 250 women, comprised 18–40 years old adults). The data were analyzed with hierarchical clustering and principal component analysis, which revealed the variation of mean relative expression and the instability of miRNAs half-life on the fourth day of PC storage, which coincides with time of onset of platelet storage lesions. These new observations can usefully inform future decision-making and governance in blood banks concerning PC quality.

Keywords: Platelet concentrates, Cellular damage, Biomarkers, microRNA, Blood bank

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA	1: Diagrama dos principais grânulos e do conteúdo secretório das plaquetas.....	25
FIGURA	2: Armazenamento do concentrado de plaquetas e a liberação de modificadores de resposta biológica	29
FIGURA	3: Abordagens com análise de proteômica do concentrado de plaquetas	31
FIGURA	4: Estruturas preditas de <i>stem-loops</i> de miRNAs.....	33
FIGURA	5: A biogênese e a função do MicroRNA	36
FIGURA	6: Principais etapas enzimáticas necessárias para processar transcritos primários em miRNAs maduros na via da biogênese	37
FIGURA	7: Principais estudos que levaram ao conhecimento científico da identificação dos miRNAs em plaquetas	40
FIGURA	8: A modulação do repertório de mRNA de plaquetas por miRNAs.....	44
FIGURA	9: As sequências de miRNAs maduros geradas pelo experimento de RNA-SEQ.....	47
FIGURA	10: Estruturas de <i>loop-miR</i>	48
FIGURA	11: Principais vias de biogênese da vesícula extracelular e a incorporação de miRNAs em exossomos.	52
FIGURA	12: Modelo de aprendizado supervisionado e não-supervisionado.....	54
FIGURA	13: <i>Pipelines</i> para identificação de miRNAs.....	65
FIGURA	16: Perfil de miRNAs quantificados em CP.....	72
FIGURA	17: Expressão da média relativa de miRNAs <i>downregulated</i> (ANÁLISE COM RQ-PCR)	77

FIGURA	18: Expressão da média relativa de miRNAs <i>upregulated</i> (ANÁLISE RQ-PCR).....	78
FIGURA	19: Agrupamento hierárquico e PCA.....	80
FIGURA	20: Análise da expressão de mirnas <i>downregulated</i> por RQ-PCR no quarto dia do CP.....	81
FIGURA	21: Análise da expressão de miRNAs <i>upregulated</i> por RQ-PCR no quarto dia do CP.....	82
FIGURA	22: Fluxos de trabalhos para identificação e validação dos miRNAs	83
FIGURA	23: Vias de apoptose em célula nucleada e plaquetas anucleadas.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Amostras usadas nesse estudo	63
TABELA 2: Resumo dos dados de miRNAs de plaquetas.	70
TABELA 3: miRNAs diferencialmente expressos mais comuns em cinco condições	74

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	<i>3'- Untranslated region</i>
A	Adenina
ADP	Adenosina Difosfato
Ago2	Argonauta 2
ATP	Adenosina trifosfato
Pb	Pares de bases
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
CDS	Sequência codificadora de DNA, do inglês <i>Coding DNA sequence</i>
CP	Concentrado de plaquetas
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DGCR8	A região crítica de DiGeorge 8, do inglês <i>DiGeorge Critical Region 8</i>
ESCRT	Complexo de triagem endossômica necessários para o transporte, do inglês <i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
FVW	Fator de Von Willebrand
FTP	Protocolo de Transferência de Arquivos, do inglês <i>File Transfer Protocols</i>
G	Guanina
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GFF	Formato de característica geral, do inglês <i>General Feature Format</i>
HDL	Proteína de alta densidade, do Inglês <i>High Density Lipoproteins</i>
hsa	Homo sapiens
MPs	Micropartículas
mRNA	RNA mensageiro
miRBase	O banco de dados de microRNAs do inglês "The microRNAs Database"
miR/miRNA	microRNA
miRnomas	Conjunto de completo de todos os microRNAs.
NGS	Sequenciamento de nova geração, do inglês <i>Next-Generation Sequencing</i>
ncRNA	RNA não-codificante
nt	Nucleotídeo
<i>On-line</i>	Conectado direta ou indiretamente a um computador.

PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
Pre-miRNA	microRNA precursor
Pri-miRNA	Transcrito primário longo de microRNA
PSL	Lesão de armazenamento de plaquetas, do inglês <i>Platelet Storage Lesion</i>
P value	Valor de P
<i>Reads</i>	Resultado obtido após o sequenciamento de genomas ou transcriptomas por sequenciadores de alto desempenho. Corresponde a uma pequena sequência de poucos pares de base.
RISC	Complexo indutor do silenciamento do mRNA inglês <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-Seq	Sequenciamento do RNA, do inglês <i>RNA sequencing</i>
RQ	Quantificação relativa
RQ-PCR	PCR Quantitativa em tempo real, do inglês <i>Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SHS	Estado de Saúde Sub-ótimo, do Inglês SHS - <i>Suboptimal Health Status</i>
ST	Transfusão do Sangue Total
SVD	Escala de Variância Unitária, do Inglês <i>Unit Variance Scale</i>
sRNA-seq	Sequenciamento de alto rendimento do RNA pequeno, do inglês <i>Small RNA high throughput sequencing</i>
TargetScan	Previsão de alvos de microRNAs, do inglês <i>Prediction of microRNAs Target</i>
TRBP	Proteína de ligação ao RNA da resposta a transativação, do inglês <i>Trans-Activion response RNA-binding protein</i>
U	Uracila
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>Untranslated region</i>

LISTA DE SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBAB	Centro Brasil-Argentino de Biotecnologia
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPESPA	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará
HEMOPA	Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Pará
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
LNCC	Laboratório Nacional de Computação Científica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação
PNBC	Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular
UFPA	Universidade Federal do Pará
UFPI	Universidade Federal do Piauí
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1.1	Qualificação do Problema: Concentrado de plaquetas e lesões de armazenamento	24
1.2	MicroRNAs.....	32
1.2.1	Um breve histórico e Biogênese	32
1.2.2	MicroRNAs em plaquetas	38
1.2.3	Identificação de miRNAs com o método RNA-Seq.....	46
1.2.4	MiRNAs como ferramenta de medição de qualidade do CP.....	50
1.2.5	Reconhecimento de padrões em Bioinformática	53
2	JUSTIFICATIVAS	57
3	OBJETIVOS	60
3.1	GERAL	61
3.1	ESPECÍFICOS	61
4	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1	Declaração de ética	63
4.2.1	Proveniência dos dados públicos utilizados	63
4.2.2	Dados de expressão de miRNAs.....	63
4.2.3	Genoma de referência e anotação dos miRNAs	64
4.3	Identificação <i>in silico</i> dos miRNAs	64
4.4	O perfil de miRNAs entre CP de diferentes dias de armazenamento	66
4.5	Análise da expressão diferencial dos miRNAs.....	66
4.6	Validação da expressão de miRNAs em 100 unidades de CP	66
4.7	Estatísticas.....	68
5	RESULTADOS	69
5.1	Análise das bibliotecas sequenciadas	70
5.2	Comparação da expressão diferencial de miRNAs no CP armazenado.....	71
5.3	Perfil de quantificação de miRNAs no CP.....	75

5.4	Validação de miRNAs diferencialmente expressos por RQ-PCR	76
5.5	Análise do agrupamento hierárquico e PCA	78
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÕES	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
9	APÊNDICES	106
10	ANEXOS	120
	ANEXO A. ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO À TESE	121
	ANEXO B. ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO À TESE	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Qualificação do Problema: Concentrado de plaquetas e lesões de armazenamento

As plaquetas são pequenas células anucleadas que se originam essencialmente da fragmentação de pseudópodes da membrana citoplasmática de megacariócitos na medula óssea (SUT et al., 2018). Em uma pessoa saudável as plaquetas circulam no sangue por cerca de sete a dez dias e depois são retiradas da circulação e destruídas no baço (COOKSON et al., 2010; DELOBEL et al., 2010). A contagem normal em seres humanos varia de 150.000 a 400.000 plaquetas por milímetro cúbico (mm³) de sangue (DALY, 2011).

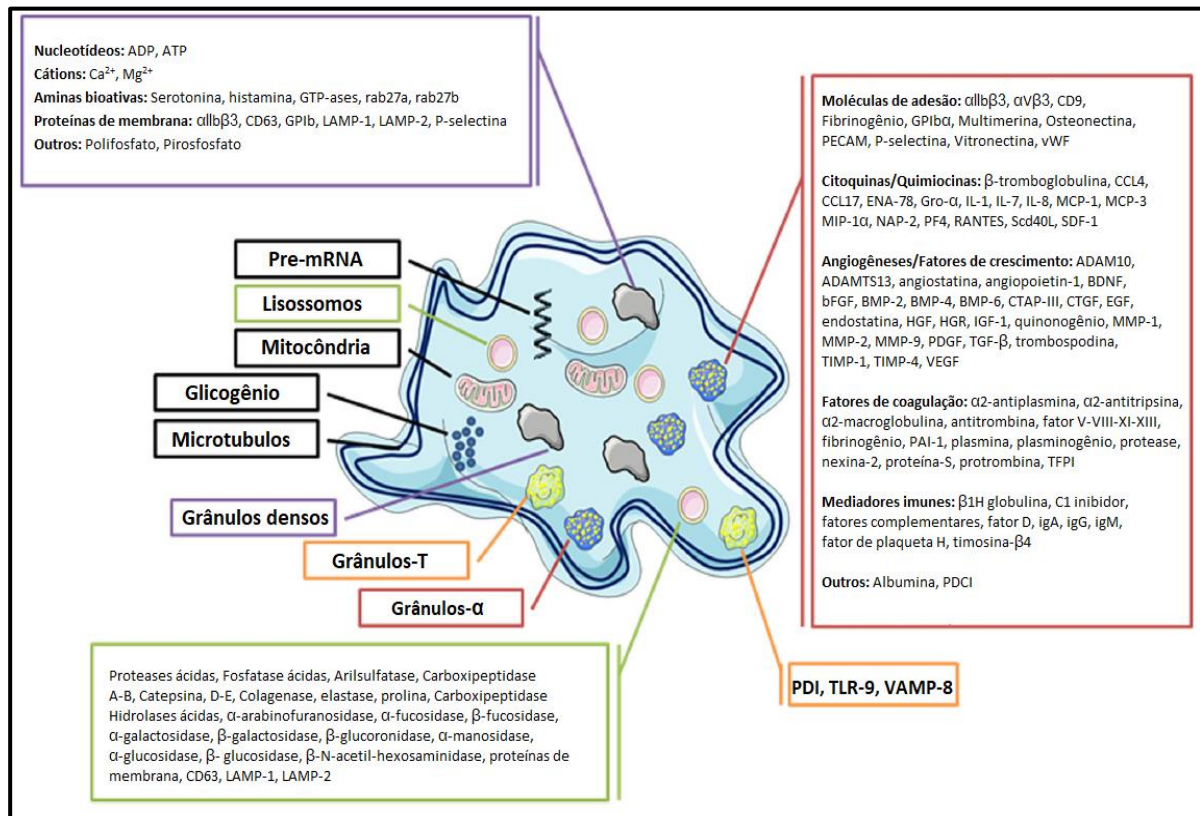
As plaquetas circulantes desempenham um papel fundamental no reparo vascular e manutenção da homeostase, particularmente na hemostasia primária. Esse reparo vascular ocorre quando as glicoproteínas da membrana plaquetária interagem com os elementos do endotélio exposto (colágeno ou agonistas circulantes), mediando sua adesão, seguida de ativação e finalmente agregação, resultando em um trombo formado pela agregação de plaquetas interligadas pelo fibrinogênio que dá origem a um tampão hemostático crescente que impede a perda de sangue (SUT et al., 2018).

As plaquetas desempenham um papel importante na imunidade inata e adaptativa, interagindo direta ou indiretamente com outras células do sistema imunológico para desencadear ou manter a resposta inflamatória. Diversos fatores estão envolvidos no processo inflamatório das plaquetas, em particular, a expressão de vários receptores imunológicos, como citocinas, quimiocinas e um grande número de fatores solúveis encontrado em seus grânulos densos como os imunomoduladores e de crescimento, etc (SUT et al., 2018).

Além disso, as plaquetas também liberam fatores de crescimento, que promovem a angiogênese e são necessários para reparar danos relacionados aos locais de inflamação, fatores de coagulação importantes para as funções hemostáticas, peptídeos antibacterianos, fatores de adesão e mediadores inflamatórios como a serotonina e a histamina (SUT et al., 2018). O diagrama

mostrado na FIGURA 1, ilustra os principais grânulos e o conteúdo secretório das plaquetas.

FIGURA 1: DIAGRAMA DOS PRINCIPAIS GRÂNULOS E DO CONTEÚDO SECRETÓRIO DAS PLAQUETAS.



Fonte: adaptado de SUT et al., 2018.

Alcançar hemostasia após a lesão é fundamental para a sobrevivência. A hemorragia é responsável por 30% a 40% das fatalidades relacionadas ao trauma, com um quarto de todos os pacientes com trauma, apresentando algum grau de hemorragia prolongada associada à coagulopatia. Mortes por traumatismos relacionados à hemorragia, geralmente, ocorrem dentro das duas primeiras horas de internação, tornando este período crítico para um rápido fornecimento de intervenções capazes de salvar vidas (CARDENAS et al., 2018).

A transfusão de plaquetas tem sido uma terapia eficaz para a prevenção e tratamento de hemorragias, particularmente em pacientes com neoplasias hematológicas. Cerca de 15% dos pacientes gravemente enfermos necessitam de

transfusão de plaquetas durante a permanência na unidade de terapia intensiva para tratamento ou profilaxia de sangramento (SUT et al., 2018).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 343 do Ministério da Saúde, o procedimento padrão de preparação dos hemocomponentes a partir de ST é o seguinte: uma vez colhido em bolsa apropriada contendo anticoagulante, o ST é centrifugado pelo gradiente de densidade para a separação dos glóbulos de acordo com seu tamanho e densidade e os componentes são distribuídos em bolsas estéreis interligadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Os glóbulos vermelhos assentam, enquanto o plasma permanece no topo contendo os glóbulos brancos e plaquetas, os quais formam uma camada denominada "*Buffy coat*" na interface. Em seguida os componentes são distribuídos em bolsas estéreis interligadas (DELOBEL et al., 2010).

A fim de evitar reações pós-transfusionais e aloimunização¹, os produtos derivados do sangue passam, sistematicamente, por uma filtração denominada leucorredução. Cada componente obtido a partir do ST, é submetido a condições ideais de armazenamento, o que permite preservar suas atividades e funções específicas. A temperatura é um fator importante no armazenamento e determina a viabilidade e a qualidade dos produtos destinados à transfusão (DELOBEL et al., 2010; KUMAR et al., 2006).

A transfusão de componentes plaquetários é amplamente usada, sendo rotineiramente fornecida na forma de **Concentrados de Plaquetas (CPs)**. A produção e estoque dos CPs envolve várias etapas, como o recrutamento e seleção de doadores de sangue, onde o CP é obtido por meio do fracionamento de uma doação de Sangue Total (ST) doado: 450-500 mL (GARRAUD et al., 2016; LIUMBRUNO, 2008).

Em seguida, os CPs podem ser preparados, principalmente, por dois métodos diferentes: (i) aférese de plaquetas de um único doador, utilizando um

¹ Aloimunização é a formação de anticorpos quando há exposição do indivíduo a antígenos não próprios e, conseqüentemente, formação de um quadro hemolítico. A melhoria na transfusão do CP pelas técnicas padrão, incluem a descontaminação de leucócitos, que são responsáveis por reações adversas após a transfusão de plaquetas, como reação febril, efeitos imunomodulatórios adversos, aloimunização e, principalmente, contaminação bacteriana (MOHANTY, 2009).

separador de células; ou (ii) obter plaquetas a partir de *Buffy coats* de quatro a seis diferentes doadores (GARRAUD et al., 2016; LIUMBRUNO, 2008). Os CPs são armazenados por até cinco dias à temperatura ambiente (22 ± 2 °C) com agitação suave e contínua. A duração mais longa do armazenamento de plaquetas não tem sido recomendada devido ao possível risco de contaminação bacteriana (CHO et al., 2018; DELOBEL et al., 2010).

O CP consiste de uma suspensão de plaquetas em plasma, preparado mediante dupla centrifugação de uma unidade de ST. É importante que este ST não seja colhido em tempo maior que 15 minutos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). O CP deve conter, pelo menos, $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas e deverá ser armazenado à temperatura de 20°C a 24°C por no máximo cinco dias, sob agitação suficiente para uma boa oxigenação, que impeça a agregação plaquetária (THIELE et al., 2010; VASSALLO, 2009).

Estes limites dependem da legislação local e do aditivo utilizado em soluções de CP, e a restrição de prazo de validade que é imposta por regulamentação das autoridades de saúde, a fim de garantir a segurança e a qualidade do produto, em decorrência do risco de crescimento bacteriano, acúmulo de lactato, transformação morfológica e agregação plaquetária que levam a perda da viabilidade das plaquetas armazenadas em bancos de sangue (DELOBEL et al., 2010; SCHUBERT; DEVINE, 2010a).

As primeiras alterações ocorridas em plaquetas durante o armazenamento do CP foram mencionadas em 1957 por Mustard et al., que descreveram a influência das técnicas de coleta do número de plaquetas, durante o procedimento de armazenamento de sangue (SCHUBERT; DEVINE, 2010a).

Murphy et al., em 1971, introduziram o termo ***Platelet Storage Lesion (PSL)*** - **Lesão de Armazenamento de Plaquetas**, relacionado principalmente às seguintes observações: acúmulo de lactato, a transformação do formato discoide em esfera e a reduzida capacidade de resposta ao ADP para a agregação plaquetária (MURPHY; GARDNER, 1971). Estudos descreveram que os mecanismos responsáveis pela lesão de armazenamento do CP são multifatoriais e incluem os métodos de coleta, processamento, armazenamento, manipulação

após a coleta e prazo de validade (MITTAL; KAUR, 2015; SCHUBERT; DEVINE, 2010a).

A maioria dessas alterações da lesão de armazenamento são características relacionadas com a ativação plaquetária, exceto o efeito de deterioração que contribui para a lesão mediada pelo acúmulo de lactato, o qual é independente da ativação, pois os fatores que contribuem para essa ativação incluem, a exposição a superfícies estranhas, trauma, baixo pH, agonistas (como trombina e ADP) e o estresse de cisalhamento (MITTAL; KAUR, 2015).

As bolsas de CP devem ser mantidas sob uma agitação constante e suave para facilitar a absorção de oxigênio, o que ajuda a preservar a morfologia celular e a funcionalidade das plaquetas, além de manter o pH estável entre 6,8 e 7,5, limites a partir dos quais as plaquetas tendem a sofrer alterações morfológicas (CAZENAVE et al., 2005; MANASA; VANI, 2010).

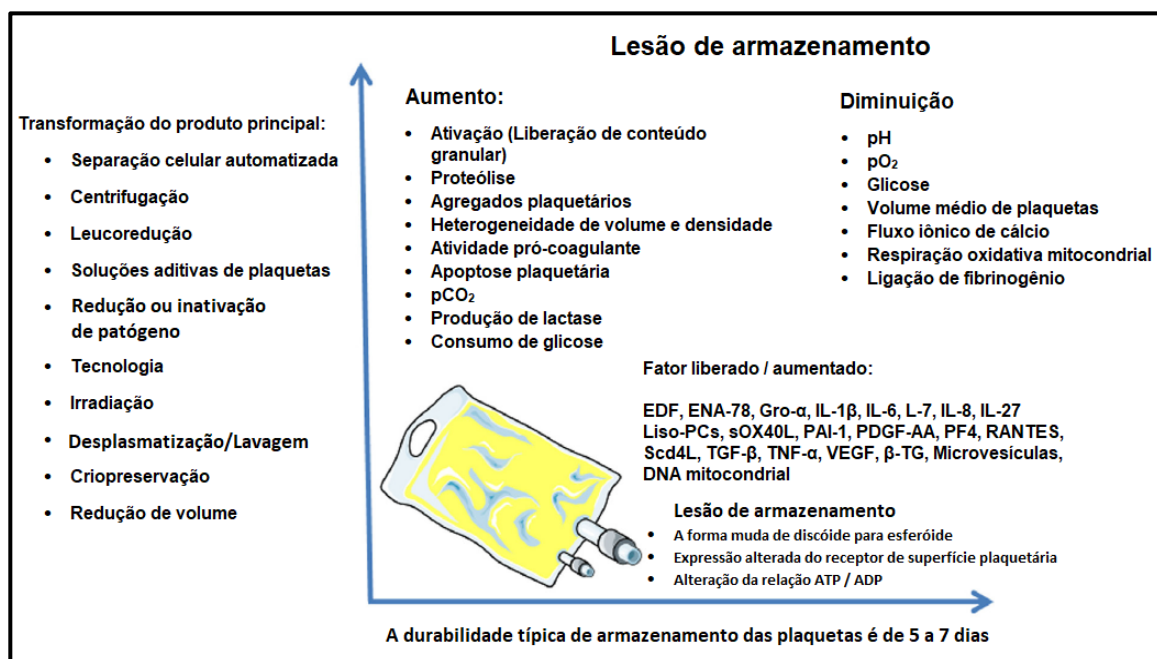
Após a ativação, as plaquetas perdem sua morfologia discoide e se tornam mais esféricas, adquirindo múltiplos pseudópodes. Alterações conformacionais no complexo da glicoproteína *GP1Ib/IIIa* expõem sítios de ligação para proteínas adesivas (como fibrinogênio e FVW - Fator de Von Willebrand), resultando em agregados plaquetários (MITTAL; KAUR, 2015).

A ativação estimula a liberação de conteúdos granulares e a expressão de proteínas de membrana sequestradas na superfície exterior das plaquetas ativadas, o aumento da concentração de fosfolípidios na superfície exterior, além de proporcionar uma superfície ideal para o complexo protrombinase, mediado pelos fatores X-Va, contribuindo, assim, para a atividade pró-coagulante (MITTAL; KAUR, 2015).

Nesse período, podem ocorrer ativação e liberação de grânulos plaquetários. Inicia-se o processo de glicólise anaeróbica que resulta no acúmulo de lactato e diminuição do pH (SHRIVASTAVA, 2009; VAN DER MEER, 2013). Além disso, a degradação de proteínas do citoesqueleto, depleção de ATP, ativação de caspases, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, acarretando a apoptose das plaquetas são os eventos mais comuns (JACKSON; SCHOENWAEELDER, 2010; MITTAL; KAUR, 2015; SAUNDERS et al., 2013).

Estudos mostram que durante o armazenamento em banco de sangue, a forma discoide da plaqueta normal é alterada entre cinco a sete dias de estocagem a 22°C. E mesmo sob condições ideais de armazenamento, essas lesões consistem em alterações morfológicas, ativação plaquetária, proteólise, expressão de receptores de superfície e alterações de glicoproteínas de membrana (SHRIVASTAVA, 2009). A FIGURA 2 ilustram as transformações que ocorrem durante o armazenamento das plaquetas.

FIGURA 2: ARMAZENAMENTO DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS E A LIBERAÇÃO DE MODIFICADORES DE RESPOSTA BIOLÓGICA. Durante o período de armazenamento, alterações bioquímicas e funcionais podem ocorrer com as plaquetas. Estas modificações são chamadas lesões de armazenamento.



Fonte: adaptado de SUT et al., 2018.

Em diferentes países, incluindo o Brasil, os estoques de CP após a coleta são mantidos na prateleira do banco de sangue em média por cinco dias. Todas as bolsas de CP, não utilizadas após esse tempo de estoque, são descartadas em consequência das lesões de armazenamento (EDQM, 2016). A transfusão de hemoderivados traz riscos inerentes, pois devem ser usados de forma ideal para maximizar os resultados do paciente (YADDANAPUDI; YADDANAPUDI, 2014).

Estudos também mostraram que as plaquetas dos hemocomponentes são mais suscetíveis ao estresse oxidativo conforme apontado em testes de estresse mitocondrial, que demonstraram como a saúde bioenergética global das plaquetas estocadas é significativamente menor do que em plaquetas frescas (RAVI et al., 2015).

A perda da viabilidade plaquetária durante o armazenamento em banco de sangue vem sendo investigada progressivamente. Estudos mostram que a expressão da fosfatidilserina, um fosfolípido presente no folheto interno da bicamada de membrana das plaquetas é usado como um marcador de ativação, que está intimamente associado ao desenvolvimento de vias da apoptose (DASGUPTA et al., 2010).

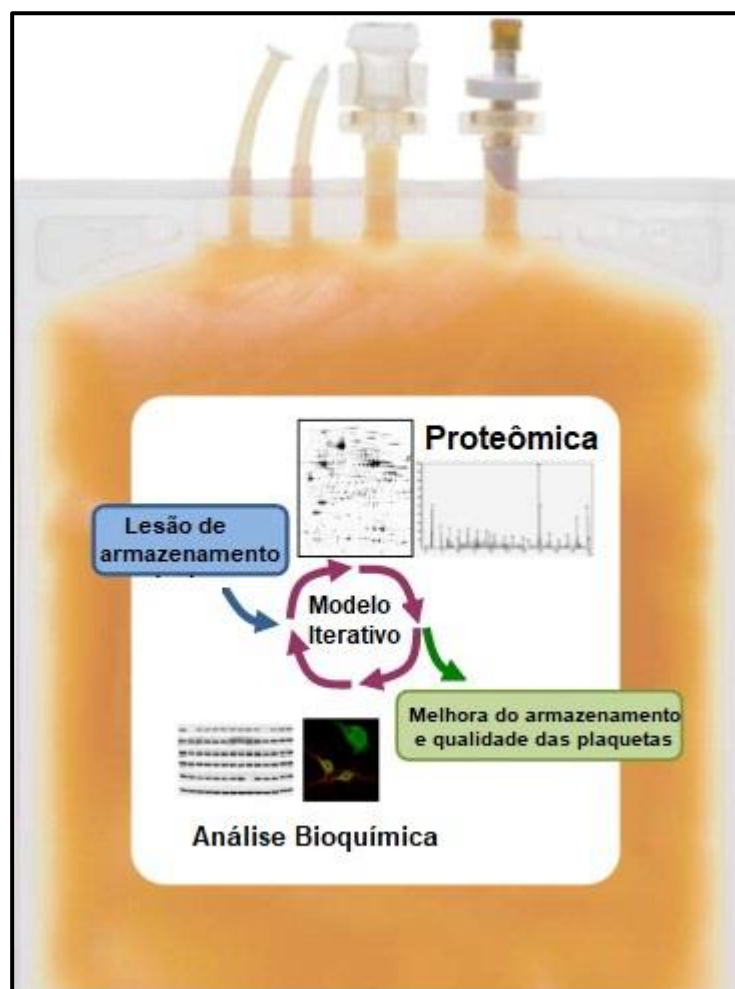
Várias características apoptóticas podem ser observadas em plaquetas armazenadas, principalmente como aquelas que incluem exposição da fosfatidilserina, disfunção mitocondrial, liberação do citocromo C, forte expressão dos pró-apoptóticos *Bax* e *Bak*, ativação de caspase-3, estimulação de cinase e formação de corpos apoptóticos (LIN et al., 2009; VILLARROEL et al., 2013; ZHAO et al., 2017). A apoptose causa exposição da fosfatidilserina nas superfícies celulares, um sinal para a fagocitose de células apoptóticas. No entanto, pouco se sabe como esse mecanismo desempenha um papel na “depuração” de plaquetas senescentes (BENNETT, 2016).

De certa forma, são necessários mais estudos que possam avaliar o impacto das diferentes manipulações na integridade das plaquetas armazenadas. Abordagens como a proteômica, têm sido empregadas para analisar as alterações no perfil de proteínas plaquetárias durante o armazenamento. Os dados obtidos com essas abordagens conferem uma melhor compreensão acerca da bioquímica das plaquetas, a fim de correlacionar esses resultados com a função plaquetária (SCHUBERT; DEVINE, 2010).

Esse tipo de análise possibilita identificar pontos de intervenção nas vias de transdução de sinal, fornecendo novos dados para uma compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes que levam à lesão do armazenamento de plaquetas (SCHUBERT; DEVINE, 2010; THIELE et al., 2010). Em síntese, a

FIGURA 3, apresenta mostra o modelo iterativo descrito na revisão de SCHUBERT; DEVINE, 2010.

FIGURA 3: ABORDAGENS COM ANÁLISE DE PROTEÔMICA DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS. Esse tipo de análise possibilita identificar as alterações no perfil das proteínas do CP. A compreensão da bioquímica dessas proteínas, fornece informações precisas sobre os mecanismos moleculares que levam a lesão do armazenamento.



Fonte: adaptado de SCHUBERT; DEVINE, 2010.

Estudos mais atuais revelaram a identificação de biomarcadores moleculares que podem ser usados para analisar as alterações do CP armazenado. Nesse contexto, emergem o papel dos microRNAs que demonstraram eficientes ferramentas para identificar essas alterações plaquetárias durante o armazenamento em bancos de sangue (PONTES et al., 2015).

1.2 MicroRNAs

1.2.1 Um breve histórico e Biogênese

O termo **microRNA (miRNA)** surgiu em 2001. No entanto, o seu primeiro exemplar foi descoberto em meados dos anos 1990, a partir de estudos sobre o desenvolvimento pós-embriônico do verme *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee et al., 1993). Nesse estudo, descobriram que o gene mutado *lin-4* não codificava proteína e era expresso na forma de um minúsculo RNA capaz de se ligar com grande especificidade a proteína lin-14, promovendo o bloqueio da sua tradução (CAMPOLIM, 2008).

Em 2000, foi descoberto o segundo exemplar de miRNA conhecido como *let-7*. Esse achado mostrou que o *let-7* regulava a proteína lin-41, responsável por dirigir o desenvolvimento do *C. elegans* à fase adulta. Essas descobertas de *lin-4* e o *let-7* mostraram o envolvimento desses miRNAs capazes de governar os eventos temporais no desenvolvimento de *C. elegans* (PASQUINELLI et al., 2000).

Estudos descreveram os miRNAs como uma grande família de pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs) de aproximadamente 18 a 25 nucleotídeos, cuja principal função é atuar como silenciadores pós-transcricionais ao se ligarem com mRNAs específicos, mediante a complementariedade de sequência do tipo Watson-Crick, regulando a sua estabilidade e tradução (BRACKEN; SCOTT; GOODALL, 2016; HA; KIM, 2014b).

Essa regulação entre o mRNA e o miRNA pode ocorrer de duas formas, por meio do pareamento de bases imperfeitos que provoca ao mRNA a repressão da tradução ou pelo pareamento perfeito, nesse caso, ocasionando à clivagem e degradação do mRNA. Consequentemente, interrompendo a tradução, comprometendo a síntese de proteínas. Esse pareamento de bases Watson-Crick ocorre entre a região *seed* (semente) do miRNA, localizados em sítios de 2 a 8 nucleotídeos da sua região 5'-UTR (*untranslated region* – região não traduzida) com a região 3'-UTR do mRNA, (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

O estudo com o *let-7* sugeriu que os miRNAs atuam, essencialmente, na tradução sem alterar os níveis de mRNA (BARTEL; LEE; FEINBAUM, 2004). No

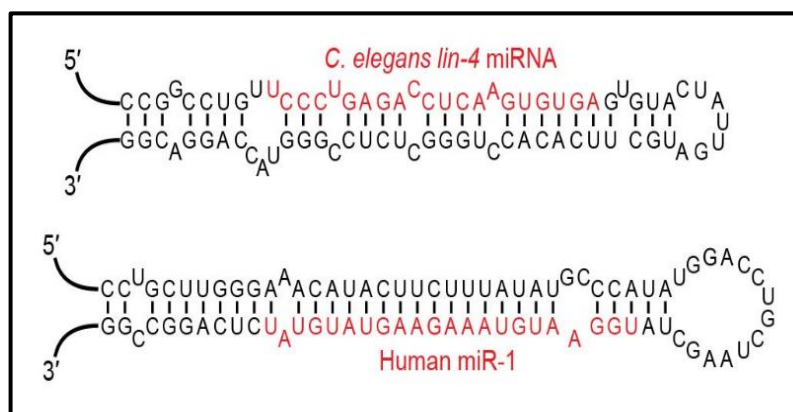
entanto, pesquisas mais recentes com outros perfis genômicos, mostraram que os alvos de miRNAs fortemente reprimidos, exibiram certo grau de degradação do mRNA provocado pela interação com miRNAs (DANGWAL; THUM, 2012; LINDSAY; EDELSTEIN, 2016).

Essa interação desencadeia o recrutamento e associação de fatores de decaimento de mRNA, o que provoca à sua desestabilização, acentuada pelos complexos de *deadenylation* (deadenilação) e *decapping* (decapitação) ou perda do CAP (calda poli-A), responsável pela estabilidade da molécula do mRNA (ANTIC et al., 2015; BHASKARAN; MOHAN, 2014).

O reconhecimento e a confirmação da existência dos miRNAs resultou de uma intensa pesquisa para identificar novos membros da família *let-7*. Posteriormente, documentaram que muitos miRNAs dessa família foram identificados evolutivamente conservados entre espécies e exibiram certa especificidade do tipo celular (BHASKARAN; MOHAN, 2014; GRIFFITHS-JONES, 2004).

Os avanços nas descobertas do miRNA seguiram com inúmeros trabalhos de clonagens de pequenos RNAs de vermes, moscas e humanos, onde foram identificadas seqüências mais longas de RNA, formada por uma estrutura predita em formato de um *hairpin* que foi denominada de “*stem-loop*”, FIGURA 4, (BHASKARAN; MOHAN, 2014).

FIGURA 4: ESTRUTURAS PREDITAS DE STEM-LOOPS DE miRNAs. O *stem-loop* foi proposto como um *precursor* para um RNA mais curto que possuía complementariedade anti-sentido com múltiplos alvos na região 3'-URT de mRNAs. Nas figuras abaixo são mostradas estruturas secundárias preditas de *stem-loops*. Esse precursor em formato de *hairpins* origina o miRNA *lin-4* de *C. elegans* e o miRNA *miR-1* de humanos.



Fonte: adaptado de BARTEL; LEE; FEINBAUM, 2004.

Essas descobertas resultaram em uma nova compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na regulação gênica, que descreveram como os miRNAs reprimem milhares de genes-alvos, capazes de coordenar processos normais, como a proliferação celular, metabolismo, diferenciação e apoptose (LUJAMBIO; LOWE, 2012). Estudos mostraram que os miRNAs regulam uma porção substancial de, aproximadamente, 60% de todos os genes codificadores de proteínas do genoma humano (DANGWAL; THUM, 2012; LINDSAY; EDELSTEIN, 2016).

O impacto da compreensão desses mecanismos de regulação gênica, mostrou os miRNAs exibindo especificidade em tecidos, fluidos corporais, fases específicas do desenvolvimento, modulação do estresse celular e processo de envelhecimento. Foram encontrados em doenças como o câncer, cardiopatias e em distúrbios hematológicos, que acrescentaram uma nova dimensão aos estudos dos miRNAs, onde foram destacados o seu potencial como um biomarcador confiável (CORTEZ et al., 2012; KATO; SLACK, 2013; KONDKAR et al., 2010; PROJAHN; KOENEN, 2012; SLACK; WEIDHAAS, 2008).

Os genes de miRNA podem variar amplamente em sua localização no genoma (KIM; NAM, 2006). Estudos revelaram duas classes distintas de miRNAs, que podem ser transcritos a partir de regiões intergênicas (em torno de 30%), ou de regiões intragênicas, quando estão localizados dentro da estrutura de um gene (MONTEYS; SPENGLER; WAN, 2010).

Neste último caso, aproximadamente, 70% são transcritos sobrepostos às regiões intrônicas e exônicas de genes codificadores ou não codificadores de proteínas, e podem ser transcritos de ambas as fitas do DNA, mais frequentemente pela RNA polimerase II (EDELSTEIN; BRAY, 2011; MONTEYS; SPENGLER; WAN, 2010).

Uma característica importante dos genes dos miRNAs é que os seus *loci* são regularmente agrupados no genoma. O miRBase descreve que mais de 50% dos miRNAs de animais são organizados em *clusters* (agrupamentos), sendo transcritos como genes policistrônicos sob o controle transcricional de unidades promotoras compartilhadas ou individuais, gerando múltiplos miRNAs a partir do mesmo transcrito primário. Também foram descobertos grupos de genes de

miRNAs coexistentes, formando unidades policistrônicas com o potencial de serem transcritos como uma unidade individual (KIM; NAM, 2006; MARCO et al., 2013).

Os miRNAs em um determinado agrupamento estão frequentemente relacionados entre si, sugerindo ser um resultado da duplicação gênica. Um agrupamento de genes de miRNA também contém, frequentemente, miRNAs não relacionados (CULLEN, 2004; KIM; NAM, 2006). Estudos mostram que os miRNAs agrupados são funcionalmente relacionados por terem como alvo o mesmo gene ou genes diferentes na mesma via (BONCI et al., 2008; HUA et al., 2018).

Um evento importante e bastante revisado na literatura dos miRNAs é a biogênese que está sujeita a um controle temporal e espacial, em que a desregulação dos miRNAs está associada a muitas doenças humanas (HA; KIM, 2014). Na FIGURA 5, são apresentadas as principais etapas de um modelo de biogênese proposto em animais e que foi revisada por Bartel (2018).

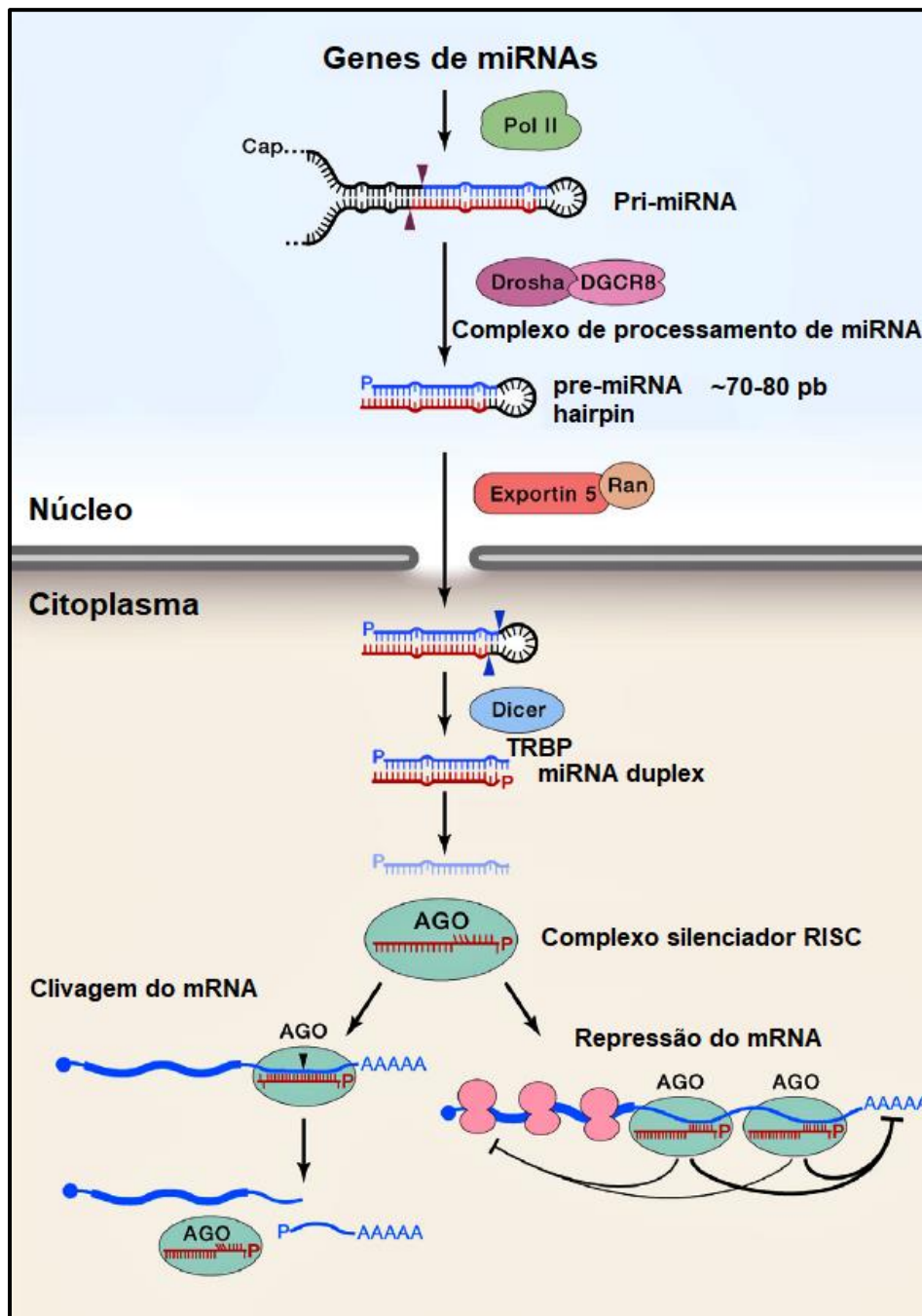
Em animais, no núcleo celular, os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (Pol II), como parte de RNAs muito mais longos chamados de pri-miRNAs. Cada pri-miRNA tem pelo menos uma região que se dobra sobre si mesma para formar um substrato em formato de *hairpin* (BARTEL, 2018).

Esses pri-miRNAs são processados por um complexo de processamento de miRNA formado pela Drosha/DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosomal 8*), uma RNase III que cliva o pri-miRNA em uma sequência mais curta com aproximadamente 65 pares de bases (pb) em forma de *loop*, conhecido como miRNA precursor (pre-miRNA), (HA; KIM, 2014; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

Em seguida, o pre-miRNA é transportado ao citoplasma pela Exportina 5 e RAN-GTP, onde será processado pela Dicer, uma endonuclease com dois domínios da RNase III, associada com a proteína TRBP (*Transactivation responsive RNAs binding protein*), que cliva os dois filamentos próximo ao *loop* do precursor, gerando um duplex miRNA, exibindo suas cadeias com aproximadamente 20 pb, sendo exposto em uma de suas extremidades um fosfato 5' e uma "saliência" de 2 nt em cada extremidade da região 3', que são feitos por

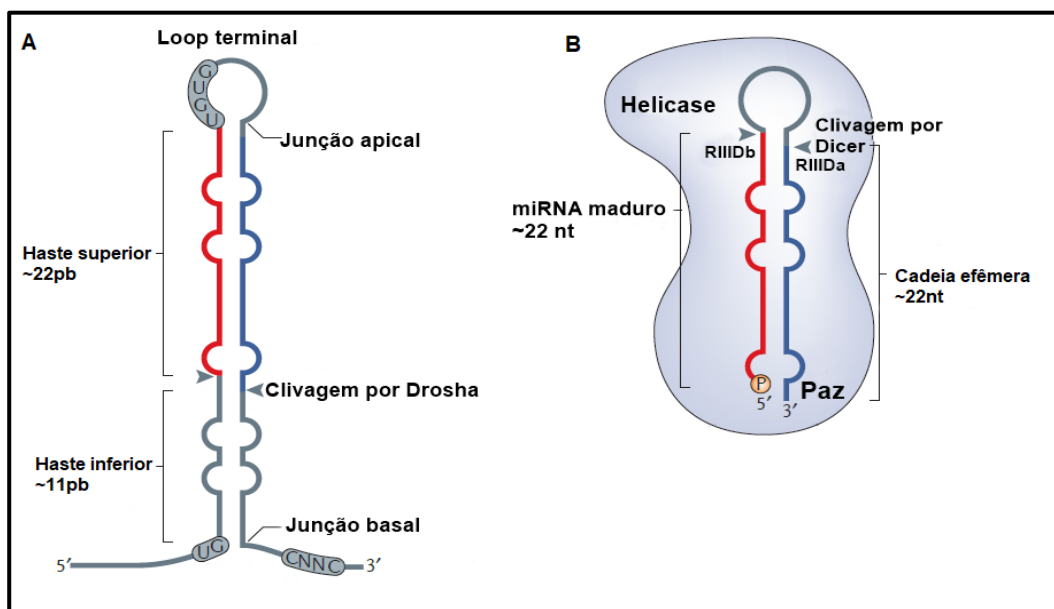
Drosha e Dicer (BARTEL, 2018). A FIGURA 6 ilustra as principais etapas enzimáticas para processar transcritos primários em miRNAs durante a biogênese.

FIGURA 5: A BIOGÊNESE E A FUNÇÃO DO MicroRNA. A biogênese dos miRNAs compreende as fases de processamento de transcrição dos seus genes pela Pol II, ação de Drosha, exportação do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5, ação endonucleotídica de Dicer e a formação do complexo RISC.



Fonte: adaptado (BARTEL, 2018).

FIGURA 6: PRINCIPAIS ETAPAS ENZIMÁTICAS NECESSÁRIAS PARA PROCESSAR TRANSCRITOS PRIMÁRIOS EM miRNAs MADUROS NA VIA DA BIOGÊNESE. (A) O pri-miRNA é clivado com precisão pela Drosha/DGCR8 em uma região com aproximadamente 11 pb da junção basal entre o RNA de fita simples e o dsRNA (RNA fita dupla), e aproximadamente 22 pb da junção apical ligado ao *stem-loop*. (B) Dicer reconhece os terminais do pre-miRNA que são acessíveis pelos domínios PAZ (PIWI – Argonauta AGO) do Dicer humano, que contém duas regiões, uma que interage com a terminal 5' fosforilado do pre-miRNA e outra que interage com o outro terminal 3'. A estrutura em forma de “caule” do pré-miRNA é alinhado ao longo do eixo da proteína, de forma que Dicer meça uma distância definida em ambos os terminais, para que os domínios catalíticos da RNase III (RIIIda e RIIIdb) atuem na posição aproximada de 22 nucleotídeos (nt). Pontos esses, afastados do terminal fosforilado.



Fonte: adaptado HA; KIM, 2014.

Uma vez formado, o duplex de miRNA é carregado em uma proteína Argonauta mediada por chaperonas (*HSC70/HSP90*), que usam ATP para auxiliar a Argonauta assumir uma conformação aberta de alta energia adequada para a ligação do duplex rígido miRNA (IWASAKI et al., 2010). Após o carregamento do duplex, a Argonauta volta a sua conformação no estado fundamental, onde ocorre a incorporação seletiva de uma cadeia madura do miRNA ou de ambas, dependendo da sua instabilidade termodinâmica e fragilidade do pareamento de bases em relação a cadeia oposta (BARTEL, 2018).

Uma vez carregado no complexo silenciador RISC (*RNA-Induced silencing complex*), FIGURA 5, a cadeia madura do miRNA se liga em sítios dentro de mRNAs alvos para direcionar a sua repressão pós-transcricional, a qual ocorre nos corpos de processamento denominados *P-bodies*, que são estruturas citoplasmáticas envolvidas no controle da expressão gênica (BARTEL, 2018; DANGWAL; THUM, 2012, 2013; HA; KIM, 2014a). Assim, o miRNA maduro se liga a região não traduzida de 3'-UTR de mRNAs-alvos específicos, o que leva a sua desestabilização, provocando a clivagem ou a repressão do alvo de acordo com a complementaridade da sequência com a região *seed* do miRNA, FIGURA 5 (HA; KIM, 2014; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

Abordagens sobre predição de alvos de miRNAs têm sido eficientes utilizando algoritmos que exploraram adequadamente determinados conjuntos de dados capazes de melhorar o desempenho na identificação desses alvos (FAN; KURGAN, 2014; LIU et al., 2010; SAITO; SÆTROM, 2010; SONG et al., 2012).

1.2.2 MicroRNAs em plaquetas

Os principais acontecimentos que levaram ao conhecimento científico sobre a identificação dos miRNAs em plaquetas, apresentam diversos estudos publicados em pouco mais de 10 anos. No contexto desse trabalho foi feito um levantamento cronológico na base do *PubMed*, *Google Scholar* e bibliografias de estudos publicados que foram resumidos em uma linha do tempo na FIGURA 7.

Estudos pioneiros levantaram a hipótese do possível envolvimento de miRNAs na ativação plaquetária, pois foi demonstrado que o *splicing* do pre-mRNA e o seu processamento durante a tradução do mRNA, possibilitaram novas funções que permitiram as plaquetas ativadas alterarem o seu transcriptoma e proteoma em resposta à ativação. Com isso, acreditava-se que esses eventos ocorriam em um ambiente desprovido de núcleo, no meio citoplasmático de plaquetas humanas ativadas (DENIS et al., 2005; SCHWERTZ et al., 2006).

Em 2006, foi publicado por Garzon et al, um estudo que ficou conhecido como *microRNA fingerprints* da função plaquetária. Nesse estudo, foi relatado que

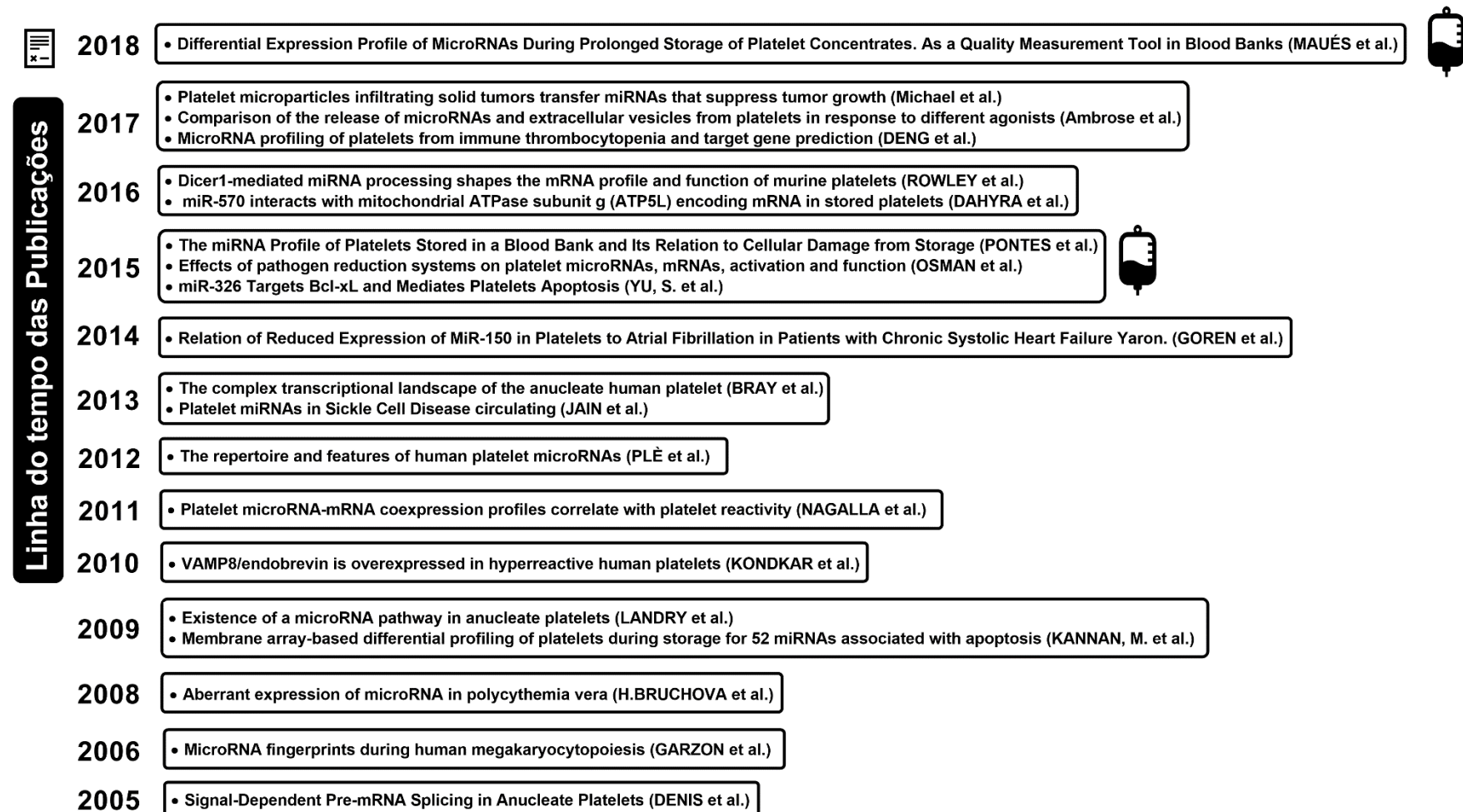
as plaquetas, mesmo desprovidas de núcleo e DNA genômico, possuíam diversos tipos de RNAs codificadores e não codificadores. Nesse estudo foram identificados miRNAs hipo-expressos: *miR-10a*, *miR-126*, *miR-106*, *miR-10b*, *miR-17* e *miR-20*. Esses achados confirmaram o papel regulador do miRNA na megacariocitopoiese (GARZON et al., 2006).

Estudos reconhecendo o papel dos miRNAs na biogênese e função plaquetária, indicaram que essas células poderiam traduzir mRNA em proteínas ou RNA de transferência para células receptoras capazes de regular processos funcionais. Apesar do seu pequeno tamanho e forma anucleada, a síntese da transcrição do RNA foi confirmada em megacariócitos (SCHUBERT; WEYRICH; ROWLEY, 2014).

O primeiro perfil de expressão de miRNAs em plaquetas humanas foi relatado como parte de um estudo teste, onde foram identificados miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com Policitemia vera. Nesse estudo, foi descoberto que a expressão do *miR-26b* era significativamente maior em plaquetas de pacientes com esse distúrbio, quando comparados com os controles saudáveis. Esse foi o primeiro estudo que identificou miRNAs como potenciais biomarcadores de distúrbios plaquetários (BRUCHOVA; MERKEROVA; PRCHAL, 2008).

Landry et al. em 2009 publicaram um estudo utilizando microarranjo, o qual mostrou a existência abundante de miRNAs plaquetários, totalizando 219 transcritos. Esse estudo identificou a assinatura específica e alguns exemplares de miRNAs (*miR-223*, *let-7c* e *miR-19a*), além de componentes funcionais do complexo efetor da maquinaria da biogênese (DICER e Ago2). Landry et al., demonstraram por validação experimental que o *miR-223* regula o mRNA P2Y12, uma proteína que desempenha um papel importante na modulação da função das plaquetas (LANDRY et al., 2009).

FIGURA 7: PRINCIPAIS ESTUDOS QUE LEVARAM AO CONHECIMENTO CIENTÍFICO DA IDENTIFICAÇÃO DOS miRNAs EM PLAQUETAS.



- MAUÉS et al. (2018) e PONTES et al. (2015) são os estudos relacionados com esta tese.

Não levou tempo para que a investigação do papel dos miRNAs durante a reatividade plaquetária fosse esclarecido. Essa confirmação, foi notificada com a descoberta da hipo-expressão do *miR-96*, na regulação da expressão de VAMP8/endobrevin, exercendo um impacto na repressão dessa proteína durante a reatividade plaquetária, associada com um perfil do genoma de indivíduos saudáveis. Esse estudo mostrou como a reatividade plaquetária contribui para os distúrbios da hemostasia e trombose, por meio do aumento da secreção de grânulos em decorrência de elevados níveis de VAMP8/endobrevin (KONDKAR et al., 2010).

O estudo comparativo de Nagalla et al. (2011), correlacionado com os achados anteriores de Landry, usou uma estratégia com um amplo perfil genômico de miRNAs em 19 doadores saudáveis. Esse estudo, identificou um subconjunto de 284 miRNAs em plaquetas, confirmando o *miR-223* como o mais abundante. Também foi demonstrado como os perfis de co-expressão de miRNA-mRNA foram correlacionados com a reatividade plaquetária, consolidando a importância do papel regulador do miRNAs na modulação da tradução de mRNA plaquetário (NAGALLA et al., 2011).

No ano seguinte, foi obtido por NGS (*Next Generation Sequencing* - Sequenciamento de Próxima Geração) um repertório e as características de miRNAs de plaquetas humanas que revelaram mais de 492 miRNAs maduros, além de 40 novas sequências, confirmando os achados anteriores de que as plaquetas apresentam sinais de modificações pós-transcricional, principalmente, adenilação terminal e uradenilação. Além disso, foram encontrada inúmeras isoformas de miRNAs, resultantes dos processamentos alternativos feitos por Droscha/Dicer, que mostraram como o repertório dos miRNAs de plaquetas é relativamente diverso e complexo (PLÉ et al., 2012).

Posteriormente, foi observada a existência de um “perfil transcricional altamente complexo em plaquetas humanas anucleadas”. Nesse estudo foi usado o RNA-Seq, com o qual se identificou a riqueza e a diversidade das moléculas de RNA, sugerindo um contexto em que a biologia plaquetária transcenderia às descrições centradas em proteínas e miRNAs (BRAY et al., 2013).

Nesse contexto, compreendendo que as plaquetas anucleadas não possuíam um controle transcricional, alguns estudos apontaram que as diferentes assinaturas moleculares dos miRNAs em distúrbios decorrentes da ativação plaquetária, foram atribuídas a vários mecanismos entre os quais: liberação de micropartículas, síntese de miRNAs maduros a partir da clivagem de seus precursores e modificações pós-transcricionais (ELGHEZNAWY et al., 2015; PLÉ et al., 2012; RISITANO et al., 2012).

Dois estudos demonstram o impacto dos miRNAs como biomarcadores de doenças associadas as plaquetas. O primeiro deles, mostrou que o aumento da ativação plaquetária na doença falciforme, contribuía para um estado de hipercoagulabilidade, aumentando o risco de complicações trombóticas. Nesse estudo, 40 exemplares de miRNAs foram associados com essa patologia, sendo três famílias distintas de miRNAs: (*hsa-miR-154*, *hsa-miR-329*, e *hsa-miR-376*), que exibiram expressão reduzida quando comparadas com os aqueles dos controles saudáveis (JAIN et al., 2013). Um segundo estudo, demonstrou os níveis de expressão do *miR-150*, significativamente reduzido em plaquetas avaliadas por insuficiência cardíaca sistólica com fibrilação atrial, quando correlacionados com os níveis de miRNAs plaquetários circulantes (GOREN et al., 2014).

No ano seguinte, foi caracterizado o primeiro miRnoma do concentrado de plaquetas estocadas em banco de sangue. Utilizando um sequenciamento NGS de plaquetas armazenadas durante seis dias. Esse estudo identificou uma diminuição gradual dos miRNAs mais abundantes no CPs. Foi observada que a relação inversa da expressão entre *miR-127* e *miR-320a* depende do tempo de armazenamento das plaquetas. Além disso, essa relação possibilita a identificação de bolsas de CPs que ainda podem apresentar plaquetas fisiologicamente normais (não ativadas). Os resultados deste estudo sugerem o uso de perfis de miRNAs como biomarcadores de qualidade das plaquetas armazenadas em bancos de sangue (PONTES et al., 2015).

Os sistemas de redução de patógenos (RP) para plaquetas armazenadas em bancos de sangue foram estudados por Osman et al. Esse sistema usa uma tecnologia Helinx baseada em psoraleno para inativação de patógenos infecciosos

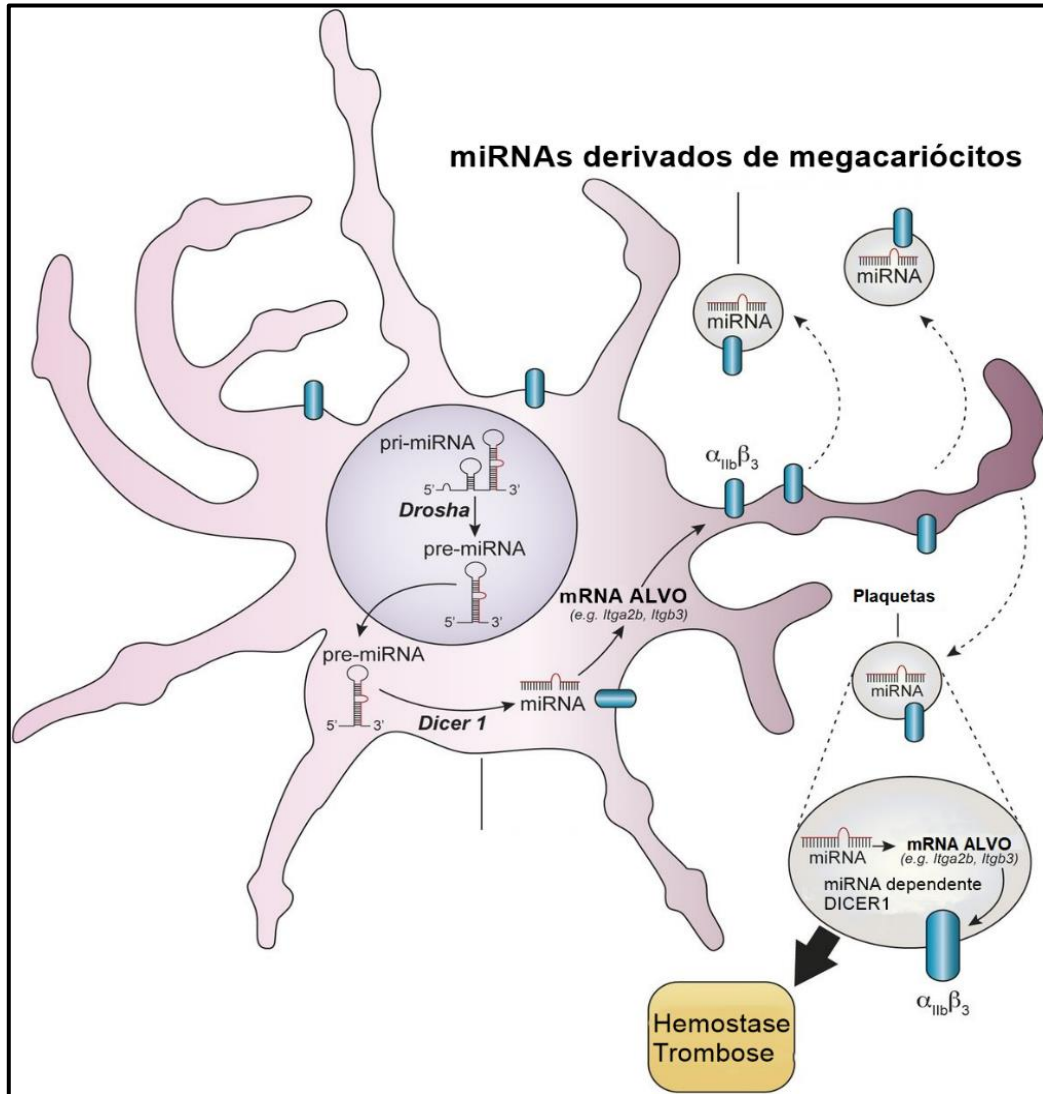
e leucócitos em plaquetas e plasma, sendo projetados para inativar os ácidos nucléicos de patógenos contaminantes por meio de mecanismos químicos (SUN; HU, 2016). Osman et al. avaliaram o impacto de miRNAs e mRNA (anti-apoptóticos) na ativação e função plaquetária e concluíram que RP não afetou a síntese ou a função dos miRNAs plaquetários. Conseqüentemente, esse sistema reduziu significativamente metade dos níveis de miRNAs que foram monitorados, induziu a ativação plaquetária e comprometeu a resposta plaquetária aos agonistas fisiológicos, resultando na liberação de miRNAs plaquetários por meio de micropartículas (OSMAN et al., 2015).

YU et al., descreveram os miRNAs envolvidos na regulação da expressão gênica de apoptose nas plaquetas. As plaquetas contêm um DNA mitocondrial, que desempenha um papel fundamental na regulação da apoptose (YU et al., 2014). Um segundo estudo, demonstrou um aumento significativo da expressão do *miR-326* em plaquetas obtidas por aférese que foram armazenadas *in vitro*. O regulador da família *Bcl-2*, composto pelo anti-apoptótico *Bcl-xL*, foi identificado como um alvo do *miR-326* (YU et al., 2015).

Um estudo de Rowley et al. avaliou formalmente a contribuição de Dicer1 e o papel do miRNA nas funções plaquetárias (FIGURA 8). Os autores usaram um sistema de exclusão condicional para Dicer1 em megacariócitos e plaquetas, com o objetivo de moldar o perfil de mRNAs e a função plaquetária em murinos (ROWLEY et al., 2016).

A ablação de Dicer1 em plaquetas levou à superexpressão da proteína integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na superfície dessas células e o aumento da reatividade plaquetária. Dessa forma, concluíram que a modulação desse mRNA por miRNAs pode ocorrer no megacariócito e potencialmente em plaquetas na circulação sanguínea ou durante o armazenamento. Os resultados desse estudo demonstram que os miRNAs processados por Dicer1 regulam fortemente a reatividade plaquetária (BOILARD; BELLEANNÉE, 2016).

FIGURA 8: A MODULAÇÃO DO REPERTÓRIO DE mRNA DE PLAQUETAS POR miRNAs. Os miRNAs dependentes de Dicer1 modulam os perfis de mRNA nas plaquetas, como os mRNAs que codificam Itgb2(α IIb) e Itgb3(β 3). Essa modulação pode ocorrer no megacariócito e, potencialmente, também ocorre em plaquetas na circulação sanguínea ou durante o armazenamento.



Fonte: adaptado de BOILARD; BELLEANNÉE, 2016.

Um estudo utilizou análises de ferramentas de bioinformática, para explorar a predição de alvos de miRNAs relacionados com o metabolismo da energia mitocondrial. Dahiya et al. descobriram que o *miR-570* interagiu com a subunidade mitocondrial de ATPase (*ATP5L*) que codifica o mRNA em plaquetas armazenadas. Esse estudo apontou o *miR-570* como um biomarcador confiável para a qualidade e viabilidade de plaquetas armazenadas (DAHIYA et al., 2016).

Estudos mais recentes foram encontrados com abordagens sobre o papel dos miRNAs derivados de micropartículas de plaquetas, transferidos *in vivo* para células tumorais com a função reguladora sobre a expressão de genes nessas células, modulando a progressão tumoral (MICHAEL et al., 2017).

Assim como o estudo de Ambrose et al. utilizou o microarranjo e demonstrou que as plaquetas de indivíduos saudáveis, quando ativadas, liberam micropartículas extracelulares na circulação, dependente de agonistas específicos para receptores de colágeno. Nesse estudo foi identificado o *miR-223-3p* como o mais abundante, além de um total de 57 a 79 miRNAs diferentes e dependentes de agonistas que foram identificados após as plaquetas desencadearem a ativação (AMBROSE et al., 2017).

Uma outra abordagem com microarranjo, identificou 115 miRNAs diferencialmente expressos no sangue de 22 pacientes com Trombocitopenia Imune (ITP). A predição por bioinformática demonstrou os seguintes exemplares: *hsa-miR-548a-5p*, *hsa-miR-1185-2-3p*, *hsa-miR-30a-3p*, *hsa-miR-6867-5p*, *hsa-miR-765* e *hsa-miR-3125*, que estavam associados com a apoptose e adesão das plaquetas na ITP (DENG et al., 2017).

Um estudo recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa integrou os dados de NGS publicados por PONTES et al. (2015) aplicando uma **abordagem ÔMICA**² com ferramentas e análises de bioinformática, para identificar os miRNAs que mais sofreram variação de expressão diferencial, provocado pelo armazenamento prolongado por mais de cinco dias em bancos de sangue (MAUÉS et al., 2018).

² A era ÔMICA, também chamada classicamente de era Pós-Genômica, é descrita como o período de tempo que estende a primeira publicação do esboço do sequenciamento do genoma humano em 2001, pelo Consórcio internacional do Sequenciamento do Genoma Humano, publicado por Venter et al., naquele ano. Dez anos após esse marco, o uso extensivo de tecnologias analíticas de alto rendimento, computação de alto desempenho e grandes avanços em bioinformática têm sido aplicados para resolver questões fundamentais na biologia molecular, bem como para encontrar pistas sobre doenças humanas como o câncer e envelhecimento. O sufixo -OME é utilizado para tratar objetos de estudo de áreas, principalmente, como genoma, transcriptoma, proteoma ou metaboloma. Abordagem OMICA visa a caracterização coletiva e a quantificação de *pool/s* de moléculas biológicas que se traduzem na estrutura, função e dinâmica de um organismo (GASTINEL, 2012).

1.2.3 Identificação de miRNAs com o método RNA-Seq

Abordagens experimentais em larga escala para a identificação dos primeiros miRNAs ficou limitada às técnicas de clonagem que enfrentaram grandes dificuldades em virtude do pequeno tamanho dos miRNAs, efeitos fenotípicos muitas vezes discretos e expressão em condições ou tipos celulares específicos (MENDES; FREITAS; SAGOT, 2009).

O desenvolvimento da tecnologia de *RNA-Sequencing* (RNA-Seq), aliado ao advento das tecnologias de alto rendimento por NGS, permitiu a identificação e caracterização de novos transcritos a um baixo custo e alta eficiência (MENDES; FREITAS; SAGOT, 2009).

Ambros et al. apresentaram a identificação e anotação de novos miRNAs de diversos organismos. A construção do banco de dados denominado de “Rfam de famílias de RNA”, forneceu uma compreensão *on-line* para as atribuições dos miRNAs (AMBROS, 2003).

Essas tecnologias impulsionaram o implemento de um banco de dados chamado miRBase (<http://www.mirbase.org>), que assumiu a funcionalidade de registro de microRNAs, expandido com funções principais, o qual atua como um repositório independente da nomenclatura de genes de miRNAs, fornecendo interfaces integradas, anotações e alvos previstos (GRIFFITHS-JONES et al., 2006).

Na sua versão atual, o miRBase versão 22, disponibiliza os dados mais recentes e atualizados no endereço (<ftp://mirbase.org/pub/mirbase/>), acessível com 38.589 *loci* de genes de miRNA de 271 espécies, expressando 48.885 miRNAs maduros, 10.031 novas sequências de *hairpins* e 13.149 miRNAs maduros que foram adicionados em relação a versão anterior (<http://www.mirbase.org/>).

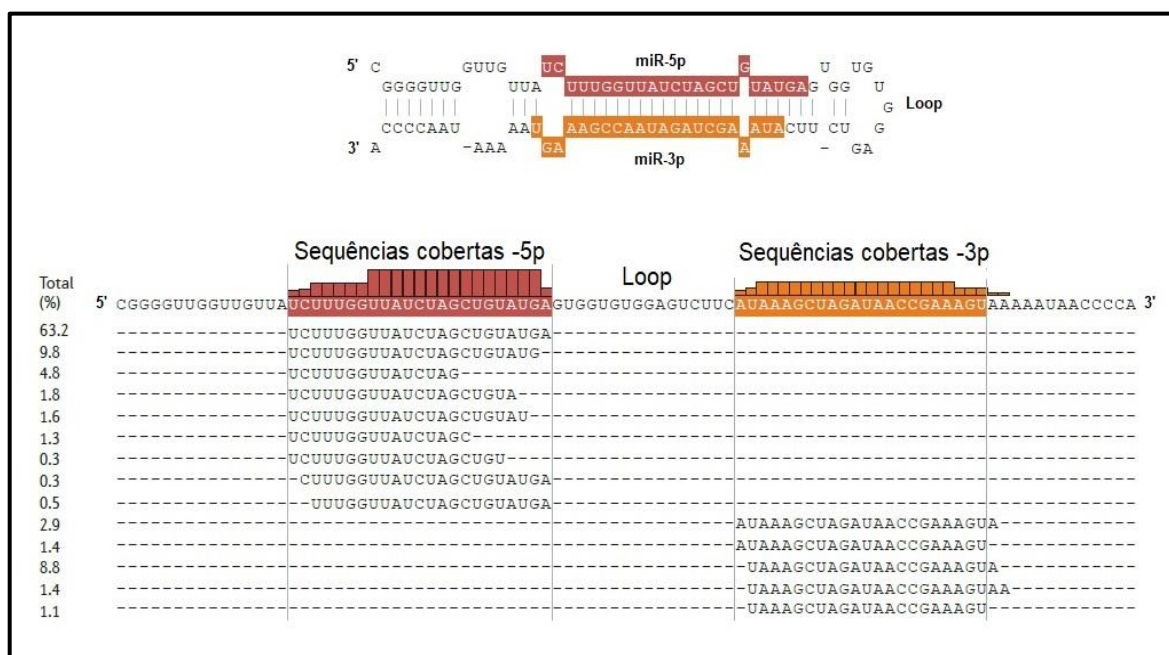
A identificação correta dos miRNAs pelo método de RNA-Seq depende fundamentalmente das características próprias que os distinguem de outros pequenos RNAs. Nesse tipo de experimento, produz-se dezenas ou centenas de milhões de sequências em forma de leituras (*reads*) dos precursores de miRNAs que precisam ter a sua posição e localização genômica devidamente anotados

(PRITCHARD; CHENG; TEWARI, 2012). Esses procedimentos são feitos por meio de algoritmos computacionais (SUN et al., 2014).

Caso as sequências geradas, *reads*, forem provenientes de miRNAs maduros, após o mapeamento contra o genoma de referência, as sequências mais abundantes devem conter entre 18-24 nt. Além disso, devem exibir um padrão de mapeamento consistente com a estrutura da molécula precursora e, também, pelos processamentos feitos por Drosha e Dicer, com a predominância da cadeia madura do miRNA cobertas em regiões 5p ou 3p de miRNAs precursores (FIGURA 9) (GUO et al., 2015; MENDES; FREITAS; SAGOT, 2009).

Essas variantes de miRNAs são denominados *isomiRs*, termo usado por Morin et al. para se referir aos miRNAs que exibem variações de suas sequências causadas pelo processamento pós-transcricional (MORIN et al., 2008). Como os *isomiRs* contêm sequências diferentes, eles podem ter diferentes alvos e, portanto, diferentes funções biológicas (DESVIGNES et al., 2015).

FIGURA 9: AS SEQUÊNCIAS DE miRNAs MADUROS GERADAS PELO EXPERIMENTO DE RNA-SEQ. Essas sequências exibem padrão típico de mapeamento, precisão e abundância em uma das possíveis regiões maduras (-5p ou -3p) do precursor. Dessa forma, a maioria dos *reads* correspondem a uma sequência predominante, proveniente de uma das regiões maduras que foram mapeadas em regiões -5p ou -3p do precursor que origina o miRNA.

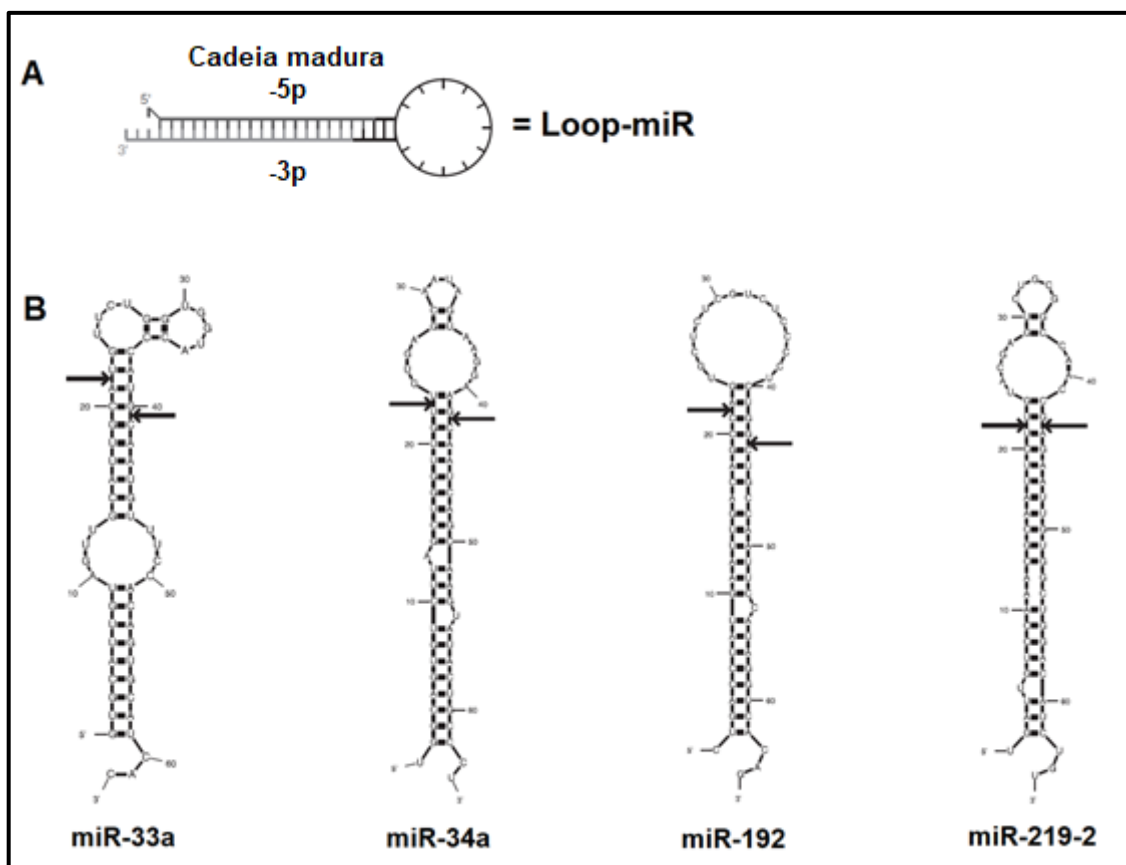


Fonte: adaptado de (PRITCHARD; CHENG; TEWARI, 2012).

Os *reads* dos miRNAs também podem ser mapeados para os fragmentos de RNA de cadeia simples, liberados da porção do *loop* do *hairpin* de miRNAs chamados miRNAs de origem do *loop*, (FIGURA 10). Esses miRNAs foram observados abundantes e localizados no citoplasma incorporados em RISCs, contendo Ago2 (WINTER et al., 2013).

Essas variantes são reguladas independentemente e podem desempenhar papéis cooperativos, complementares ou alternativos na função celular e na regulação gênica (DESVIGNES et al., 2015). Os seguintes miRNAs são exemplares conhecidos dessa variante: *hsa-mir-182*, *hsa-mir-147a*, *hsa-mir-300*, *hsa-mir-507*, *hsa-mir-3609*.

FIGURA 10: ESTRUTURAS DE LOOP-miR. (A) Os precursores de miRNA podem ser processados em três moléculas curtas de RNA de cadeia simples, a partir da região localizada na cadeia madura do miRNAs em regiões 5p, 3p ou do *loop*-miR. (B) Exemplos selecionados de estruturas de pre-miRNA geradoras de *loop*-miR. As setas pretas mostram os pontos de clivagem feitos por Dicer, a partir das quais são verificadas as regiões de *loop* na cadeia do miRNA.



Fonte: adaptado de WINTER et al., 2013.

Após a identificação ou caracterização de novos miRNAs, existe uma etapa seguinte que consiste na quantificação da expressão gênica, a qual se utiliza o número de *reads* que mapearam nas respectivas regiões genômicas anotadas como miRNAs. Então, são aplicados métodos de normalização de *reads* que levam em conta o fator de normalização e a quantidade de *reads* mapeados, para comparar a expressão do miRNA entre as amostras (MOTAMENY et al., 2010). Os métodos mais usados são implementados nos pacotes DESeq e edgeR, (ANDERS; HUBER, 2010; ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009)

Esses métodos assumem que a maioria dos genes não são diferencialmente expressos. No método com DESeq o fator de normalização para cada amostra (ex. tecido ou linhagem celular) é dado pela mediana da razão do número de *reads* correspondentes de cada gene sobre a média geométrica da contagem de *reads* do respectivo gene em todas as amostras. Enquanto que, no método edgeR o fator de normalização chamado TMM (*Trimmed Mean of M-values*) é calculado para cada amostra, tomando-se uma delas como referência e as demais como teste (SEYEDNASROLLAH; LAIHO; ELO, 2013).

O TMM é calculado, pela média ponderada das razões do número de *reads* entre a amostra teste e a referência em escala logarítmica, após a exclusão dos genes mais e menos expressos. O procedimento de normalização da expressão gênica para miRNAs é obtido, dividindo-se o número de *reads* mapeados do miRNA por este fator de normalização. Para os miRNAs não diferencialmente expressos, o fator de normalização deve ser próximo de 1 (SEYEDNASROLLAH; LAIHO; ELO, 2013).

Outro método usado em experimentos de expressão diferencial é a análise da distribuição de Poisson, quando se tem repetições para diferentes bibliotecas (AUDIC; CLAVERIE, 1997). Nessa análise, quanto menor a probabilidade, mais diferencialmente expresso será o gene analisado entre ambas as bibliotecas, de modo que as comparações serão sempre duas a duas. Emprega-se, também, a correção de *Bonferroni*, caso o mesmo teste estatístico seja aplicado repetidamente para um mesmo conjunto de dados, onde o nível α é ajustado conforme análise

(AUDIC; CLAVERIE, 1997). O algoritmo IDEG6 é usado para essa finalidade (ROMUALDI et al., 2003).

Assim, os resultados de normalização e da análise da expressão diferencial podem variar bastante de acordo com a metodologia usada, principalmente, em casos onde os experimentos são planejados sem repetições.

1.2.4 MiRNAs como ferramenta de medição de qualidade do CP

As plaquetas mantidas em condições *ex vivo*, continuam a traduzir proteínas e, ainda, mantém um processamento de precursores e miRNAs maduros que confirma uma correlação entre o transcriptoma plaquetário e seu perfil proteômico, preservando a síntese *de novo* de proteínas (SCHUBERT; DEVINE, 2010c; SCHWERTZ et al., 2010; YAN et al., 2016).

Para investigar o dano do armazenamento em unidades de CP, o perfil de expressão diferencial de miRNAs é uma ferramenta útil, principalmente na identificação de alterações em plaquetas armazenadas em condições *ex vivo* (DAHIYA et al., 2015). Estudos revelaram uma relação entre os perfis de miRNAs com uma subsequente reatividade plaquetária, sugerindo, assim, um papel importante na regulação pós-transcricional durante o armazenamento (EDELSTEIN; BRAY, 2011; YAN et al., 2016).

Esses estudos identificaram perfis de expressão dos miRNAs de plaquetas estocadas em diferentes intervalos de tempo, bem diferentes daqueles perfis de expressão encontrados em instantes iniciais do armazenamento, o que torna a expressão diferencial de miRNAs uma ferramenta útil para medição de qualidade em bancos de sangue (KANNAN et al., 2009; PONTES et al., 2015; YU et al., 2014).

Por exemplo, PONTES et al., revelaram pontos importantes acerca do perfil de miRNAs mais expressos no CP armazenado por até sete dias. Provavelmente, os pre-miRNAs que regulam a senescência foram clivados, após o quinto dia de armazenamento por enzimas de edição de RNA, RNases, e RNA helicases, aumentando, assim, o número dos miRNAs para inibir a tradução de proteínas induzidas pelo estresse (PONTES et al., 2015).

Outra evidência está relacionada com as alterações moleculares em Dicer1, (FIGURA 8), que podem influenciar diretamente a diminuição da quantidade de miRNAs que regulam fortemente a reatividade plaquetária. Essas modificações, pós-transcricionais, podem induzir a biogênese e a estabilidade do miRNA durante o armazenamento *ex vivo* de plaquetas (BOILARD; BELLEANNÉE, 2016; NAGALLA et al., 2011; ROWLEY et al., 2016).

A liberação de micropartículas (MPs) ricas em miRNAs são desencadeadas principalmente por fatores como o estresse de cisalhamento e a ativação, que também podem modificar os perfis de expressão de miRNAs durante o armazenamento em bancos de sangue (BOILARD; BELLEANNÉE, 2016; LAFFONT et al., 2013). Essas MPs, também conhecidas como exossomos, são vesículas de origem endocítica liberadas por tipos celulares normais, saudáveis ou danificados e representam mais de 70% do total de MPs circulantes no sangue (HUNTER et al., 2008) (RATAJCZAK et al., 2006).

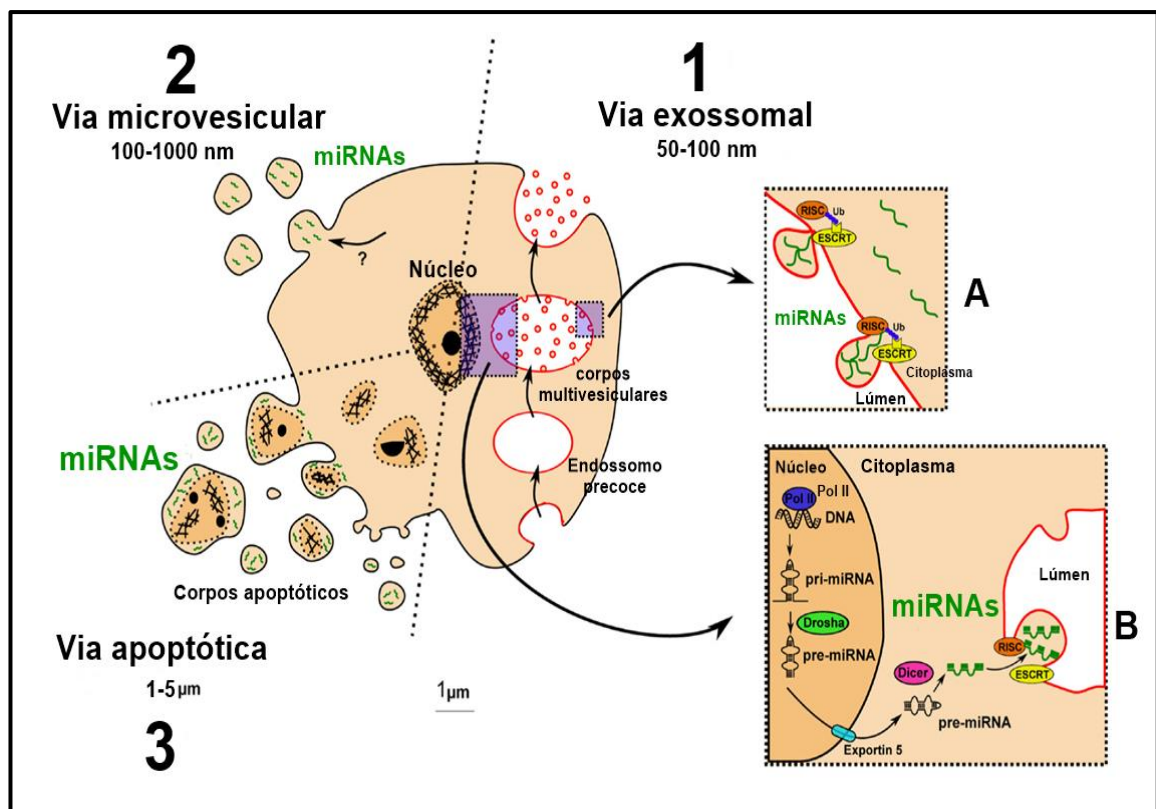
As MPs são liberadas a partir da membrana plasmática no ambiente extracelular e facilitam a comunicação entre as células. Apesar de seu pequeno tamanho, medindo de 50 nm a 1 µm, as MPs são enriquecidas com um amplo repertório de substâncias e receptores bioativos em sua superfície. Abrigam um conjunto concentrado de citocinas, proteínas de sinalização, mRNA e miRNA, que transferem parte de seus componentes e conteúdo para células alvos (MAUSE; WEBER, 2010).

Por exemplo, YAN et al., reportaram que a diminuição da abundância dos miRNAs em plaquetas ocorre por causa da sua ativação e liberação das MPs ricas em miRNAs (YAN et al., 2016). Estudos com plaquetas tratadas com redutor de patógenos, exibiram uma diminuição da quantidade de miRNAs em plaquetas que foram ativadas por esse tratamento (MUNDT et al., 2014; OSMAN et al., 2015).

Foi relatado que os efeitos de resfriamento ou congelamento das plaquetas residuais no plasma, promoveu o aumento do número de MPs em plaquetas ativadas, que acarretaram mudanças nos perfis de miRNAs com um aumento de expressão para os exemplares *miR-21* e *miR-27b* (MITCHELL et al., 2016).

Estudos mostram que as MPs podem ser formadas por três diferentes vias. Primeiramente na via exossomal em que mostra o brotamento do lúmen de corpos multivesiculares, sendo liberados por exocitose e são importantes intermediários em vias endo-lisossomais. Os exossomos apresentam diferentes perfis de RNA, sugerindo uma incorporação seletiva e ativa de miRNAs, conforme mostrado na (FIGURA 11) (GIBBINGS et al., 2009; JAGOT; DAVOUST, 2016).

FIGURA 11: PRINCIPAIS VIAS DE BIOGÊNESE DA VESÍCULA EXTRACELULAR E A INCORPORAÇÃO DE miRNAs EM EXOSSOMOS. (1) A via exossômica inclui a formação de corpos multivesiculares. Seguido pela formação de brotamento de exossomo no lúmen de corpos multivesiculares e liberação exossômica mediada por exocitose. (A) Conforme o modelo de GIBBINGS et al. (2009), ocorre a incorporação de miRNAs dependentes de RISC e ESCRT em exossomos (B) Via principal da biogênese do miRNA. (2) A via microvesicular: a captação de miRNAs pelas microvesículas. (3) A via apoptótica: células apoptóticas liberam corpos apoptóticos contendo fragmentos do núcleo e possíveis miRNAs.



Fonte: adaptado de JAGOT; DAVOUST, 2016.

GIBBINGS et al., destacaram que essa incorporação seletiva e ativa de miRNAs pelos exossomos, é dependente do complexo RISC e de um outro complexo denominado ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* – Complexo de triagem endossômica necessários para o transporte). Esses dois complexos estão envolvidos em eventos importantes da biogênese do miRNA, respectivamente, empenhados no bloqueio da tradução de mRNA e nos processos de brotamento (FIGURA 11) (GIBBINGS et al., 2009).

Em seguida a categoria de MPs está inserida em uma via microvesicular de partículas, compreendidas entre 100-1000 nm, que brotam de maneira direta da membrana plasmática das células e executam a captação de miRNAs. E por fim a via apoptótica é identificada em corpos apoptóticos, frequentemente, muito maiores, e, provavelmente, derivados de células endoteliais. Os corpos apoptóticos são veículos de transporte de miRNAs (FIGURA 11) (JAGOT; DAVOUST, 2016).

Dessa forma, a estabilidade dos miRNAs circulantes desregulados presentes em fluidos corporais é usada como potencial biomarcador circulante para uma variedade de condições patológicas (IACOMINO et al., 2016; MATAMALA et al., 2015). O desenvolvimento de técnicas recentes nesse campo para medir os níveis absolutos e relativos de miRNAs, levaram ao reconhecimento do seu papel como biomarcador em plaquetas armazenadas (DAHIYA et al., 2015).

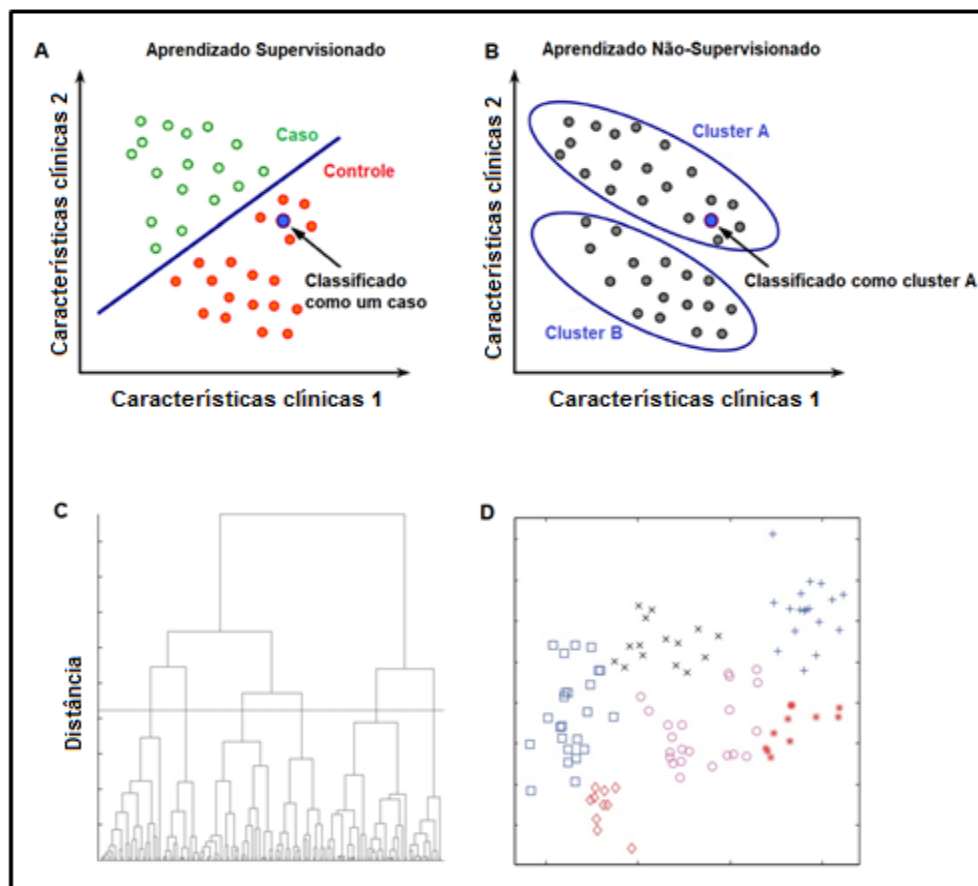
Mediante ao exposto, o perfil de expressão diferencial de miRNAs pode prever e monitorar, quantitativamente, como a meia-vida da molécula do miRNA varia e sofre rápidas mudanças de estabilidade, que pode ser influenciado pelo tempo armazenamento prolongado em banco de sangue (KANNAN et al., 2009).

1.2.5 Reconhecimento de padrões em Bioinformática

O reconhecimento de padrões em bioinformática visa desenvolver sistemas que sejam capazes de aprender a resolver um determinado problema, a partir da utilização de um conjunto de padrões como exemplos, cada um, representado por uma série de recursos (DE RIDDER; DE RIDDER; REINDERS, 2013).

Para isso, os algoritmos de aprendizado de máquina são muito utilizados e podem ser divididos em *supervisionados* e *não-supervisionados*. O primeiro método necessita de uma entrada que consiste em exemplos de treinamentos com rótulos escolhidos, por exemplo: caso e controle, (FIGURA 12A). Esse algoritmo analisa os dados de treinamento e produz uma função inferida que pode ser usada para classificar as amostras, (GALLOWAY et al., 2016).

FIGURA 12: MODELO DE APRENDIZADO SUPERVISIONADO E NÃO-SUPERVISIONADO. (A) No aprendizado de máquina supervisionado, um conjunto de dados de treinamento com classes rotuladas, por exemplo, caso ou controle, é fornecido. Um modelo é treinado para diferenciar ao máximo os casos e controles. Então, as classes de novas amostras são determinadas. (B) Um modelo de aprendizado de máquina não-supervisionado, em que as amostras não são rotuladas. Algoritmos de clusterização são exemplos desse método, com uma finalidade de se descobrirem grupos de amostras que são altamente semelhantes entre si e distintas de outras amostras. Por exemplo: Agrupamento hierárquico (C) É um dendograma que representa um conjunto de objetos e seus agrupamentos. A altura do caule desse dendograma mostra a sua distância parametrizada com alguma métrica utilizada. (D) Um agrupamento resultante quando o dendograma foi seccionado na linha pontilhada (C) para gerar um número específico de agrupamentos.



Fontes: adaptados de GALLOWAY et al., 2016 e DE RIDDER; DE RIDDER; REINDERS, 2013.

O segundo método, não-supervisionado, a entrada é um conjunto de exemplos não-rotulados e sem classes predefinidas, com o objetivo de descobrir sinais ocultos dentro dos dados. Enquanto o primeiro método de aprendizado é executado para classificar novas amostras, o segundo método é usado para detectar agrupamentos, baseado em alguma métrica de similaridade, onde uma função de distância pode ser aplicada (FIGURA 12B) (GALLOWAY et al., 2016; RAJAPAKSE; WONG; ACHARYA, 2006).

A utilização desses recursos na resolução de problemas biológicos inclui o uso contínuo de métodos de agrupamentos, também, conhecidos como agrupamento hierárquico. Com esse recurso é possível identificar os padrões inerentes em um conjunto de dados que possa estar bem estabelecido, (FIGURA 12C-D). Dados de expressão gênica, dados de anotação funcional, dados proteômicos e dados que agregam informações biológicas são bastante aplicáveis esses recursos (RAJAPAKSE; WONG; ACHARYA, 2006).

Estudos produzidos pelo avanço da tecnologia de alto rendimento por NGS, produzem um grande volume de dados e estão sendo cada vez mais modelados com essas ferramentas de análise de padrões. Por esse motivo, a mineração desses dados recorre a classificação, previsão, clusterização e extração de padrões e informações de interesse biológico (USMAN ALI et al., 2017).

No entanto, apesar de os dados da bioinformática, mostrarem-se de larga escala e com centenas de atributos que afetam o desempenho de algoritmos de aprendizado de máquina, a utilização dessas ferramentas para classificação e predição, requer uma seleção apropriada de atributos de dados para obter os resultados mais precisos (USMAN ALI et al., 2017).

Por exemplo, o agrupamento mostrado na FIGURA 12C, permite subdividir um conjunto de objetos de tal forma que, os objetos similares se enquadram no mesmo agrupamento, enquanto aqueles objetos diferentes se enquadram em diferentes agrupamentos ou sob as condições investigadas. Os agrupamentos de expressão gênica tendem a ser significativamente enriquecidos em categorias funcionais específicas. Ainda assim, essa ferramenta pode ser útil para inferir um

papel funcional de genes desconhecidos em um mesmo agrupamento (KONISHI, 2015).

Com o advento dos experimentos de alto rendimento (sequenciamentos), os problemas biológicos se tornaram um desafio, por conta do grande volume de dados multivariados, geralmente, apresentados com um formato de matriz. Para essa finalidade, esses tipos de dados podem ser implementados em algoritmos de imagens de alta resolução, como uso de heatmaps que são usados para extrair recursos relevantes para algum prognóstico clínico (METSALU; VILO, 2015).

Outro recurso que pode ser implementado em análise de padrões em Bioinformática é conhecido como PCA (*Principal Component Analysis* - Análise de Componentes Principais). O PCA é um método de redução de dimensão clássica em que um conjunto de dados multivariados é linearmente transformado em um conjunto de variáveis não correlacionadas, ordenadas de maneira descendente pela variância, explicada por JOLLIFFE (2002). Desta forma, pode-se interpretar os primeiros componentes principais que muitas vezes explicam grande quantidade de variação desses dados (METSALU; VILO, 2015).

2 JUSTIFICATIVAS

Milhares de produtos derivados do sangue são transfundidos a cada ano e muitas vidas são diretamente afetadas pela transfusão, necessitando-se melhorar cada vez mais as ferramentas e as estratégias que avaliam a qualidade dos produtos derivados do sangue, nos processos de produção e manipulação, com o objetivo de garantir segurança e eficácia para a saúde dos pacientes (Liumbruno, 2008; Martí-Carvajal et al., 2015).

Este estudo tem a sua aplicação associada à produção de conhecimento e de uma metodologia inovadora para a superação de um problema enfrentado pelos bancos de sangue e que não pode ser resolvido apenas por uma combinação de meios de intervenção já existentes.

O concentrado de plaquetas é um dos principais produtos derivados do sangue utilizado na transfusão terapêutica. Este hemocomponente necessita de armazenamento especial, pois as plaquetas quando armazenadas à temperatura ambiente para transfusão, por mais de 5 dias, sofrem alterações coletivamente conhecidas como lesões de armazenamento plaquetário (DASGUPTA et al., 2010).

No presente estudo, foi possível identificar a maior quantidade de miRNAs desregulados durante o armazenamento plaquetário, sendo de extrema importância para a medicina da transfusão, pois a identificação desses biomarcadores propõe legitimar uma solução biotecnológica, desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, para um grave problema que afeta a saúde pública e privada, que é a carência de CP que comumente atinge países com poucos doadores de sangue, como o Brasil.

Embora estudos anteriores tenham identificado o perfil de miRNAs mais expressos em plaquetas estocadas em bancos de sangue, representando um avanço significativo, ainda é carente na literatura estudos sobre a caracterização da expressão diferencial de miRNAs, que podem ser usados como ferramenta para medir a qualidade do CP durante o armazenamento.

As práticas de transfusão do CP podem ser sub-ótimas de várias maneiras e variam amplamente entre diferentes hospitais e clínicas. Considerando o número de doadores de sangue com estado de saúde sub-ótimo do qual a bolsa de CP é

composta, a identificação dos perfis de miRNAs para medir a qualidade do CP é possível. Visto que esses miRNAs podem ser quantificados rapidamente antes que as bolsas de CPs sejam descartadas e, por meio da análise da expressão diferencial, informar a futura tomada de decisão na governança dos bancos de sangue sobre a qualidade dos CPs.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar miRNAs diferencialmente expressos após o primeiro dia de armazenamento das plaquetas no CP e descrever quais sofreram mudanças significativas de expressão para serem potenciais candidatos a biomarcadores de lesão plaquetária durante o armazenamento.

3.1 ESPECÍFICOS

- a. Identificar miRNAs diferencialmente expressos no CP após o primeiro dia de armazenamento das plaquetas;
 - b. Descrever um perfil de assinaturas de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos no CP;
 - c. Selecionar os miRNAs como candidatos a potenciais biomarcadores de lesão plaquetária;
 - d. Validar os miRNAs que mais sofreram variação de expressão diferencial com o método de reação em cadeia de polimerase em tempo real;
 - e. Analisar com métodos de agrupamento hierárquico e PCA (*Principal Component Analysis*) as mudanças significativas de expressão em grupos de miRNAs.
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Declaração de ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação HEMOPA (Parecer 194.196 aprovação 17 de outubro de 2012)) para a obtenção das amostras (CP a partir do ST).

4.2.1 Proveniência dos dados públicos utilizados

Todos os procedimentos utilizados para o sequenciamento NGS do concentrado de plaquetas que gerou os dados desse estudo estão descritos por (PONTES et al., 2015).

4.2.2 Dados de expressão de miRNAs

Os dados brutos de RNA-Seq de pequenos RNAs dos concentrados de plaquetas do estudo de Pontes et al. (2015) foram obtidos em formato (.SRA), disponíveis GEO³ (*Gene Expression Omnibus*) com o número de acesso: GSE61856. Os dados das amostras do concentrado de plaquetas foram obtidos dos *datasets* descritos na TABELA 1.

TABELA 1: AMOSTRAS USADAS NESSE ESTUDO.

Tipo celular: Plaquetas			
Amostras (GEO)*	Nome da amostra	SRA	Referência
GSM1515807	Plaquetas 1º dia	SRX716593	PMID: 26121269
GSM1515808	Plaquetas 2º dia	SRX716594	
GSM1515809	Plaquetas 3º dia	SRX716595	
GSM1515810	Plaquetas 4º dia	SRX716596	
GSM1515811	Plaquetas 5º dia	SRX716597	
GSM1515812	Plaquetas 7º dia	SRX716598	

* Acesso: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE61856>).

³ GEO: *Gene Expression Omnibus* é um repositório público internacional que arquiva e distribui gratuitamente dados de microarray, dados de NGS e outras formas de dados genômicos funcionais de alto rendimento submetidos pela comunidade de pesquisa.

4.2.3 Genoma de referência e anotação dos miRNAs

Para a etapa de mapeamento e anotação dos miRNAs foi usado o genoma humano de referência (*Homo sapiens*) hg19 e sua respectiva versão foi obtido do UCSC *Genome Browser* (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html>). As sequências em formato FASTA das regiões precursoras e maduras dos miRNAs, anotados para a espécie humana, foram obtidas do repositório oficial de miRNAs, o miRBase (<http://www.mirbase.org>) - versão 21, bem como as coordenadas genômicas dessas regiões foram extraídas de arquivos em formato GFF3, disponíveis em: <ftp://mirbase.org/pub/mirbase/21/>.

4.3 Identificação *in silico* dos miRNAs

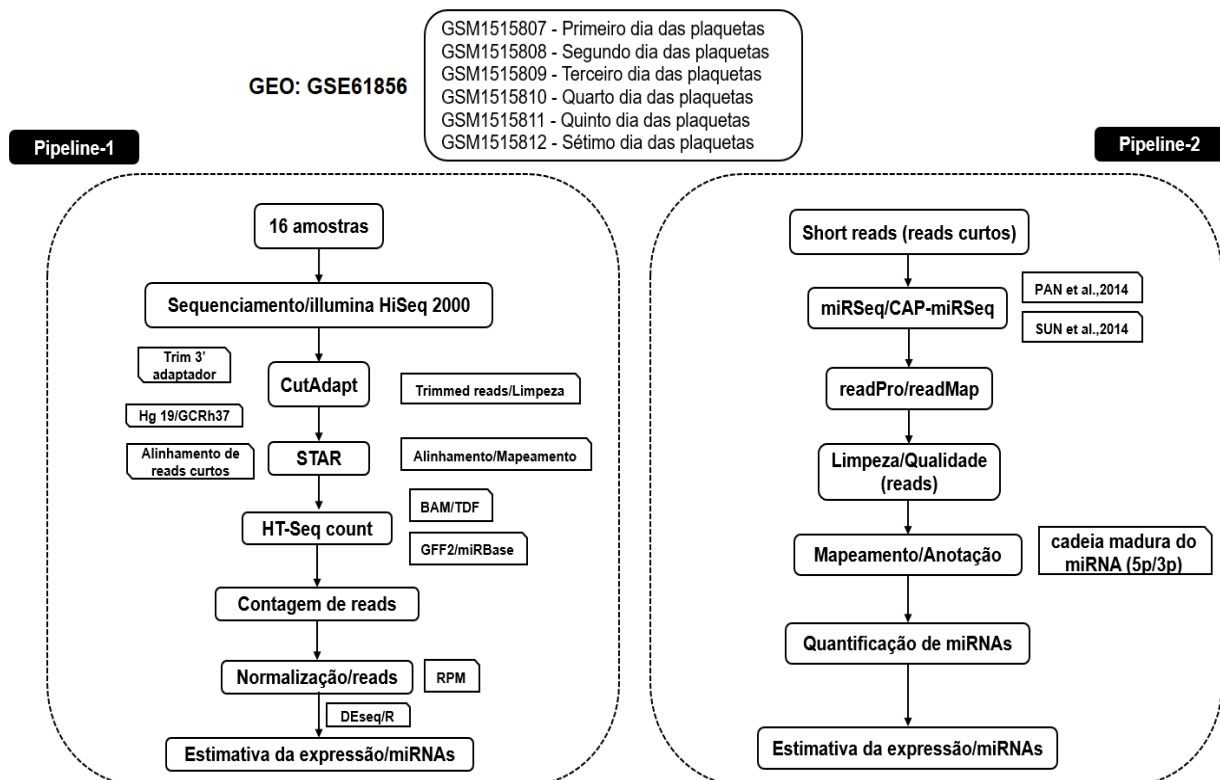
Os *reads* obtidos do SRA⁴ (*Sequence read archive*) das amostras da TABELA 1 das seis bibliotecas foram baixadas do GEO: GSE61856. Esses *reads* com adaptador 3', detectadas com um comprimento de sequência menor do que 17 nucleotídeos (nt) foram removidas com o Cutadapt (MARTIN, 2011). Foram identificadas mais de 90% das *reads* de alta qualidade em todas as bibliotecas, as quais já tinham sido avaliadas pelo software FASTQC no estudo de PONTES et al., 2015. A segunda estratégia de verificação de qualidade das leituras foi executada para avaliar a distribuição do comprimento dessas leituras que deveriam estar centralizadas em 22 pb. Verificamos que o comprimento dessas leituras qualificadas foi menor de 20% de um total de 44% de miRNAs humanos que foram mapeados.

Quando alterado o critério de comprimento das leituras qualificadas para um comprimento de 15-35 nt, as seis bibliotecas mostraram fortes picos no comprimento de 32 nt. A análise da categoria de leituras mostrou que a maioria

⁴ SRA: *Sequence Read Archive* disponibiliza dados de sequências biológicas à comunidade de pesquisa para melhorar a reprodutibilidade e permitir novas descobertas, comparando conjuntos de dados. Além disso, o SRA armazena dados de sequenciamento bruto e informações de alinhamento obtidos com diversas plataformas de sequenciamento de alto rendimento.

dessas leituras maiores que 22 nt pertenceram a ncRNA. Em seguida uma parte da *pipeline* de alinhamento das leituras com CAP-miRSeq (SUN et al., 2014) foi usado na quantificação dos miRNAs. Os miRNAs foram identificados com a anotação miRBase, version 21 (<http://www.mirbase.org/>). As principais etapas de identificação dos miRNAs nos dados da TABELA 1 são descritas em duas *pipelines* da FIGURA 13.

FIGURA 13: PIPELINES PARA IDENTIFICAÇÃO DE miRNAs. A *pipeline* 1: os *reads* brutos do RNA-Seq foram limpos com a ferramenta CutAdapt para remover as seqüências de adaptadores usados durante o sequenciamento com a plataforma Illumina. A ferramenta STAR foi usada para o alinhamento contra o genoma humano de referência. Em seguida, os *reads* das seqüências curtas foram anotados para precursores no miRBase versão 21. A ferramenta HT-Seq *count* foi usada para contagem dos miRNAs. A *pipeline* 2: usaram duas ferramentas que foram para identificar os miRNAs maduros. De forma mais eficiente o alinhamento dos *reads* com CAP-miRSeq foi usado na quantificação de miRNAs maduros que foram provenientes de uma das regiões maduras -5p ou -3p.



4.4 O perfil de miRNAs entre CP de diferentes dias de armazenamento

Os miRNAs comuns identificados entre os CPs de armazenamento do primeiro dia foram usados como controle e os CPs dos outros dias de armazenamento como os alvos deste estudo. Em seguida, foram feitas as seguintes comparações: primeiro versus segundo, primeiro versus terceiro, primeiro versus quarto, primeiro versus quinto e primeiro versus sétimo dia de armazenamento. A ferramenta *InteractiVenn* (HEBERLE et al., 2015) foi usada para identificar miRNAs comuns entre duas comparações na região da interseção do diagrama de *Venn*, para todas as cinco comparações. Partindo das cinco comparações usando o diagrama de *Venn*, somente os miRNAs comuns identificados entre dois dias foram selecionados para análise de expressão diferencial

4.5 Análise da expressão diferencial dos miRNAs

Os *reads* brutos de cada sequência de miRNA foram normalizadas em RPM (*Reads per million* – reads por milhão) e as contagens de sequências expressas diferencialmente entre as duas amostras (Controle versus Alvo) foram, então, analisadas utilizando o método de distribuição de Poisson (AUDIC; CLAVERIE, 1997) com o algoritmo IDEG6 (ROMUALDI et al., 2003). A medida do $\text{Log}_2 \text{Fold-Change}$ (FC) = (Alvo/Controle) foi aplicada para estimar a expressão diferencial dos miRNAs. A significância estatística dos miRNAs entre duas bibliotecas das condições investigadas foi estimada pelos valores de P. Foi usado a correção do *P-values* com o método de Bonferroni (ABDI, 2007).

4.6 Validação da expressão de miRNAs em 100 unidades de CP

Buffy coat, uma abordagem tradicional para obter CP, foi usada nesse experimento (HÖGMAN, 1988; VASCONCELOS; FIGUEIREDO; SEGATCHIAN, 2003). Para a obtenção do CP, uma bolsa de sangue total (Bag-Matrix, 450 mL) foi

centrifugada (Thermo Scientific) e fracionada no processador hematológico *Compomat G5* (Fresenius Kabi), que após a separação das plaquetas das células vermelhas do sangue, depositaram automaticamente o CP em uma bolsa satélite (BONTEKOE et al., 2014). Assim, 99,9% ($> 3 \log_{10}$) dos leucócitos foram removidos por filtração (BRUIL et al., 1995).

Cada CP é constituído por plaquetas de cinco doadores, para que a validação fosse realizada em 500 doadores, foram usados CPs de 250 homens e 250 mulheres na faixa etária que compreende jovens adultos - entre 18 e 40 anos. Seis dias de armazenamento foram analisados em um banco de sangue, e o primeiro dia foi o controle para os outros cinco dias. Assim, cinco comparações de expressão diferencial foram realizadas para cada um dos 14 miRNAs encontrados, totalizando 70 análises por CP.

Em 100 CPs foram realizadas 7.000 análises, o total desta validação. O *Mir-191* foi selecionado como um controle interno da eficiência da transcrição reversa e como miRNA de referência visto que é o mais altamente expresso em todos os dias de armazenamento do CP no banco de sangue (PONTES et al., 2015). Todas as reações RQ-PCR foram realizadas em triplicata para ambos os miRNAs.

Para quantificar os níveis dos miRNAs (*miR-145-5p*, *miR-150-5p*, *miR-183-5p*, *miR-26a-5p*, *miR-331-3p*, *miR-338-5p*, *miR-451a*, *miR-501-3p*, *miR-99b-5p*, *miR-1304-3p*, *miR-411-5p*, *miR-432-5p*, *miR-668-3p* e *miR-939-5p*), cada miRNA foi isolado de 100 diferentes unidades de CP, usando o kit de isolamento *mirVanaTM miRNA* (Thermo Fisher Scientific).

Os miRNA sofreram transcrição reversa utilizando o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific). A quantificação da expressão dos miRNAs foi aferida com ensaios *TaqMan microRNA* para *miR-145-5p* (002278), *miR-150-5p* (000473), *miR-183-5p* (002269), *miR-26a-5p* (000405), *miR-331-3p* (002233), *miR-338-5p* (002658), *miR-451a* (001141), *miR-501-3p* (001047), *miR-99b-5p* (000436), *miR-1304-3p* (002874), *miR-411-5p* (001610), *miR-432-5p* (001026), *miR-668-3p* (467282_mat) e *miR-939-5p* (002182) para RQ-PCR.

O DNA complementar foi amplificado por RQ-PCR utilizando o kit *TaqMan Universal Master Mix II* com *UNG* (Thermo Fisher Scientific) no termociclador QuantStudio 7 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific). Todas as reações de RQ-PCR foram realizadas em triplicata.

4.7 Estatísticas

Para testar o nível de expressão relativa dos miRNAs, um primeiro teste com ANOVA foi aplicado em múltiplas comparações para estimar a significância estatística da média relativa dos miRNAs em cada 100 unidades de CPs com ($P < 0.001$). Um segundo teste denominado *Wilcoxon signed rank test* ($P < 0.001$) entre a expressão relativa dos miRNAs do 2º e 4º dias foi aplicado. As análises de teste estatísticos foram feitos com *GraphPad Prism™ Software*, (GraphPad Software Inc., CA, USA, www.graphpad.com).

A análise do agrupamento hierárquico e *heatmaps* do perfil diferencial de miRNAs no CP foram realizadas com o módulo GENE-E do *software GenePattern* 3.9.6 (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/>). Análise do PCA (*Principal Component Analysis*) foi executada com a ferramenta *ClustVis* (METSALU; VILO, 2015). As elipses do PCA foram preditas com 95% de confiança para garantir a segregação entre os grupos de miRNAs.

5.1 Análise das bibliotecas sequenciadas

Neste estudo, foram analisados os dados de seis bibliotecas sequenciadas com NGS, correspondentes aos seis dias de armazenamento que geraram de 16 a 28 milhões de *reads* (TABELA 2). Essas seis bibliotecas produziram juntas um total de 108.557.843 *reads* de alta qualidade, (Tabelas Suplementares 1, Apêndice). A partir desses resultados foi identificada a maior quantidade de precursores (pre-miRNAs) na amostra controle do CP [(GSM1515807), TABELA 2], com um total de 612 pre-miRNAs que foram anotados no primeiro dia de armazenamento do CP. No entanto, esta quantidade diminuiu em amostras do segundo para o quinto dia e aumentou apenas na amostra do último dia [(GSM1515812), TABELA 2], com um total de 630 precursores contados.

TABELA 2: RESUMO DOS DADOS DE miRNAs DE PLAQUETAS. O número de *reads* e miRNAs identificados no concentrado de plaquetas (CP) nas seis amostras estudadas.

Categorias:	Dias de armazenamento do CP					
	Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto	Quinto	Sétimo
Total (número de <i>reads</i>)	16.212.635	13.594.963	17.214.842	25.325.847	16.161.626	28.515.834
Alta qualidade*	15.179.341	12.594.629	16.110.892	23.520.798	14.946.449	26.205.734
<i>Reads</i> pre-miRNAs	1.273.327	1.318.186	1.235.562	1.442.130	1.122.239	1.275.954
Total: Pre-miRNAs	612	565	571	545	495	630
<i>Reads</i> (maduros)	5.288.808	3.428.769	3.314.392	2.242.834	1.221.476	3.064.272
Total: miRNAs maduros	807	739	737	704	622	810

miRNA, microRNA, * (*Trimmed*: Sequências aparadas).

Esse comportamento também foi monitorado quanto ao número de miRNAs maduros. Na amostra controle do CP, foram identificados 807 miRNAs maduros, correspondendo a mais de 5 milhões dos *reads* mapeados, posteriormente houve uma diminuição no decorrer do aumento do tempo de armazenamento dos CPs. No entanto, no último dia, houve um aumento de 810 miRNAs maduros (TABELA 2). Os resultados da quantidade de miRNAs precursores e maduros estão na Tabela Suplementar 2 (Apêndice).

5.2 Comparação da expressão diferencial de miRNAs no CP armazenado

Ao comparar a quantidade de miRNAs no primeiro dia (controle) com o segundo dia de armazenamento, foram identificados 284 miRNAs para serem diferencialmente expressos em comum. Quando foi feito dessa forma, a comparação entre o primeiro e terceiro dia de armazenamento, foram identificados outros 290 miRNAs para serem diferencialmente expressos em comum. Todas as cinco comparações deste gênero estão descritas na Tabela Suplementar 3 (Apêndice).

Após essa etapa, foram comparadas as frequências de ocorrências de miRNAs diferencialmente expressos entre primeiro *versus* segundo, primeiro *versus* terceiro, primeiro *versus* quarto, primeiro *versus* quinto e primeiro *versus* sétimo armazenamento, baseado na abordagem de distribuição de Poisson (AUDIC; CLAVERIE, 1997). Com esse método foram identificados 50, 68, 157, 150 e 149 miRNAs, respectivamente, Tabela Suplementar 4 (Apêndice). Destes cinco conjuntos de miRNAs, foram eleitos 14 comum a todas as comparações, que foram plotados em gráficos de dispersão *Volcano Plot* da FIGURA 14A. Os valores de expressão dos miRNAs foram categorizados em *downregulated* (miRNAs que apresentaram diminuição de expressão) e *upregulated* (miRNAs que apresentaram aumento de expressão), FIGURA 14B.

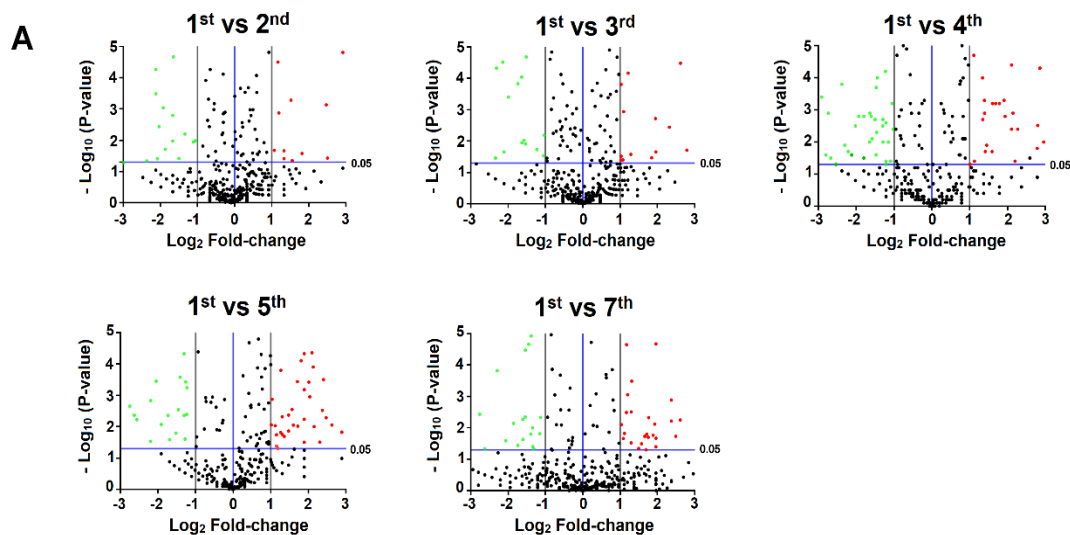
Dos 14 miRNAs, nove foram expressos *downregulated* (*miR-145*, *miR-150*, *miR-183*, *miR-26a-1*, *miR-331*, *miR-338*, *miR-451a*, *miR-501* e *miR-99b*), enquanto os outros cinco foram *upregulated* (*miR-1304*, *miR-411*, *miR-432*, *miR-939* e *miR-668*). Em seguida, foram identificados os miRNAs maduros desses precursores, com base nas maiores taxas de expressão. Foram eleitos os seguintes miRNAs maduros: *miR-145-5p*, *miR-150-5p*, *miR-183-5p*, *miR-26a-5p*, *miR-331-3p*, *miR-338-5p*, *miR-451a*, *miR-501-3p*, *miR-99b-5p*, *miR-1304-3p*, *miR-411-5p*, *miR-432-5p*, *miR-668-3p* e *miR-939-5p*, Tabelas Suplementares 5.1 e 5.2 (Apêndice).

Essa estimativa de quantificação da expressão foi inferida com base no número de sequências geradas, proporcional à abundância de transcritos (WEYRICH, 2012). Na TABELA 3, os 14 miRNAs diferencialmente expressos nos

CPs. Informação detalhada sobre estes miRNAs é mostrado o perfil de expressão, *Fold-change*, sequência madura e anotação específica da cadeia madura do miRNA nas categorias (-5p/-3p)⁵.

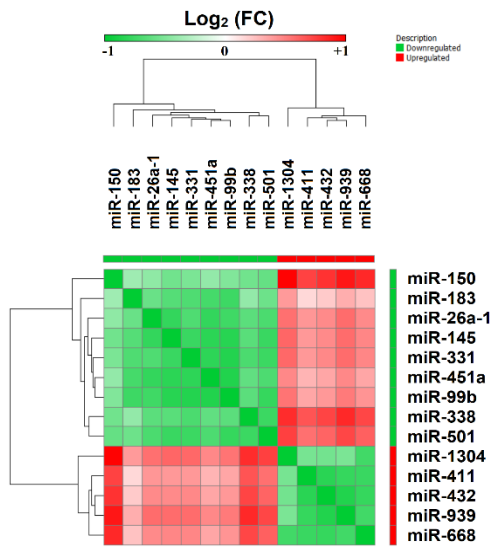
FIGURA 14: PERFIL DE miRNAs QUANTIFICADOS EM CP. (A) Os gráficos *volcano plot* mostram o número de miRNAs diferencialmente expressos em cada comparação. No eixo X, os valores de FC e no eixo Y, os valores de Log_{10} (*P-value*). Os gradientes de cor verde representam os valores de expressão dos miRNAs *downregulated*, enquanto o gradiente de cor vermelha os gradientes de expressão para os miRNAs *upregulated*. (B) *Heatmap* mostra perfil de expressão claramente definido de miRNAs quando armazenado em um banco de sangue por mais de 5 dias. A métrica da distância euclidiana foi usada para agrupar os miRNAs com perfis semelhantes. (C) Nível de expressão normalizado na escala Log_{10} (*reads* por milhão) dos miRNAs *downregulated* e (D) miRNAs *upregulated*. Nos gráficos C e D, o eixo X mostra valores de nível de expressão dos miRNAs normalizados e o eixo Y mostra os dias de armazenamento.

- FC = Fold-Change; miRNA = microRNA; CP = concentrado de plaquetas.
- *Storage days* = dias de armazenamento. *Normalized expression level* = Nível de expressão normalizada.
- 1st = 1º dia, 2nd = 2º dia, 3rd = 3º dia, 4th = 4º dia, 5th = 5º dia, 7th = 7º dia

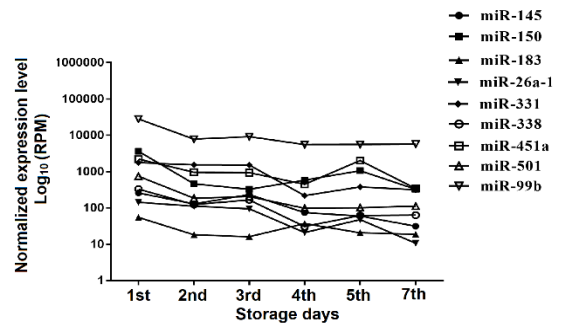


⁵ A sequência madura do microRNAs apresentam anotações em duas variantes que podem ser originadas de regiões da cadeia -5p ou -3p. Essas variantes de miRNAs são denominados *isomiRs*. Esse termo foi introduzido por Morin et al., e referem-se às sequências que têm variações em relação à sequência do miRNA de referência (MORIN et al., 2008).

B



C



D

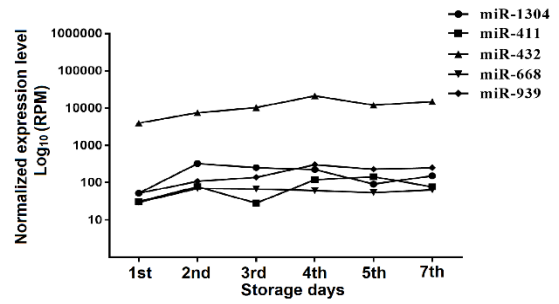


TABELA 3: miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS MAIS COMUNS EM CINCO CONDIÇÕES.

miRNA	miRBase: (isomiR:-5p/-3p)	Log ₂ Fold-Change = (Alvo/controle)										Perfil de expressão
		Segundo/ Primeiro	P-Value	Terceiro/ Primeiro	P-Value	Quarto/ Primeiro	P-Value	Quinto/ Primeiro	P-Value	Sétimo/ Primeiro	P-Value	
miR-145	5p-guccaguuuucccaggaaucccu	-2.13	0.00005 (**)	-1.85	0.00453 (*)	-1.98	0.00000 (**)	-1.92	0.00000 (**)	-3.04	0.00000 (**)	<i>Downregulated</i>
miR-150	5p-ucucccaaccuuguaccagug	-2.08	0.03883 (**)	-3.43	0.00000 (**)	-2.82	0.00000 (**)	-1.58	0.00000 (**)	-3.47	0.00000 (**)	<i>Downregulated</i>
miR-183	5p-uauaggcacugguagaauucacu	-2.04	0.00366 (**)	-1.72	0.00000 (**)	-1.15	0.00000 (**)	-1.23	0.00057 (**)	-1.54	0.00002 (**)	<i>Downregulated</i>
miR-26a-1	5p-uucaaguaauccaggauaggcu	-1.20	0.00036 (**)	-1.23	0.05688 (*)	-2.95	0.00000 (**)	-1.41	0.00000 (**)	-3.74	0.00000 (**)	<i>Downregulated</i>
miR-331	3p-gccccugggcuauccuagaa	-1.25	0.00423 (*)	-1.99	0.00092 (**)	-3.20	0.00000 (**)	-2.03	0.00000 (**)	-2.49	0.00000 (**)	<i>Downregulated</i>
miR-338	5p-aacaauauccuggugcugagug	-1.34	0.00630 (**)	-2.11	0.00000 (**)	-3.59	0.00000 (**)	-2.22	0.00000 (**)	-2.38	0.00000 (**)	<i>Downregulated</i>
miR-451a	aaaccguuaccuauacugaguu	-1.25	0.00000 (*)	-1.20	0.00000 (**)	-2.48	0.00000 (**)	-2.20	0.02921 (*)	-2.70	0.00000 (**)	<i>Downregulated</i>
miR-501	3p-aaugcaccgggcaaggauucu	-2.07	0.00000 (**)	-1.82	0.00000 (**)	-3.12	0.00000 (**)	-2.70	0.00000 (**)	-2.74	0.00000 (**)	<i>Downregulated</i>
miR-99b	5p-caccguagaaccgaccuugcg	-1.89	0.00000 (**)	-1.57	0.00000 (**)	-2.52	0.00000 (**)	-2.14	0.00000 (**)	-2.29	0.00000 (**)	<i>Downregulated</i>
miR-1304	3p-ucucacuguagccucgaacccc	2.58	0.00000 (**)	2.32	0.00000 (**)	1.91	0.00000 (**)	1.31	0.01760 (*)	1.54	0.00000 (**)	<i>Upregulated</i>
miR-411	5p-uaguagaccguauagcguacg	1.27	0.00000 (**)	1.47	0.00157 (*)	1.76	0.00000 (**)	2.38	0.00000 (**)	1.30	0.00001 (**)	<i>Upregulated</i>
miR-432	5p-ucuggaguaggucuuugggugg	1.28	0.00000 (**)	1.42	0.00000 (**)	2.23	0.00000 (**)	1.77	0.00000 (**)	1.90	0.00000 (**)	<i>Upregulated</i>
miR-668	3p-ugucacucggcucgcccacuac	1.57	0.00000 (**)	1.22	0.00007 (**)	1.15	0.00000 (**)	1.04	0.00133 (**)	1.09	0.00048 (**)	<i>Upregulated</i>
miR-939	5p-uggggagcugaggcucugggggug	1.00	0.00000 (**)	1.45	0.00000 (**)	2.35	0.00000 (**)	2.31	0.00000 (**)	2.26	0.00000 (**)	<i>Upregulated</i>

O valor absoluto de Log₂ (FC) >1 ou Log₂ (FC) < -1, e 0.01 ≤ P-value < 0.05 (***) após o P-value)

O valor absoluto de Log₂ (FC) >1 ou Log₂ (FC) < -1, e P-value ≤ 0.01 (****) após o P-value)

5.3 Perfil de quantificação de miRNAs no CP

A variação quantitativa dos miRNAs estabeleceu a predominância de um perfil de expressão, uma vez que o perfil *downregulated* em maior quantidade no CP foi mais estável e normalizado para um total de 97.633 RPM, quando comparado ao perfil de expressão oposto (*upregulated*), onde os miRNAs normalizaram com um total de 24.694 RPM.

Este resultado confirma a análise do *cluster* não-supervisionado de miRNAs com perfil de expressão distintamente definido quando armazenado em um banco de sangue por mais de 5 dias, como mostrado na FIGURA 14B, onde a variação da expressão normalizada dos miRNAs na escala Log_{10} , refletiu a assinatura dos diferentes perfis de expressão durante o armazenamento.

Por exemplo, o perfil *downregulated* apresentou uma taxa de expressão normalizada entre 10 e acima de 10.000 RPM. Foi observado, também, que a diminuição da expressão da maioria desses miRNAs ocorreu no quarto e sétimo dia, com exceção do *miR-99b* que apresentou o maior nível de expressão normalizada, conforme mostrado na FIGURA 14C.

Foram identificados nove miRNAs maduros com um perfil *downregulated* (*miR-145-5p*, *miR-150-5p*, *miR-183-5p*, *miR-26a-5p*, *miR-331-3p*, *miR-338-5p*, *miR-451a*, *miR-501-3p* e *miR-99b-5p*) que correspondem a 97.633 *reads* que foram mapeadas de 84.605 *reads* de seus pre-miRNAs, (Tabela Suplementar 5.2 Apêndice).

Os miRNAs *upregulated* variaram com os níveis de expressão normalizada entre 10 e 10.000 RPM. Por exemplo, o *miR-432* obteve a maior taxa de expressão normalizada, FIGURA 14D. Assim, os cinco miRNAs maduros com um perfil *upregulated* (*miR-1304-3p*, *miR-411-5p*, *miR-432-5p*, *miR-668-3p* e *miR-939-5p*), mapearam com 24.694 *reads* a partir de 72.705 *reads* de seus pre-miRNAs (Tabela Suplementar 5.2 Apêndice).

5.4 Validação de miRNAs diferencialmente expressos por RQ-PCR

Foram validados os 14 miRNAs por PCR quantitativo em tempo real (RQ-PCR) em 100 unidades de CPs para testar os resultados de expressão diferencial nos dados do NGS (Tabela Complementar 6 Apêndice). O padrão de quantificação relativa desses miRNAs confirmou os resultados obtidos pelo NGS.

Foram confirmados os miRNAs com um perfil *downregulated* para *miR-145-5p*, *miR-150-5p*, *miR-183-5p*, *miR-26a-5p*, *miR-331-3p*, *miR-338-5p*, *miR-451a*, *miR-501-3p* e *miR-99b-5p*. Por exemplo, os níveis de expressão de *miR-150-5p*, *miR-501-3p*, *miR-338-5p* e *miR-99b-5p* mostraram que eles foram os primeiros a diminuir durante o armazenamento do CP, esse resultado é mostrado na FIGURA 15.

E quando testados em 100 unidades de CPs, a média da expressão desses miRNAs foram menores, quando comparadas com a média da expressão dos outros seis miRNAs de mesmo perfil, que também foram confirmados nessa validação (FIGURA 15D-I).

Por outro lado, os miRNAs *upregulated*: *miR-1304-3p*, *miR-411-5p*, *miR-432-5p*, *miR-668-3p* e *miR-939-5p*, que também foram confirmados na validação, exibiram a maior média da expressão relativa, quando testados em 100 unidades de CPs, superando a expressão dos miRNAs *downregulated* (FIGURA 16).

FIGURA 15: EXPRESSÃO DA MÉDIA RELATIVA DE miRNAs DOWNREGULATED (ANÁLISE COM RQ-PCR). Nesse experimento, *miR-150-5p*, *miR-501-3p* e *miR-338-5p* (A-C) apresentaram uma média de 0.6 do nível de expressão em 100 unidades de CP, enquanto os outros miRNAs (D-I) tiveram um média de 0,7. A ANOVA foi aplicada em um teste de múltipla comparação para estimar a significância da média relativa desses miRNAs em 100 unidades de CP (ns, não significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$). Em todos os gráficos, o eixo X mostra o tempo de armazenamento dos CPs e o eixo Y as 100 unidades do CP.

- ANOVA = Análise de Variância; RQ-PCR = PCR quantitativo em tempo real.
- PC units = Unidades de CP
- 1st = 1º dia, 2nd = 2º dia, 3rd = 3º dia, 4th = 4º dia, 5th = 5º dia, 7th = 7º dia

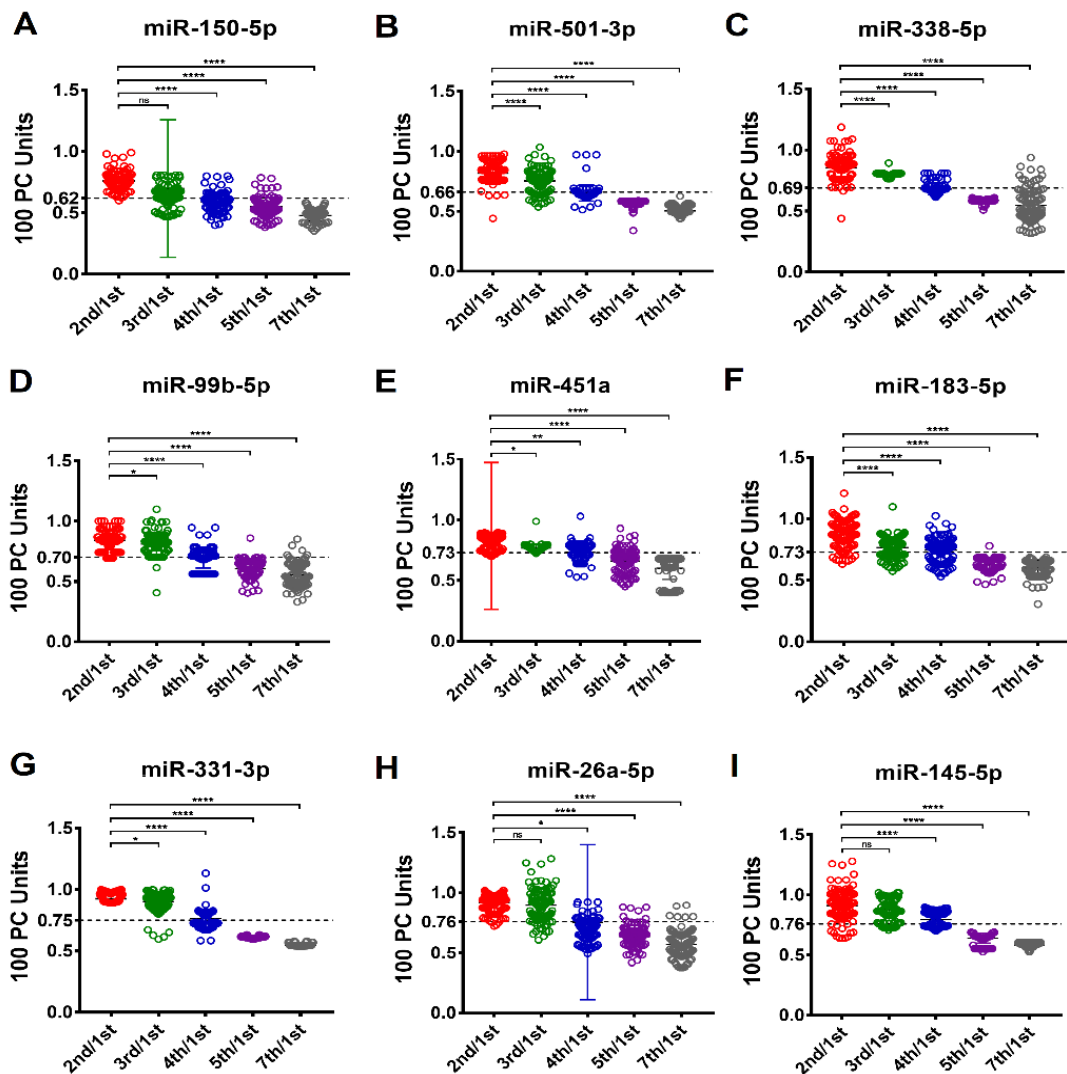
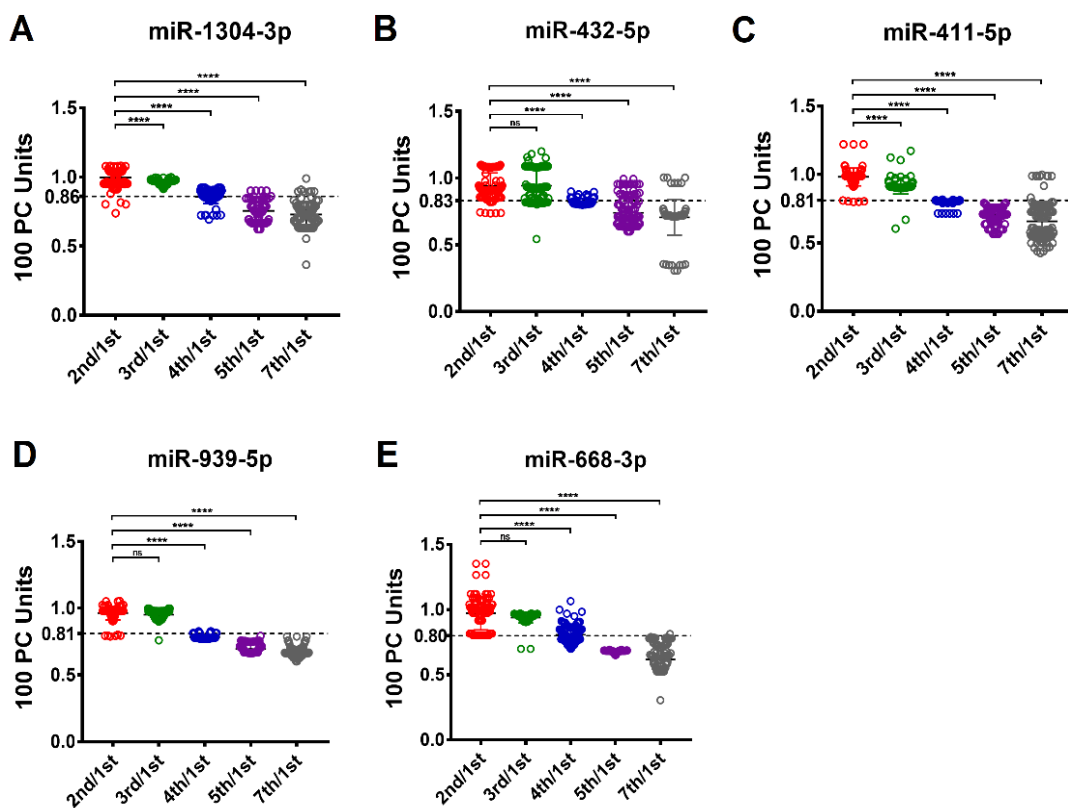


FIGURA 16: EXPRESSÃO DA MÉDIA RELATIVA DE miRNAs UPREGULATED (ANÁLISE RQ-PCR). Nesse experimento, os miRNAs (A – E) apresentaram um aumento de 0.8 da média da expressão em 100 unidades de CP. A ANOVA foi aplicada em testes de múltipla comparação para estimar a significância da média relativa desses miRNAs em 100 unidades de CP. (ns, não significativo, **** $p < 0,001$). Em todos os gráficos, o eixo X mostra o tempo de armazenamento dos CPs e o eixo Y as 100 unidades do CP.

- ANOVA = Análise de Variância; RQ-PCR = PCR quantitativo em tempo real.
- *PC units* = Unidades de CP
- 1st = 1º dia, 2nd = 2º dia, 3rd = 3º dia, 4th = 4º dia, 5th = 5º dia, 7th = 7º dia



5.5 Análise do agrupamento hierárquico e PCA

Os resultados dos níveis de expressão dos miRNAs obtidos por NGS e sua validação com RQ-PCR foram analisados com agrupamento hierárquico e PCA. Nos dados do NGS, foram identificados dois grupos no agrupamento hierárquico que mostraram maior semelhança de FC, havendo uma nítida diferença entre os dois perfis expressão de miRNAs no CP armazenado (FIGURA 17A), conforme o

previsto na análise dos perfis de quantificação desses miRNAs mostrados na FIGURA 14B.

O agrupamento hierárquico também mostrou como a variação média da expressão relativa, refletiu a instabilidade da meia vida dos miRNAs no quarto dia de armazenamento do CP. Isso significa que houve uma diminuição gradual da quantidade de miRNAs, principalmente após o quarto dia, pois os miRNAs foram quantificados abaixo da média prevista para ambos perfis de expressão (FIGURAS 15 e 16).

A análise dos dados NGS com o PCA, identificou os miRNAs em grupos com elipses separadas. Essa observação confirmou a diferença entre os dois perfis de expressão categorizados em *down* e *upregulated* (FIGURA 17C). Os dados de quantificação relativa observados tanto pelo agrupamento hierárquico da FIGURA 17B, quanto pelo outro agrupamento estabelecido pelas elipses sobrepostas do PCA da FIGURA 17D, confirmaram a variação da média da expressão dos miRNAs após o quarto dia. Conseqüentemente, esta variação da média da expressão dos miRNAs, refletiu a diminuição da quantidade de miRNAs durante o armazenamento das plaquetas. Todos os miRNAs que exibiram essa variação de expressão entre o segundo e o quarto dia foram testados com o teste de *Wilcoxon* com valores de ($P < 0,001$) (FIGURAS 18 e 19).

Conclui-se, que os miRNAs apresentaram as menores expressões nos CPs do quarto dia e, provavelmente, diminuíram nos últimos 2 dias de armazenamento plaquetário. Por exemplo: *miR-150-5p*, *miR-501-3p*, *miR-338-5p* e *miR-99b-5p*, mostrados na FIGURA 15, apresentaram as menores expressões relativas nos CPs do quarto dia, quando foram comparados com os miRNAs *upregulated*, listados na FIGURA 16. Estes resultados fornecem uma predição confiável de miRNAs diferencialmente expressos para o quarto dia testado. O fluxo de trabalho das principais etapas dos resultados gerados neste estudo está resumido no painel esquemático da FIGURA 20.

FIGURA 17: AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO E PCA. Os agrupamentos hierárquicos (A) e (B) mostram a correlação entre as amostras nos dados NGS e RQ-PCR. Nos dados do NGS, o *heatmap* gerou dois grupos: miRNAs com perfil *downregulated* – gradiente em cor verde (menor correlação), e miRNAs com perfil *upregulated* – gradiente em cor vermelha (maior correlação). Os dados do RQ-PCR, no quarto dia, mostraram o limite entre a maior e a menor correlação representada por cada perfil de miRNA. A métrica de correlação de *Pearson* foi usada para gerar os agrupamentos. PCA: (C) expressão dos miRNAs em dados NGS e (D) expressão quantitativa nos dados de RQ-PCR, foram comparados pelo cálculo das componentes principais na escala de variância unitária SVD pelo *software ClustVis*. Nos gráficos C e D, o eixo X mostra os valores dos componentes principais 1, e o eixo Y, os componentes principais 2.

- PCA = *Principal Component Analysis*; NGS = *Next-Generation Sequencing*; SVD = *Unit Variance Scale*.
- *Relative expression* = Expressão relativa
- *Target* = Alvo; *Control* = controle

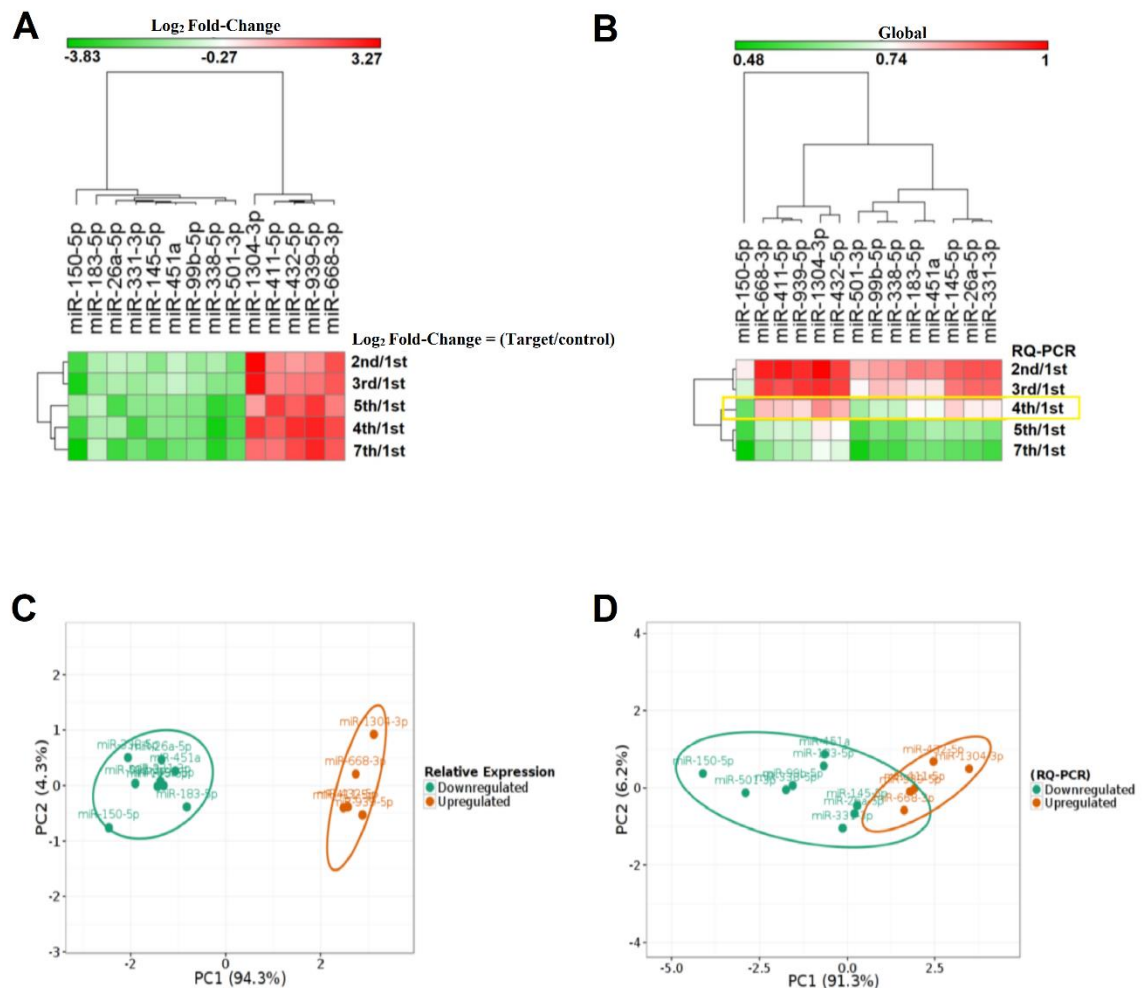


FIGURA 18: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs DOWNREGULATED POR RQ-PCR NO QUARTO DIA DO CP. A expressão quantitativa de miRNAs *downregulated* durante o armazenamento avançado, mostra que no quarto dia foram significativamente menores quando comparados com o segundo dia, determinado pelo teste de *Wilcoxon signed rank test* ($p < 0,001$). Em todos os gráficos, o eixo X mostra o tempo de armazenamento dos CPs e o eixo Y, os valores de RQ-PCR.

• *miR expression* = Expressão do miR

• 2nd = 2º dia e 4th = 4º dia.

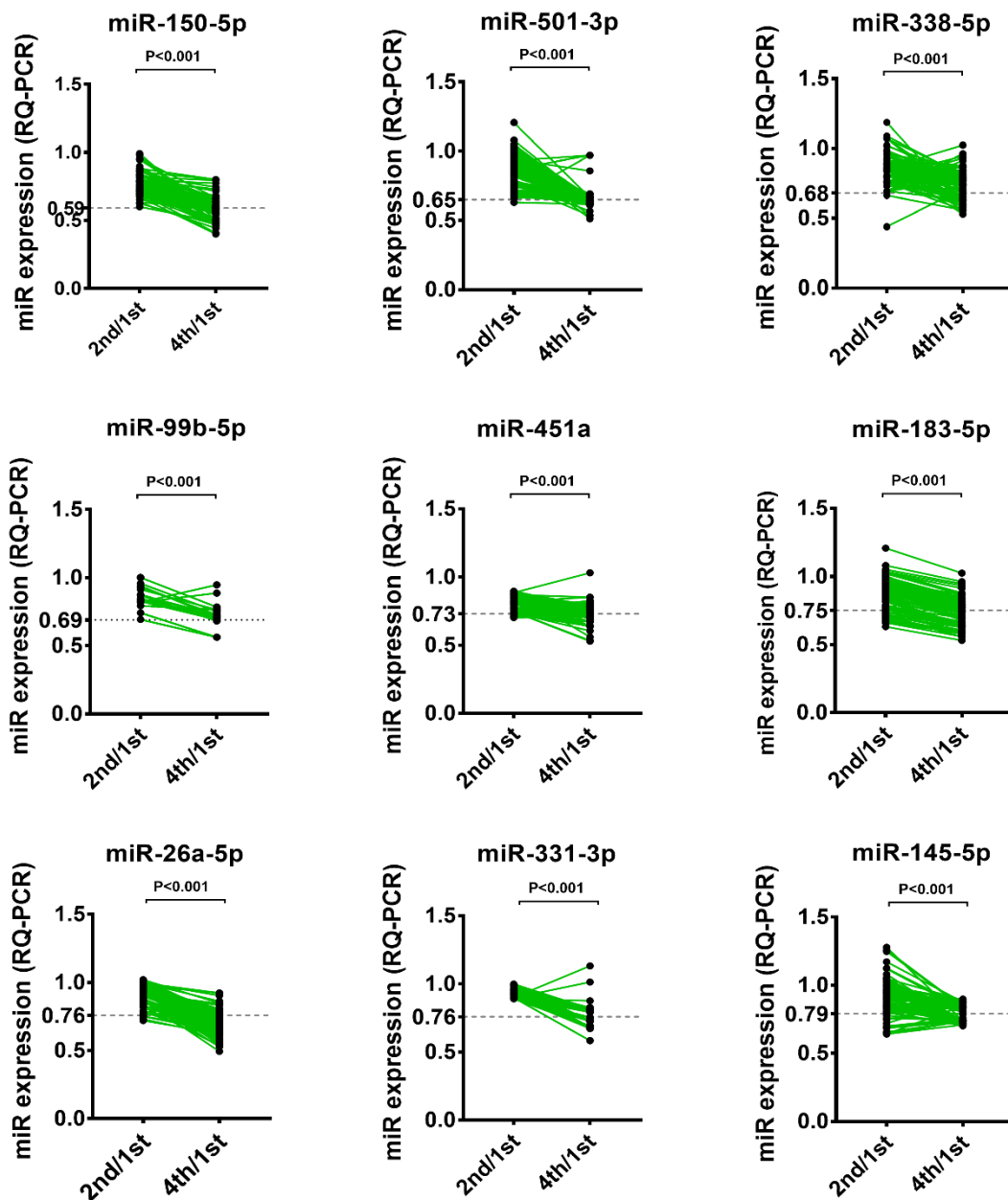
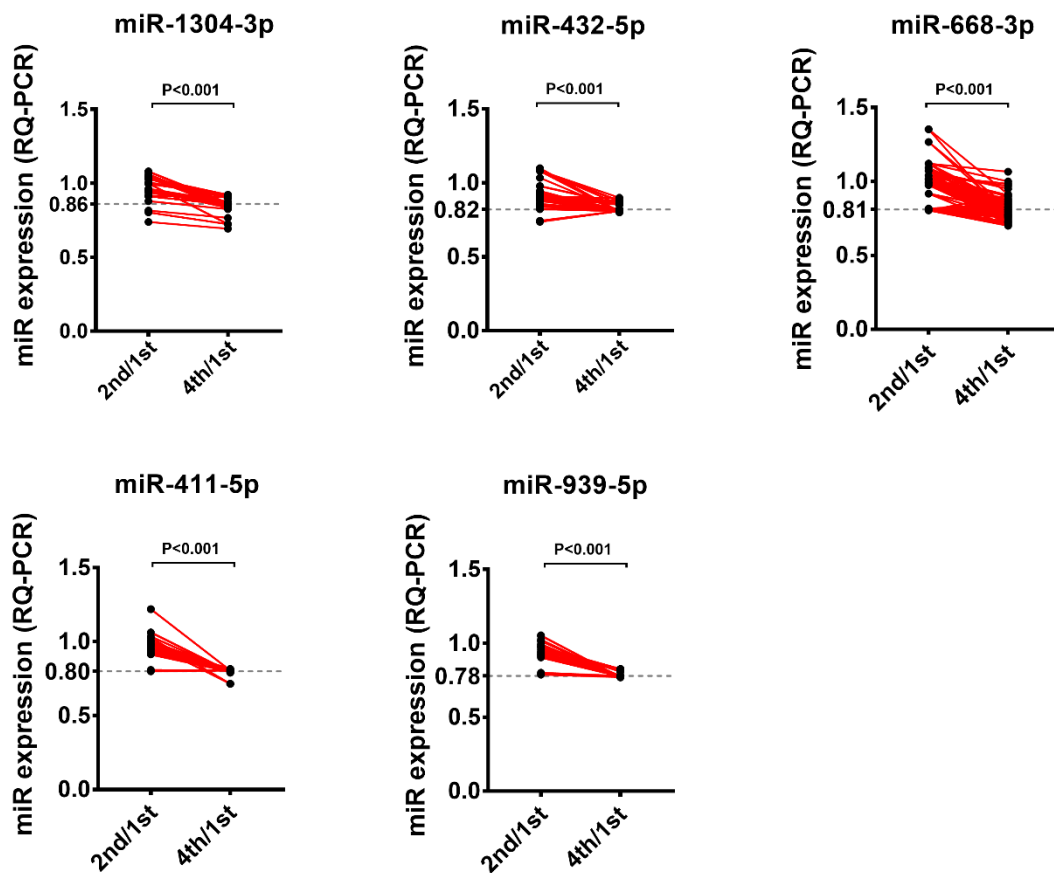


FIGURA 19: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs UPREGULATED POR RQ-PCR NO QUARTO DIA DO CP. A expressão quantitativa de miRNAs *upregulated* no quarto dia foram significativamente menores quando comparado com o segundo dia, determinado pelo teste de *Wilcoxon signed rank test* ($p < 0,001$). Nesse experimento os miRNAs *upregulated* (A-E) apresentaram maiores médias de expressão em 100 unidades de CP.

- *miR expression = Expressão do miR*
- 2nd = 2º dia e 4th = 4º dia.



6 DISCUSSÃO

O envelhecimento é um processo progressivo de perda da integridade fisiológica, incluindo comprometimentos moleculares, celulares e de órgãos e, finalmente, o aumento da inflamação crônica e vulnerabilidade a doenças e a morte. Pesquisas na triagem de marcadores moleculares da idade para prever ou monitorar o declínio fisiológico associado à idade e à doença experimentaram um avanço sem precedentes nos últimos anos (YU et al., 2016).

As plaquetas circulam no sangue por aproximadamente cinco dias, depois desse período, elas são retiradas da circulação e destruídas no baço. Analogamente, este envelhecimento também acontece *in vitro*, onde nos bancos de sangue da maioria dos países, as plaquetas são desprezadas após cinco dias de armazenamento (ÁRNASON; SIGURJÓNSSON, 2017).

Em nosso estudo anterior, descrevemos os 10 miRNAs mais expressos nos diferentes dias de armazenamento plaquetário (PONTES et al., 2015). Neste segundo estudo, focamos no perfil de miRNAs diferencialmente expressos em CPs armazenados em um banco de sangue, que para o nosso conhecimento ainda não foi relatado. Em ambos os estudos, identificamos que o número de miRNAs diminuiu do primeiro para o quinto dia de armazenamento, entretanto, o número de miRNAs aumentou no sétimo dia, conforme mostrado na TABELA 2. Por exemplo, o *miR-223* é o mais abundante em megacariócitos e plaquetas (SUNDERLAND et al., 2017), e também, no presente estudo foi identificado expresso em todos os dias de armazenamento plaquetário (Tabela Suplementar 2 Apêndice), mas não foi identificado diferencialmente expresso, conforme proposto nesse estudo (Tabela Suplementar 4 Apêndice), o que pode ser explicado pela cinética de sua degradação e por este motivo não foi validado.

Durante o armazenamento plaquetário é esperado que a quantidade de miRNAs diminua (YAN et al., 2016), no entanto, a quantidade desses transcritos aumentou do quinto para o sétimo dia. Este aumento inesperado, se levarmos em conta a degradação gradual dos miRNAs durante o armazenamento, provavelmente, foi causado pela ativação plaquetária em função do

envelhecimento, causado pelo armazenamento por mais de um dia que pode ter liberado micropartículas ricas em miRNAs (BOILARD; BELLEANNÉE, 2016; LAFFONT et al., 2013).

No entanto, também é provável que os pre-miRNAs que regulam a senescência, tenham sido clivados após o quinto dia de armazenamento por enzimas de edição de RNA, RNases e RNA helicases, aumentando, assim, o número de miRNAs (ABDELMOHSEN et al., 2012). Outra hipótese que poderia explicar o aumento do número de miRNAs do quinto para o sétimo dia, supõe que os precursores de RNAs podem sofrer clivagem e produzir fragmentos de pequenos RNAs com capacidade reguladora para inibir a tradução de proteínas em resposta ao estresse (KATO; SLACK, 2013).

Nesse caso, o estresse é provocado pelo envelhecimento causado pelo período de armazenamento plaquetário por mais de cinco dias. No entanto, modificações pós-transcricionais podem influenciar a biogênese e a estabilidade dos miRNAs durante o armazenamento *ex vivo*, como alterações moleculares em DICER1, reduzindo o número de miRNAs que regulam fortemente a reatividade (NAGALLA et al., 2011).

Para entender as mudanças que ocorrem durante o armazenamento do CP, a expressão diferencial dos miRNAs é uma ferramenta útil para identificar as mudanças na fisiologia plaquetária (DAHIYA et al., 2015; YAN et al., 2016). O perfil diferencial de miRNA pode prever e monitorar como a meia-vida da molécula do miRNA varia e sofre rápidas mudanças na estabilidade durante os dias de armazenamento. Acredita-se que a meia-vida dos miRNAs plaquetários pode ser muito curta, pois a RNase abundante no sangue circulante, degrada rapidamente o RNA plasmático. Quando os miRNAs são transportados em micropartículas circulantes, eles se estabilizam para o transporte de ação, principalmente, após a ativação (DIEHL et al., 2012; JANSEN et al., 2014).

A aplicabilidade e inovação desse estudo está relacionada à implementação de um teste de qualidade para as bolsas de CP. Por essa medida, o perfil de

expressão diferencial de 14 miRNAs mais frequentes que foram identificados em todos os dias de armazenamento do CP, fornecem informações sobre o envelhecimento *in vitro* das plaquetas. Por exemplo, *miR-150-5p*, *miR-501-3p*, *miR-338-5p*, apresentaram as menores médias de expressão relativas em 100 unidades de CPs (FIGURA 15). Esse resultado mostrou que quanto mais acentuada a diminuição da expressão dos miRNAs, maior a deterioração das plaquetas armazenadas. Confirmamos essa nossa hipótese com os resultados mostrados nos gráficos das figuras 18 e 19, onde a variação na média da expressão relativa, refletiu a instabilidade da meia vida dos miRNAs no quarto dia de armazenamento do CP.

Os dados desse estudo revelaram muito mais miRNAs *downregulated* do que *upregulated*. Esses resultados indicam que as plaquetas sofrem envelhecimento *in vitro* e lesões de armazenamento pela degradação de RNAs, uma vez que essas células não apresentam núcleo. A maioria desses miRNAs está associada com a fisiologia plaquetária (EDELSTEIN; BRAY, 2011; KANNAN et al., 2009). Estudos demonstraram o envolvimento desses miRNAs e o seus papéis funcionais no armazenamento plaquetário e em plaquetas de utilidade clínica (DAHIYA et al., 2015), na regulação da matriz extracelular (RUTNAM; WIGHT; YANG, 2013), no câncer (MANGOLINI et al., 2014), na migração celular (URBICH; KUEHBACHER; DIMMELER, 2008), no controle do ciclo celular (BUENO; MALUMBRES, 2011), em processos de envelhecimento (HARRIES, 2014) e na apoptose (YU et al., 2014). Especificamente, a expressão de *miR-338-5p*, *miR-331-3p* e *miR-99b-5p*, foi relatada com reatividade plaquetária (KAUDEWITZ et al., 2016; ROWLEY et al., 2011).

Vale ressaltar que no quarto dia de armazenamento plaquetário, os CPs ainda são adequados para transfusão e no quinto dia, na maioria dos países, não. Os nossos resultados apontam que os miRNAs quantificados com as maiores médias da expressão relativa no quarto dia: *miR-1304-3p*, *miR-432-5p*, *miR-411-5p*, *miR-668-3p* e *miR-939-5p*, ilustrados na FIGURA 16, podem identificar os CPs a partir do quinto dia de armazenamento que ainda contém plaquetas

fisiologicamente normais e são adequadas para transfusão. Como no quinto dia as bolsas de CPs são descartadas porque a "maioria das plaquetas" tem lesões de armazenamento, os miRNAs podem diferenciar a minoria de CPs que não tem lesões. Essa é uma hipótese.

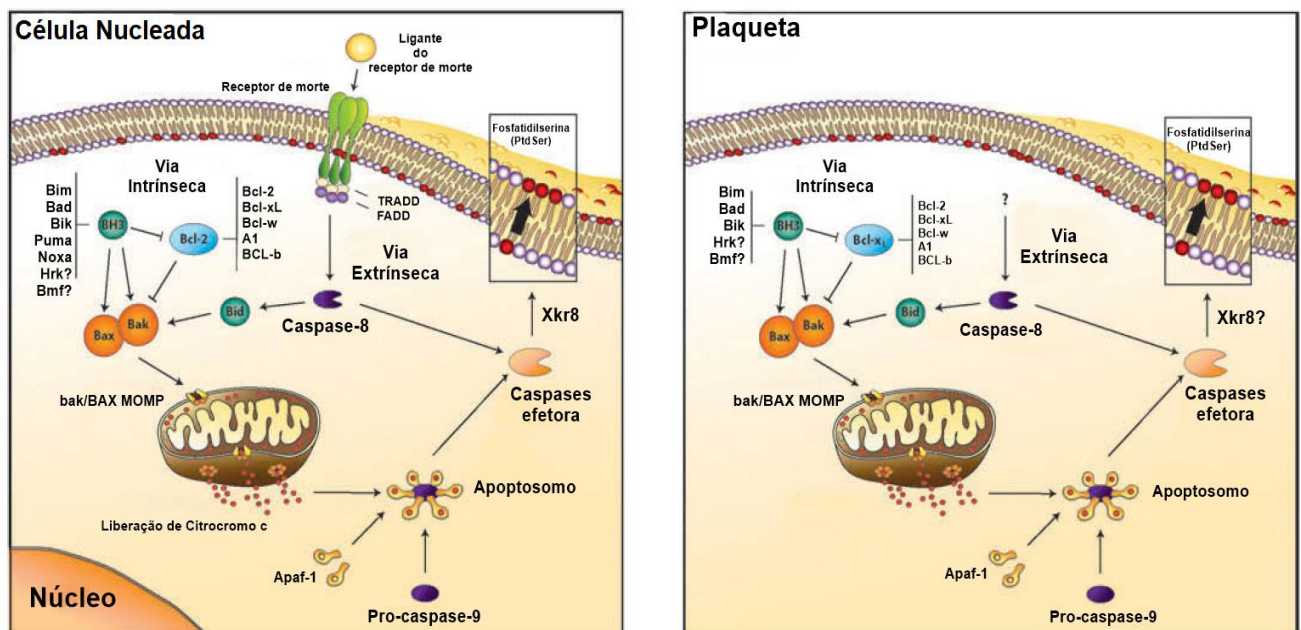
Dependendo do número de doadores de sangue com estado de saúde sub-ótimo (SHS - *Suboptimal Health Status*) do qual a bolsa de CP é composta, haverá mais ou menos durabilidade da fisiologia plaquetária. SHS é um problema de saúde pública em uma população caracterizada por (1) queixas de saúde ambíguas, (2) perda de vitalidade, (3) fadiga crônica e (4) baixos níveis de energia dentro de um período de 3 meses. Indivíduos com SHS apresentam um encurtamento relativo de telômeros que pode levar ao envelhecimento precoce das plaquetas (ALZAIN et al., 2017).

Por outro lado, os miRNAs *upregulated* são expressos em todos os dias de armazenamento e devem, provavelmente, regular genes que mantêm a plaqueta viva, porém ativada ou envelhecida. Esses miRNAs regulados positivamente são candidatos potenciais para regular a fisiologia plaquetária em condições *ex vivo*, uma vez que levantam suspeita da existência de mecanismos de regulação pós-transcricional para controlar a tradução de mRNAs de vias de apoptose que é uma causa da lesão de armazenamento (KANNAN et al., 2009; YU et al., 2014, 2015). Estudos identificaram esses miRNAs em vias biológicas relevantes para o câncer (ROMERO-CORDOBA et al., 2012).

Este aumento da expressão de miRNAs nos CPs sugere uma regulação negativa (*downregulated*) de seus alvos (KANNAN et al., 2009). Por exemplo, Kannan et al. demonstraram que durante o armazenamento plaquetário, em condições *ex vivo*, mRNA regulados por miRNAs *upregulated* são potencialmente *downregulated*, esclarecendo que as plaquetas utilizam mecanismos regulatórios pós-transcricionais, para controlar a tradução desses mRNAs que estão envolvidos na ativação de vias apoptóticas que aceleram o processo de morte celular (KANNAN et al., 2009; NAGALLA et al., 2011).

Por exemplo, o aumento da expressão *miR-326* em plaquetas armazenadas *in vitro*, comprovou que um gene regulador da família *Bcl-2* composto pelo anti-apoptótico *Bcl-xL*, identificado como um alvo desse miRNA, tem um efeito limitado para apoptose (YU et al., 2015). A FIGURA 21 do estudo de (LEBOIS; JOSEFSSON, 2016) mostra as principais vias de apoptose, onde o miRNA pode controlar a tradução mRNAs de vias apoptóticas como é o caso da família *Bcl-2*.

FIGURA 21: VIAS DE APOPTOSE EM CÉLULA NUCLEADA E PLAQUETAS ANUCLEADAS. O desenho esquemático mostra as duas principais vias denominadas intrínseca e extrínseca. A primeira via regula a vida útil dessas células. Por exemplo, os membros das famílias *Bcl-2* (em azul na figura) são genes de pró-sobrevivência que operam restringindo a atividade pró-apoptótica de *Bak* e *Bax* para desencadear a (MOMP: *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* - permeabilização da membrana externa mitocondrial) levando a liberação de citocromo c, juntamente com Apaf-1 e caspase-9 no proteossoma, para ocorrer a ativação de caspases efetoras e subsequente exposição a fosfatidilserina. A via extrínseca é mediada por receptores de morte celular. É ativada pela ligação dos ligantes de receptores de superfície celular. A caspase-8 é um membro crítico dessa via e a sua ativação é seguida pela ativação direta da caspase efetora.



Fonte: adaptado de LEBOIS; JOSEFSSON, 2016.

Esses mecanismos regulatórios ainda precisam ser bem entendidos, por causa da associação do processo de apoptose com as lesões celulares de plaquetas durante o armazenamento, levando a sua conseqüente perda de viabilidade, tornando-as ineficazes *in vivo* após a transfusão (YU et al., 2014).

Para esclarecer os resultados desse trabalho com observações mais consistentes, foi realizada uma consulta *in silico* dos genes-alvo regulados por esses miRNAs que foram preditos com *miRWalk* (DWEET; GRETZ, 2015) e *PlateletWeb* (BOYANOVA et al., 2011), mostrados nas Tabelas Suplementares 7 (Apêndice). Foram encontrados os alvos desses miRNAs biologicamente relevantes, capazes de fornecer pistas para compreender os mecanismos de expressão gênica que ocorre no CP associado as lesões de armazenamento plaquetário.

Nesses resultados, os miRNAs *downregulated* (*miR-150-5p*, *miR-501-3p*, *miR-338-5p* e *miR-99b-5p*) regulam genes da família ATPase mitocondrial, apoptose, proteínas da família da tirosina quinase e proteínas da superfície celular. Ao passo que os miRNAs *upregulated*, principalmente, *miR-1304-3p* e *miR-432-5p*, regulam genes que foram enriquecidos em famílias de ATPases mitocondrial, caspases e proteínas que agem fortemente na agregação plaquetária. Um estudo mostrou que superexpressão do *miR-570-3p* nas plaquetas resultou em níveis reduzidos de um mRNA da subunidade de ATP sintase mitocondrial (*ATP5L*) e apontaram que a disfunção mitocondrial é uma das razões para a perda da qualidade das plaquetas durante o armazenamento (DAHIYA et al., 2016).

Essas evidências reforçam as principais hipóteses desse estudo de que a desregulação desses miRNAs é causada pelo armazenamento, que coincidiu com o aparecimento das lesões plaquetárias. No futuro, esses resultados serão confirmados por quantificação absoluta para estimar o número exato de cópias de cada miRNA de plaquetas no CP.

7 CONCLUSÕES

A expressão diferencial de miRNAs se mostrou uma ferramenta eficaz para identificar alterações nas plaquetas durante o armazenamento do concentrado de plaquetas.

As análises dos nossos resultados revelaram uma variação da média da expressão relativa, refletindo a instabilidade da meia-vida dos miRNAs no quarto dia de armazenamento dos CPs, coincidido com o tempo de aparecimento das lesões de armazenamento plaquetário.

Um teste de qualidade para as bolsas de CPs poderá ser implementado utilizando de forma rápida a quantificação dos miRNAs *downregulated*, principalmente, *miR-150-5p*, *miR-501-3p*, *miR-338-5p*, para apontar informações sobre o envelhecimento *in vitro* das plaquetas, pois os nossos resultados mostraram que esses miRNAs são eficientes para identificar bolsas com lesões plaquetárias.

Por outro lado, as bolsas do quarto dia de armazenamento podem ser testadas utilizando a quantificação dos miRNAs *upregulated*: *miR-1304-3p*, *miR-432-5p*, *miR-411-5p*, *miR-668-3p* e *miR-939-5p*, pois esses miRNAs podem identificar as bolsas de CPs a partir do quinto dia de armazenamento que ainda apresentam plaquetas fisiologicamente normais e são viáveis para transfusão.

Portanto, os dados apresentados nesse estudo, podem ajudar a organizar um painel específicos de miRNAs para executar estratégias de testes clínicos em bancos de sangue. Considerando o número de doadores de sangue com estado de saúde sub-ótimo, do qual a bolsa de CP é composta, os miRNAs identificados nesse estudo podem ser quantificados rapidamente, antes que as bolsas de CPs sejam descartadas, o que poderá informar de maneira útil a futura tomada de decisão na governança dos bancos de sangue sobre a qualidade dos CPs.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMOHSEN, K. et al. Regulation of senescence by microRNA biogenesis factors. **Ageing research reviews**, p. 1–10, 28 jan. 2012.

ABDI, H. H. The Bonferonni and Šidák Corrections for Multiple Comparisons. **Encyclopedia of Measurement and Statistics.**, v. 1, p. 1–9, 2007.

ALZAIN, M. A. et al. Telomere Length and Accelerated Biological Aging in the China Suboptimal Health Cohort: A Case–Control Study. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 21, n. 6, p. 333–339, 2017.

AMBROS, V. A uniform system for microRNA annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2003.

AMBROSE, A. R. et al. Comparison of the release of microRNAs and extracellular vesicles from platelets in response to different agonists. **Platelets**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2017.

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, n. 10, 2010.

ANTIC, S. et al. General and MicroRNA-Mediated mRNA Degradation Occurs on Ribosome Complexes in Drosophila Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 35, n. 13, p. 2309–2320, 2015.

ÁRNASON, N. Á.; SIGURJÓNSSON, Ó. E. New strategies to understand platelet storage lesion. **ISBT Science Series**, p. 1–5, 2017.

AUDIC, S.; CLAVERIE, J. The Significance of Digital Gene Expression Profiles. **Genome Research**, v. 7, n. 10, p. 986–995, 1 out. 1997.

BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 20–51, 2018.

BARTEL, D. P.; LEE, R.; FEINBAUM, R. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Genomics: The miRNA Genes**. v. 116, p. 281–297, 2004.

BENNETT, J. S. Shedding New Light on the Platelet Storage Lesion. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 9, p. 1715–1716, set. 2016.

BHASKARAN, M.; MOHAN, M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 4, p. 759–774, 2014.

BOILARD, E.; BELLEANNÉE, C. (Dicer)phering roles of microRNA in platelets.

Blood, v. 127, n. 14, p. 1733–1734, 2016.

BONCI, D. et al. The miR-15a–miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. **Nature Medicine**, v. 14, n. 11, p. 1271–1277, 19 nov. 2008.

BONTEKOE, I. J. et al. Separation of centrifuged whole blood and pooled buffy coats using the new CompoMat G5: 3 years experience. **Vox Sanguinis**, v. 107, n. 2, p. 140–147, ago. 2014.

BOYANOVA, D. et al. PlateletWeb: a systems biological analysis of signaling networks in human platelets. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 22–35, 2011.

BRACKEN, C. P.; SCOTT, H. S.; GOODALL, G. J. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 12, p. 719–732, 2016.

BRAY, P. F. et al. The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2013.

BRUCHOVA, H.; MERKEROVA, M.; PRCHAL, J. T. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. **Haematologica**, v. 93, n. 7, p. 1009–1016, 2008.

BRUIL, A. et al. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. **Transfusion medicine reviews**, v. 9, n. 2, p. 145–66, abr. 1995.

BUENO, M. J.; MALUMBRES, M. MicroRNAs and the cell cycle. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 5, p. 592–601, 2011.

CAMPOLIM, S. Pesquisa Médica. **O admirável mundo dos microRNAs - Por Wilson Araújo da Silva Jr.**, p. 16, 2008.

CARDENAS, J. C. et al. Platelet transfusions improve hemostasis and survival in a substudy of the prospective, randomized PROPPR trial. **Blood Advances**, v. 2, n. 14, p. 1696–1704, 2018.

CAZENAVE, J.-P. et al. Progress in transfusion for storage of platelets. **Transfusion clinique et biologique: journal de la Société française de transfusion sanguine**, v. 12, n. 2, p. 226–9, 2005.

CHO, J. et al. Platelet storage induces accelerated desialylation of platelets and increases hepatic thrombopoietin production. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 199, 2018.

COOKSON, P. et al. Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored

for up to 12 days in plasma or additive solution. **Transfusion Medicine**, v. 20, n. 6, p. 392–402, dez. 2010.

CORTEZ, M. A. et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. v. 8, n. 8, p. 467–477, 2012.

CULLEN, B. R. Transcription and processing of human microRNA precursors. **Molecular Cell**, v. 16, n. 6, p. 861–865, 22 dez. 2004.

DAHIYA, N. et al. Platelet MicroRNAs: An Overview. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 29, n. 4, p. 215–219, out. 2015.

DAHIYA, N. et al. miR-570 interacts with mitochondrial ATPase subunit g (ATP5L) encoding mRNA in stored platelets. **Platelets**, v. 7104, n. September, p. 1–8, 2016.

DALY, M. E. Determinants of platelet count in humans. **Haematologica**, v. 96, n. 1, p. 10–13, 2011.

DANGWAL, S.; THUM, T. MicroRNAs in platelet biogenesis and function. **Thrombosis and haemostasis**, v. 108, n. 4, p. 599–604, out. 2012.

DANGWAL, S.; THUM, T. MicroRNAs in platelet physiology and pathology. **Hämostaseologie**, v. 33, n. 1, p. 17–20, jan. 2013.

DASGUPTA, S. K. et al. Platelet senescence and phosphatidylserine exposure. **Transfusion**, v. 50, n. 10, p. 2167–2175, 2010.

DE RIDDER, D.; DE RIDDER, J.; REINDERS, M. J. T. Pattern recognition in bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 5, p. 633–647, set. 2013.

DELOBEL, J. et al. Biomarker analysis of stored blood products: emphasis on pre-analytical issues. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 11, p. 4601–17, jan. 2010.

DENG, G. et al. MicroRNA profiling of platelets from immune thrombocytopenia and target gene prediction. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 3, p. 2835–2843, mar. 2017.

DENIS, M. M. et al. Escaping the nuclear confines: Signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. **Cell**, v. 122, n. 3, p. 379–391, 2005.

DESVIGNES, T. et al. MiRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 11, p. 613–626, 2015.

DIEHL, P. et al. Microparticles : major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. p. 633–644, 2012.

DWEEP, H.; GRETZ, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nature Methods**, v. 12, n. 8, p. 697, 2015.

EDELSTEIN, L. C.; BRAY, P. F. MicroRNAs in platelet production and activation. **Blood**, v. 117, n. 20, p. 5289–96, 19 maio 2011.

EDQM. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 5.8 Pharmacopoeial harmonisation. **European Pharmacopoeia**, p. 5617–5630, 2016.

ELGHEZNAWY, A. et al. Dicer cleavage by calpain determines platelet microRNA levels and function in diabetes. **Circulation Research**, v. 117, n. 2, p. 157–165, 2015.

FAN, X.; KURGAN, L. Comprehensive overview and assessment of computational prediction of microRNA targets in animals. **Briefings in Bioinformatics**, v. 16, n. 5, p. 780–794, 2014.

GALLOWAY, D. A. et al. Big Data Bioinformatics. v. 229, n. 12, p. 87–92, 2016.

GARRAUD, O. et al. Improving platelet transfusion safety: Biomedical and technical considerations. **Blood Transfusion**, v. 14, n. 2, p. 109–122, 2016.

GARZON, R. et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 5078–83, 28 mar. 2006.

GASTINEL, L. N. Principal Component Analysis in the Era of «Omics» Data Louis. In: **Genetic Engineering - Basics, New Applications and Responsibilities**. InTech, 2012. v. 2p. 64.

GIBBINGS, D. J. et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. v. 11, n. 9, 2009.

GOREN, Y. et al. Relation of reduced expression of mir-150 in platelets to atrial fibrillation in patients with chronic systolic heart failure. **American Journal of Cardiology**, v. 113, n. 6, p. 976–981, 2014.

GRIFFITHS-JONES, S. The microRNA Registry. **Nucleic acids research**, v. 32, n. Database issue, p. D109-11, 1 jan. 2004.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Database issue, p. D140-4, 1 jan.

2006.

GUO, L. et al. Evolutionary and Expression Analysis of miR-#-5p and miR-#-3p at the miRNAs/isomiRs Levels. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 17, n. July, 16 jul. 2014a.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 16 ago. 2014b.

HARRIES, L. W. MicroRNAs as mediators of the ageing process. **Genes**, v. 5, n. 3, p. 656–670, 2014.

HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 169, 22 dez. 2015.

HÖGMAN, C. F. Immunologic transfusion reactions. **Acta anaesthesiologica Scandinavica. Supplementum**, v. 89, p. 4–12, 1988.

HUA, K. et al. MicroRNA-23a/27a/24-2 cluster promotes gastric cancer cell proliferation synergistically. **Oncology Letters**, 7 jun. 2018.

HUNTER, M. P. et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, 2008.

IACOMINO, G. et al. Circulating microRNAs are deregulated in overweight/obese children: preliminary results of the I.Family study. **Genes & Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 7, 21 dez. 2016.

IWASAKI, S. et al. Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. **Molecular Cell**, v. 39, n. 2, p. 292–299, 30 jul. 2010.

JACKSON, S. P.; SCHOENWAELDER, S. M. **Procoagulant platelets: Are they necrotic?** **Blood**, 2010.

JAGOT, F.; DAVOUST, N. Is it worth considering circulating microRNAs in multiple sclerosis? **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. APR, p. 1–11, 2016.

JAIN, S. et al. Expression of regulatory platelet microRNAs in patients with sickle cell disease. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e60932, jan. 2013.

JANSEN, F. et al. MicroRNA Expression in Circulating Microvesicles Predicts

Cardiovascular Events in Patients With Coronary Artery Disease. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 6, p. e001249–e001249, 27 out. 2014.

KANNAN, M. et al. Membrane array-based differential profiling of platelets during storage for 52 miRNAs associated with apoptosis. **Transfusion**, v. 49, n. 7, p. 1443–1450, jul. 2009.

KATO, M.; SLACK, F. J. Ageing and the small, non-coding RNA world. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 429–435, 2013.

KAUDEWITZ, D. et al. Association of MicroRNAs and YRNAs with platelet function. **Circulation Research**, v. 118, n. 3, p. 420–432, 2016.

KIM, V. N.; NAM, J.-W. Genomics of microRNA. **Trends in genetics : TIG**, v. 22, n. 3, p. 165–73, mar. 2006.

KONDKAR, A. A. et al. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: Suggested role for platelet microRNA. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 2, p. 369–378, fev. 2010.

KONISHI, T. Principal component analysis for designed experiments. **BMC Bioinformatics**, v. 16 Suppl 1, n. Suppl 18, p. S7, 2015.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597–610, set. 2010.

KUMAR, H. et al. Leucodepletion and Blood Products. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 62, n. 2, p. 174–177, 2006.

LAFFONT, B. et al. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2-microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. **Blood**, v. 122, n. 2, p. 253–261, 11 jul. 2013.

LANDRY, P. et al. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 9, p. 961–966, 9 set. 2009.

LEBOIS, M.; JOSEFSSON, E. C. Regulation of platelet lifespan by apoptosis. **Platelets**, v. 27, n. 6, p. 497–504, 2016.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–54, 3 dez. 1993.

LIN, K. H. et al. Mechanisms of resveratrol-induced platelet apoptosis. p. 575–585,

2009.

LINDSAY, C. R.; EDELSTEIN, L. C. MicroRNAs in Platelets Physiology and Function. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 42, n. 1, p. 215–222, 2016.

LIU, H. et al. Improving performance of mammalian microRNA target prediction. **BMC bioinformatics**, v. 11, p. 476, jan. 2010.

LIUMBRUNO, G. M. Proteomics: Applications in transfusion medicine. **Blood Transfusion**, v. 6, n. 2, p. 70–85, 2008.

LUJAMBIO, A.; LOWE, S. W. The microcosmos of cancer. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 347–55, 16 fev. 2012.

MANASA, K.; VANI, R. Influence of oxidative stress on glial GFAP-expression. v. 2016, n. July, 2010.

MANGOLINI, A. et al. Differential expression of microRNA501-5p affects the aggressiveness of clear cell renal carcinoma. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 952–965, 2014.

MARCO, A. et al. Clusters of microRNAs emerge by new hairpins in existing transcripts. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 16, p. 7745–7752, set. 2013.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2011.

MATAMALA, N. et al. Tumor MicroRNA Expression Profiling Identifies Circulating MicroRNAs for Early Breast Cancer Detection. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1098–1106, 1 ago. 2015.

MAUÉS, J. H. DA S. et al. Differential Expression Profile of MicroRNAs During Prolonged Storage of Platelet Concentrates As a Quality Measurement Tool in Blood Banks. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 22, n. 10, p. omi.2018.0126, 2018.

MAUSE, S. F.; WEBER, C. Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1047–1057, 2010.

MENDES, N. D.; FREITAS, A. T.; SAGOT, M.-F. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 8, p. 2419–2433, 1 maio 2009.

METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W566-70, 2015.

MICHAEL, J. V. et al. Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. **Blood**, v. 130, n. 5, p. 567–580, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. **Technical Regulation of Hemotherapy Procedures, Portaria MS nº 1.353, de 13.06.2011**, 2012.

MITCHELL, A. J. et al. Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. n. September, p. 1–11, 2016.

MITTAL, K.; KAUR, R. Platelet storage lesion: An update. **Asian journal of transfusion science**, v. 9, n. 1, p. 1–3, 2015.

MOHANTY, D. Current concepts in platelet transfusion. **Asian journal of transfusion science**, v. 3, n. 1, p. 18–21, jan. 2009.

MONTEYS, A.; SPENGLER, R.; WAN, J. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. **Rna**, p. 495–505, 2010.

MORIN, R. D. et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. **Genome research**, v. 18, n. 4, p. 610–21, abr. 2008.

MOTAMENY, S. et al. Next Generation Sequencing of miRNAs – Strategies, Resources and Methods. **Genes**, v. 1, n. 1, p. 70–84, 3 jun. 2010.

MUNDT, J. M. et al. Chemical and Biological Mechanisms of Pathogen Reduction Technologies. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, n. 5, p. 957–964, 2014.

MURPHY, S.; GARDNER, F. H. Platelet storage at 22 degrees C; metabolic, morphologic, and functional studies. **The Journal of clinical investigation**, v. 50, n. 2, p. 370–377, 1971.

NAGALLA, S. et al. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5189–97, 12 maio 2011.

NAVARRO SILVERA, S. A. et al. Principal component analysis of dietary and lifestyle patterns in relation to risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. **Annals of epidemiology**, v. 21, n. 7, p. 543–50, 7 jul. 2011.

OSMAN, A. et al. Effects of pathogen reduction systems on platelet microRNAs,

mRNAs, activation, and function. **Platelets**, v. 26, n. 2, p. 154–63, 2015.

PASQUINELLI, A E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86–9, 2 nov. 2000.

PLÉ, H. et al. The repertoire and features of human platelet microRNAs. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e50746, jan. 2012.

PONTES, T. B. et al. The miRNA Profile of Platelets Stored in a Blood Bank and Its Relation to Cellular Damage from Storage. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129399, 29 jun. 2015.

PRITCHARD, C. C.; CHENG, H. H.; TEWARI, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 358–369, 1 maio 2012.

PROJAHN, D.; KOENEN, R. R. Platelets: key players in vascular inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 6, p. 1167–75, dez. 2012.

RAJAPAKSE, J. C.; WONG, L.; ACHARYA, R. Pattern recognition in bioinformatics: an introduction. v. 2016, p. 1–3, 2006.

RATAJCZAK, J. et al. Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia**, v. 20, n. 9, p. 1487–1495, 2006.

RAVI, S. et al. Defining the effects of storage on platelet bioenergetics: The role of increased proton leak. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 11, p. 2525–2534, 2015.

RISITANO, A. et al. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. **Blood**, v. 119, n. 26, p. 6288–6295, 2012.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2009.

ROMERO-CORDOBA, S. et al. Identification and Pathway Analysis of microRNAs with No Previous Involvement in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e31904, 16 mar. 2012.

ROMUALDI, C. et al. IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. **Physiological genomics**, v. 12, n. 2, p. 159–162, 2003.

ROWLEY, J. W. et al. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. **Blood**, v. 118, n. 14, p. e101-11, 6 out. 2011.

ROWLEY, J. W. et al. Dicer1-mediated miRNA processing shapes the mRNA profile and function of murine platelets. v. 127, n. 14, p. 1743–1752, 2016.

RUTNAM, Z. J.; WIGHT, T. N.; YANG, B. B. MiRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. **Matrix Biology**, v. 32, n. 2, p. 74–85, 2013.

SAITO, T.; SÆTROM, P. A two-step site and mRNA-level model for predicting microRNA targets. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 612, jan. 2010.

SAUNDERS, C. et al. Impact of glucose and acetate on the characteristics of the platelet storage lesion in platelets suspended in additive solutions with minimal plasma. p. 1–10, 2013.

SCHUBERT, P.; DEVINE, D. V. Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways. **Blood Transfusion**, v. 8, n. SUPPL. 3, p. 69–72, 2010a.

SCHUBERT, P.; DEVINE, D. V. Proteomics meets blood banking: identification of protein targets for the improvement of platelet quality. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 3, p. 436–44, 3 jan. 2010b.

SCHUBERT, P.; DEVINE, D. V. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. **Vox Sanguinis**, v. 99, n. 2, p. 112–122, 21 mar. 2010c.

SCHUBERT, S.; WEYRICH, A. S.; ROWLEY, J. W. Review Article A tour through the transcriptional landscape of platelets. v. 124, n. 4, p. 493–502, 2014.

SCHWERTZ, H. et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 11, p. 2433–2440, 2006.

SCHWERTZ, H. et al. Anucleate platelets generate progeny. **Blood**, v. 115, n. 18, p. 3801–3809, 2010.

SEYEDNASROLLAH, F.; LAIHO, A.; ELO, L. L. Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. **Briefings in Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 59–70, 2013.

SHRIVASTAVA, M. The platelet storage lesion. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 41, n. 2, p. 105–113, out. 2009.

SLACK, F. J.; WEIDHAAS, J. B. miRNA modulation of cellular stress response.pdf. v. 4, p. 289–298, 2008.

SONG, M.-Y. et al. Identification of Serum MicroRNAs as Novel Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Gastric Cancer. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33608, jan. 2012.

SUN, Y. V.; HU, Y. J. **Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases**. Elsevier Ltd, 2016. v. 93

SUN, Z. et al. CAP-miRSeq: A comprehensive analysis pipeline for microRNA sequencing data. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2014.

SUNDERLAND, N. et al. MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity: The Clot Thickens. **Circulation Research**, v. 120, n. 2, p. 418–435, 2017.

SUT, C. et al. The Non-Hemostatic Aspects of Transfused Platelets. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. February, 2018.

THIELE, T. et al. Transfusion medicine and proteomics. Alliance or coexistence? **Blood Transfusion**, v. 8, n. SUPPL. 3, p. s16-25, jun. 2010.

URBICH, C.; KUEHBACHER, A.; DIMMELER, S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. **Cardiovascular research**, v. 79, n. 4, p. 581–8, 1 set. 2008.

USMAN ALI, M. et al. Using PCA and Factor Analysis for Dimensionality Reduction of Bio-informatics Data. **(IJACSA) International Journal of Advanced Computer Science and Applications**, v. 8, n. 5, p. 415–426, 2017.

VAN DER MEER, P. F. Platelet concentrates, from whole blood or collected by apheresis? **Transfusion and apheresis science: official journal of the World Apheresis Association: official journal of the European Society for Haemapheresis**, v. 48, n. 2, p. 129–31, abr. 2013.

VASCONCELOS, E.; FIGUEIREDO, A. C.; SEGATCHIAN, J. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and Apheresis. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 29, n. 1, p. 13–16, ago. 2003.

VASSALLO, R. R. Preparation, Preservation, and Storage of Platelet Concentrates. In: **Rossi's Principles of Transfusion Medicine**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009. p. 187–198.

VILLARROEL, J. P. P. et al. Increased platelet storage time is associated with mitochondrial dysfunction and impaired platelet function. **Journal of Surgical**

Research, v. 184, n. 1, p. 422–429, 2013.

WEYRICH, A. S. Platelet mRNA: the meaning behind the message. p. 385–391, 2012.

WINTER, J. et al. Loop-miRs: Active microRNAs generated from single-stranded loop regions. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 10, p. 5503–5512, 2013.

YADDANAPUDI, S.; YADDANAPUDI, L. Indications for blood and blood product transfusion. **Indian journal of anaesthesia**, v. 58, n. 5, p. 538–42, set. 2014.

YAN, Y. et al. The role of microRNAs in platelet biology during storage. **Transfusion and Apheresis Science**, p. 1–4, 2016.

YU, S. et al. Detection of apoptosis-associated microRNA in human apheresis platelets during storage by quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. **Blood transfusion = Trasfusione del sangue**, p. 1–7, 5 jun. 2014.

YU, S. et al. miR-326 Targets Antiapoptotic Bcl-xL and Mediates Apoptosis in Human Platelets. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0122784, 2015.

YU, X. et al. Profiling IgG N-glycans as potential biomarker of chronological and biological ages: A community-based study in a Han Chinese population. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 28, p. 1–12, 2016.

ZHAO, L. et al. Protein kinase A determines platelet life span and survival by regulating apoptosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 12, p. 4338–4351, 2017.

9.1 Apêndices

TABELA SUPLEMENTAR 1. Resultados do processamento dos dados das seis bibliotecas que foram sequenciadas com NGS

Amostras		Total Reads	*Trimmed reads	Filtrado (<17bps)	Reads submetidas Para alinhamento	Reads alinhados	Reads pre-miRNA	Reads miRNA maduro	miRNA conhecidos com $\geq 5x$ cobertura	miRNA maduro
1º dia	GSM1515807	16.212.635	15.179.341 (93.6%)	648.689 (4.0%)	15.563.946	14.400.185 (88.82%)	1.273.327	5.288.808	612	807
2º dia	GSM1515808	13.594.963	12.594.629 (92.6%)	748.061 (5.5%)	12.846.902	11.776.486 (86.62%)	1.318.186	3.428.769	565	739
3º dia	GSM1515809	17.214.842	16.110.892 (93.5%)	96.66.535 (2.1%)	7.548.307	15.376.873 (89.32%)	1.235.562	3.314.392	571	737
4º dia	GSM1515810	25.325.847	23.520.798 (92.8%)	608.296 (2.4%)	24.717.551	21.653.492 (85.50%)	1.442.130	2.242.834	545	704
5º dia	GSM1515811	16.161.626	14.946.449 (92.8%)	724.773 (4.5%)	15.436.853	13.449.028 (83.22%)	1.122.239	1.221.476	495	622
7º dia	GSM1515812	28.515.834	26.205.734 (91.8%)	17.12.793 (6.0%)	26.803.041	24.231.714 (84.98%)	1.275.954	3.064.272	630	810

* *Trimmed reads* = sequências com adaptadores removidos.

TABELA SUPLEMENTAR 1. Categoria dos reads

Categoria dos reads							
Valores absolutos							
Nome da amostra	Total	miRNA	rRNA	tRNA	mRNA	ncRNA	Desconhecidos
1º dia	14.400.185	5.228.808	195.702	75.829	284.204	7.737.603	878.039
2º dia	11.776.486	3.428.769	335.431	238.434	376.773	6.580.321	816.758
3º dia	15.376.873	3.314.392	668.372	935.060	429.999	8.670.676	1.358.374
4º dia	21.653.492	2.242.834	922.755	573.915	486.925	15.852.465	1.574.598
5º dia	13.449.028	1.221.476	1.033.028	685.316	479.741	8.881.360	1.148.107
7º dia	24.231.714	3.064.272	1.508.336	1.539.943	938.082	14.850.010	2.331.071
Valores relativos							
Nome da amostra	miRNA	rRNA	tRNA	mRNA	ncRNA	Desconhecidos	
1º dia	36.31%	1.36%	0.53%	1.97%	53.73%	6.10%	
2º dia	29.12%	2.85%	2.02%	3.20%	55.88%	6.94%	
3º dia	21.55%	4.35%	6.08%	2.80%	56.39%	8.83%	
4º dia	10.36%	4.26%	2.65%	2.25%	73.21%	7.27%	
5º dia	9.08%	7.68%	5.10%	3.57%	66.04%	8.54%	
7º dia	12.65%	6.22%	6.36%	3.87%	61.28%	9.62%	

TABELA SUPLEMENTAR 2. Os resultados da quantidade de miRNAs precursores e maduros estão no *supplementary table2* do link: <https://www.liebertpub.com/doi/suppl/10.1089/omi.2018.0126>

TABELA SUPLEMENTAR 3. Figura das comparações feitas com diagrama de *venn* para identificar miRNAs comuns entre duas amostras. os miRNAs marcados em verde são aqueles identificados na região da sobreposição do diagrama.



TABELA SUPLEMENTAR 4. os miRNAs diferencialmente expressos podem ser consultados no material suplementar *supplementary table4*, do link: <https://www.liebertpub.com/doi/suppl/10.1089/omi.2018.0126>

(1) -std. represents normalized expression level of miRNA in a sample. Normalized expression = Actual miRNA count/Total count of clean reads*1,000,000.

(2)To calculate the fold-change with the number of reads zero, the common method is to put the normalized read as 0.01.

(3)To filter to get the ideal quantities, there are same methods.

**** The absolute value of Log₂ (FC) >1 or Log₂ (FC) < -1, and 0.01 ≤ P-value < 0.05.

**** The absolute value of Log₂ (FC) >1 or Log₂ (FC) < -1, and P-value ≤ 0.01.

(FC) Fold change = Log₂(Non-control std./Control std.)

(DE): Differential expression

1st vs 2nd							1st vs 3rd							1st vs 4th							
Id-miRNA	Sequencing count	Normalized expression		Fold-change: Log ₂ (2nd/1st)	P-value	Sig-lable	name	Sequencing count	Normalized expression		ld-change: Log ₂ (3rd/1)	P-value	Sig-lable	name	Sequencing count	Normalized expression		ld-change: Log ₂ (4			
1st-day	2nd-day	1st-day-std	2nd-day-std				1st-day	3rd-day	1st-day-std	3rd-day-				1st-day	4th-day	1st-day-std	4th-day-				
miR-100	34.83	8.26	27.35	6.27	-3.37	0.01662	**	miR-1304	51.93	251.33	40.78	203.41	2.32	0.00000	**	let-7a-1	158.95	470.12	124.83	326.01	1.38
miR-1185-1	3.80	11.57	2.98	8.78	-3.16	0.00000	*	miR-145	3.17	0.85	2.49	0.69	-1.85	0.00453	*	let-7a-2	17.73	85.36	13.93	59.20	2.09
miR-1271	107.02	12.39	84.05	9.40	-3.02	0.00000	**	miR-150	3618.46	326.30	2841.82	264.09	-3.43	0.00000	**	let-7b	76258.72	232478.10	59891.18	161215.82	1.43
miR-1296	132.35	61.97	103.94	47.01	-2.37	0.04594	**	miR-183	55.09	16.19	43.27	13.10	-1.72	0.00000	**	let-7c	1789.60	4986.98	1405.49	3458.31	1.30
miR-1304	51.93	321.40	40.78	243.83	2.58	0.00000	**	miR-26a-1	16.46	6.82	12.93	5.52	-1.23	0.05688	*	let-7f-1	100.69	244.96	79.08	169.87	1.10
miR-145	257.74	128.89	202.42	97.78	-2.13	0.00005	**	miR-331	27.86	6.82	21.88	5.52	-1.99	0.00092	**	miR-103a-1	4.43	0.00	3.48	0.01	-8.44
miR-150	3618.46	461.03	2841.82	349.76	-2.08	0.03883	**	miR-338	3.80	0.85	2.98	0.69	-2.11	0.00000	**	miR-103a-2	50.03	17.32	39.29	12.01	-1.71
miR-154	11.40	24.79	8.95	18.80	-2.07	0.00000	*	miR-3678	1.90	0.85	1.49	0.69	-5.34	0.00000	**	miR-107	635.16	324.14	498.84	224.78	-1.15
miR-183	55.09	18.18	43.27	13.79	-2.04	0.00366	**	miR-3687	4.43	11.08	3.48	8.96	-3.43	0.00000	**	miR-10a	5873.51	2391.43	4612.87	1658.37	-1.48
miR-188	1.27	7.44	0.99	5.64	-1.92	0.00092	*	miR-376a-1	3.17	0.00	2.49	0.01	-3.34	0.01177	*	miR-1180	13.30	38.35	10.44	26.60	1.35
miR-190a	5.70	14.87	4.48	11.28	-1.89	0.00000	*	miR-376b	1.27	0.00	0.99	0.01	-3.23	0.01725	*	miR-1226	122.85	39.59	96.48	27.45	-1.81
miR-19a	57.63	17.35	45.26	13.16	-1.87	0.01955	**	miR-3942	1.27	0.00	0.99	0.01	-2.34	0.03451	*	miR-1227	24.06	11.13	18.90	7.72	-1.29
miR-204	43.06	21.48	33.82	16.30	-1.78	0.00000	*	miR-411	0.63	1.70	0.50	1.38	1.47	0.00157	*	miR-1236	1.27	9.90	0.99	6.86	2.79
miR-26a-1	16.46	7.44	12.93	5.64	-1.20	0.00036	**	miR-4286	0.63	0.00	0.50	0.01	-2.14	0.00003	**	miR-126	7564.95	20733.53	5941.27	14378.02	1.28
miR-29a	196.94	81.80	154.67	62.05	-1.67	0.01059	**	miR-432	3970.56	10281.58	3118.35	8321.38	1.42	0.00000	**	miR-1271	107.02	6.19	84.05	4.29	-4.29
miR-29b-2	19.63	4.96	15.42	3.76	-1.67	0.00160	**	miR-4443	3.17	11.93	2.49	9.65	-2.11	0.00000	**	miR-1287	21.53	0.00	16.91	0.01	-10.72
miR-3161	20.26	6.61	15.92	5.01	-1.65	0.00002	*	miR-4489	2.53	0.85	1.99	0.69	-2.11	0.02200	*	miR-1292	16.46	2.47	12.93	1.72	-2.91
miR-3175	8.23	1.65	6.47	1.25	-1.50	0.03840	*	miR-4497	7.60	16.19	5.97	13.10	-1.99	0.00039	**	miR-1296	132.35	51.96	103.94	36.03	-1.53
miR-3176	10.13	2.48	7.96	1.88	-1.46	0.00000	*	miR-4498	0.63	5.11	0.50	4.14	-1.85	0.00453	**	miR-1304	51.93	221.45	40.78	153.57	1.91
miR-331	3.80	1.65	2.98	1.25	-1.25	0.00423	*	miR-4516	12.03	46.86	9.45	37.92	-1.82	0.00000	**	miR-142	3763.48	13708.95	2955.72	9506.70	1.69
miR-337	17.10	40.48	13.43	30.71	-1.34	0.00000	**	miR-451a	2213.25	934.61	1738.22	756.43	-1.20	0.00000	**	miR-144	9.50	23.51	7.46	16.30	1.13
miR-338	329.30	123.93	258.62	94.02	-1.34	0.00630	**	miR-4523	1.27	5.11	0.99	4.14	-1.72	0.00000	**	miR-145	257.74	74.23	202.42	51.48	-1.98
miR-342	2118.90	939.40	1664.11	712.69	-1.32	0.00000	**	miR-4532	4.43	26.41	3.48	21.38	-1.72	0.00000	**	miR-1468	46.86	150.93	36.80	104.67	1.51
miR-3613	27.86	6.61	21.88	5.01	-1.25	0.00000	**	miR-4649	0.63	0.00	0.50	0.01	-1.64	0.00009	**	miR-150	3618.46	580.23	2841.82	402.37	-2.82
miR-3653	8.23	0.83	6.47	0.63	-1.22	0.00000	*	miR-4656	1.27	2.56	0.99	2.07	-1.63	0.01133	*	miR-152	366.66	186.81	287.96	129.55	-1.15
miR-369	6.97	18.18	5.47	13.79	-1.14	0.00000	*	miR-4659b	11.40	4.26	8.95	3.45	-1.57	0.00939	**	miR-16-2	19.00	87.84	14.92	60.91	2.03
miR-3691	15.83	5.78	12.43	4.39	-1.13	0.00000	*	miR-4661	4.43	1.70	3.48	1.38	-1.57	0.00000	**	miR-183	366.66	186.81	287.96	129.55	-1.15
miR-379	50.66	115.67	39.79	87.75	-1.11	0.01136	**	miR-4732	0.63	1.70	0.50	1.38	-1.53	0.01229	*	miR-187	11.40	3.71	8.95	2.57	-1.80
miR-3940	27.23	7.44	21.39	5.64	-1.07	0.00000	**	miR-4741	10.77	22.15	8.45	17.93	-1.51	0.00002	**	miR-18a	189.35	40.83	148.71	28.31	-2.39
miR-411	31.03	77.66	24.37	58.92	1.27	0.00000	**	miR-4743	3.17	6.82	2.49	5.52	-1.35	0.00000	**	miR-1908	1108.84	3643.43	870.85	2526.60	1.54
miR-432	661.13	1662.34	519.23	1261.15	1.28	0.00000	**	miR-4758	1.27	2.56	0.99	2.07	-1.24	0.00000	**	miR-190a	5.70	24.74	4.48	17.16	1.94
miR-433	661.13	1662.34	519.23	1261.15	-1.05	0.00000	**	miR-4761	0.63	0.00	0.50	0.01	-1.23	0.01857	*	miR-1914	15.83	0.00	12.43	0.01	-10.28
miR-4443	3.17	24.79	2.49	18.80	1.07	0.02109	**	miR-4766	0.63	0.00	0.50	0.01	-1.20	0.00000	**	miR-192	702.29	385.99	551.55	267.67	-1.04

Imagem ilustrativa da Tabela Suplementar 4.

TABELA SUPLEMENTAR 5.1. Estimativa das expressões dos precursores de miRNAs.

Número de reads (RPM) pre-miRNAs						
Pre-miRNAs	Primeiro dia	Segundo dia	Terceiro dia	Quarto dia	Quinto dia	Sétimo dia
miRNAs Downregulated						
miR-145	257.74	128.89	234.29	74.23	60.02	31.30
miR-150	3618.46	461.03	326.30	580.23	1063.80	326.19
miR-183	55.09	18.18	16.19	37.11	20.70	18.95
miR-26a-1	143.12	112.36	94.57	21.03	47.60	10.71
miR-331	1763.64	1529.32	1524.18	217.74	380.81	314.66
miR-338	329.30	123.93	165.28	30.93	62.09	63.43
miR-451a	2213.25	960.06	934.61	447.85	2009.62	341.84
miR-501	748.52	184.25	205.32	97.74	101.41	112.02
miR-99b	28068.09	7844.89	9183.39	5535.05	5610.80	5743.72
Total:	37.197.20	11.362.90	12.684.14	7.041.90	9.356.85	6.962.81
Total: 84.605.80 RPM						

miRNAs Upregulated						
miR-1304	51.93	321.40	251.33	221.45	91.06	151.56
miR-411	31.03	77.66	28.12	118.77	142.81	76.60
miR-432	3970.56	7491.27	10281.58	21157.88	11958.38	14863.01
miR-668	29.76	69.40	67.31	60.62	53.81	63.43
miR-939	51.93	107.41	138.02	300.63	227.66	249.58
Total:	4.135.20	8.067.14	10.766.35	21.859.35	12.473.72	15.404.18
Total: 72.705.95 RPM						

TABELA SUPLEMENTAR 5.2. Estimativa das expressões de miRNAs maduros.

Número de reads (RPM*) mature-miRNAs.						
Mature-miRNAs	Primeiro dia	Segundo dia	Terceiro dia	Quarto dia	Quinto dia	Sétimo dia
miRNAs Downregulated						
miR-145-5p	69.1	38.1	77.1	18.1	19.1	9.1
miR-150-5p	782.1	107.1	70.1	104.1	258.1	55.1
miR-183-5p	13.1	5.1	4.1	9.1	6.1	6.1
miR-26a-5p	9353.2	9840.2	7019.2	18514.2	15458.2	13368.2
miR-331-3p	495.1	505.1	507.1	65.1	138.1	107.1
miR-338-5p	71.1	28.1	38.1	6.1	8.1	7.1
miR-451a	525.1	261.1	262.1	135.1	617.1	107.1
miR-501-3p	193.1	42.1	50.1	29.1	28.1	34.1
miR-99b-5p	7527.1	2411.1	2835.1	1683.1	1893.1	1819.1
Total:	19.029.0	13.238.0	10.863.0	20.564.0	18.426.0	15.513.0
Total: 97.633.0 RPM						

miRNAs Upregulated						
miR-1304-3p	11.1	107.1	94.1	65.1	22.1	38.1
miR-411-5p	8.1	21.1	7.1	34.1	46.1	26.1
miR-432-5p	1104.1	2430.1	3397.1	7040.1	4383.1	5468.1
miR-668-3p	3.1	14.1	13.1	15.1	9.1	13.1
miR-939-5p	12.1	31.1	39.1	86.1	71.1	84.1
Total:	1.138.5	2.603.5	3.550.5	7.240.5	4.531.5	5629.5
Total: 24.694.0 RPM						

*RPM: Reads por milhão.

TABELA SUPLEMENTAR 6. Validação da expressão dos miRNAs em 100 unidades de CP.

miRNAs	Segundo/Primeiro			Terceiro/Primeiro			Quarto/Primeiro			Quinto/Primeiro			Sétimo/Primeiro		
	Média	SD	N	Média	SD	N	Média	SD	N	Média	SD	N	Média	SD	N
miR-145-5p	0.91	0.04	100	0.88	0.03	100	0.79	0.03	100	0.64	0.02	100	0.58	0.01	100
miR-150-5p	0.76	0.03	100	0.70	0.07	100	0.59	0.03	100	0.55	0.03	100	0.48	0.02	100
miR-183-5p	0.88	0.03	100	0.77	0.03	100	0.75	0.03	100	0.63	0.02	100	0.60	0.03	100
miR-26a-5p	0.92	0.03	100	0.90	0.04	100	0.76	0.08	100	0.64	0.03	100	0.57	0.03	100
miR-331-3p	0.92	0.02	100	0.90	0.03	100	0.76	0.03	100	0.61	0.01	100	0.55	0.01	100
miR-338-5p	0.85	0.03	100	0.80	0.01	100	0.68	0.02	100	0.59	0.01	100	0.55	0.04	100
miR-451a	0.87	0.08	100	0.77	0.02	100	0.73	0.03	100	0.66	0.03	100	0.60	0.03	100
miR-501-3p	0.82	0.03	100	0.75	0.03	100	0.65	0.03	100	0.56	0.02	100	0.50	0.02	100
miR-99b-5p	0.84	0.03	100	0.81	0.03	100	0.69	0.03	100	0.61	0.03	100	0.55	0.03	100
miR-1304-3p	1.00	0.03	100	0.96	0.01	100	0.86	0.02	100	0.76	0.03	100	0.73	0.03	100
miR-411-5p	0.98	0.03	100	0.92	0.02	100	0.80	0.01	100	0.70	0.02	100	0.66	0.04	100
miR-432-5p	0.94	0.03	100	0.94	0.04	100	0.82	0.02	100	0.74	0.03	100	0.71	0.04	100
miR-668-3p	0.97	0.04	100	0.94	0.02	100	0.81	0.03	100	0.68	0.01	100	0.62	0.03	100
miR-939-5p	0.96	0.02	100	0.95	0.02	100	0.78	0.01	100	0.69	0.02	100	0.67	0.02	100

SD: Desvio Padrão;
N: Número de amostras

TABELA SUPLEMENTAR 7: Consulta *in silico* dos genes-alvos regulados pelos miRNAs *DOWN/UPREGULATED* e preditos com *mirwalk* e *plateletweb*.

Predição de alvos de miRNAs com *miRWalk*

miRNAs Downregulated:								
miR-145-5p	miR-150-5p	miR-183-5p	miR-26a-5p	miR-331-3p	miR-338-5p	miR-451a	miR-501-3p	miR-99b-5p
ATP13A2	ATP6V1H	ATP13A3	ATP10A	ATP5D	ATP13A4	ATP4B	AKT3	FOXO3
ATP5S	EGR2	ATP2C1	CRADD	EGFR	ATP1B4			
		ATPIF1	FLT1	ATP7B				
		CASP2	KRAS					
			PAK1					
			RHBDF1					
			TNK2					
			ATP11C					
			ATP1A2					
			ATP5G3					

miRNAs Upregulated:				
miR-1304-3p	miR-411-5p	miR-432-5p	miR-668-3p	miR-939-5p
ATP2C1	ATP2C1	CASP2	CASP2	ATPAF2

9.2 Predição de alvos de miRNAs com *PlateletWeb*

miRNAs *Downregulated* que regulam genes: Interação ATPase Mitochondrial

Platelet Interactome	Systems	Gene Symbol	Description
ATP1A2	PlateletWeb	ATP1A2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide 1 total interacting proteins 1 platelet interacting proteins
		SLCO1A2	ethanolamine kinase 2 1 total interacting proteins 1 platelet interacting proteins
ATP4B	PlateletWeb	ATP4B	ATPase, H ⁺ /K ⁺ exchanging, beta polypeptide 1 total interacting proteins 1 platelet interacting proteins
ATP5G3	PlateletWeb	ATP5G3	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C3 (subunit 9) 2 total interacting proteins 1 platelet interacting proteins
ATP6V1H	PlateletWeb	ATP6V1H	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 50/57kDa, V1 subunit H 2 total interacting proteins 2 platelet interacting proteins
ATP7B	PlateletWeb	ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide 5 total interacting proteins 1 platelet interacting proteins
ATPIF1	PlateletWeb	ATPIF1	ATPase inhibitory factor 1 3 total interacting proteins 2 platelet interacting proteins

miRNAs *Downregulated* que regulam genes que regulam Apoptose

Platelet Interactome	Systems	Gene Symbol	Description
AKT3	PlateletWeb	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma) 6 total interacting proteins 5 platelet interacting proteins
CASP2	PlateletWeb	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase 29 total interacting proteins 13 platelet interacting proteins
		CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain 9 total interacting proteins 2 platelet interacting proteins
EGFR	PlateletWeb	EGFR	epidermal growth factor receptor 256 total interacting proteins 159 platelet interacting proteins
		GRB2	growth factor receptor-bound protein 2 271 total interacting proteins 131 platelet interacting proteins
		FLT4	fms-related tyrosine kinase 4 13 total interacting proteins 8 platelet interacting proteins
		FLT1	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor) 24 total interacting proteins 19 platelet interacting proteins
		KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase) 45 total interacting proteins 29 platelet interacting proteins
		RHBDF1	rhomboid 5 homolog 1 (Drosophila) 1 total interacting proteins

		CLEC14A	C-type lectin domain family 14, member A -
EGR2	PlateletWeb	EGR2	early growth response 2 7 total interacting proteins 1 platelet interacting proteins
FOXO3	PlateletWeb	FOXO3	orkhead box O3 33 total interacting proteins 21 platelet interacting proteins
KRAS	PlateletWeb	KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog 17 total interacting proteins 12 platelet interacting proteins
PAK1	PlateletWeb	PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1 88 total interacting proteins 45 platelet interacting proteins
		PKN1	protein kinase N1 27 total interacting proteins 13 platelet interacting proteins
		PAK1IP1	PAK1 interacting protein 1 2 total interacting proteins 1 platelet interacting proteins
		CRIPAK	cysteine-rich PAK1 inhibitor 1 total interacting proteins 1 platelet interacting proteins
TNK2	PlateletWeb	TNK2	tyrosine kinase, non-receptor, 2 22 total interacting proteins 9 platelet interacting proteins
		ETNK2	ethanolamine kinase 2 1 total interacting proteins

miRNAs *Upregulated* que regulam genes: Interação ATPase Mitochondrial

Platelet Interactome	Systems	Gene Symbol	Description
ATP2B3	PlateletWeb	TNK2	tyrosine kinase, non-receptor, 2 22 total interacting proteins 9 platelet interacting proteins
		ETNK2	ethanolamine kinase 2 1 total interacting proteins
ATP2C1	PlateletWeb	ATP2C1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1 -
ATPAF2	PlateletWeb	ATPAF2	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2 2 total interacting proteins 2 platelet interacting proteins

miRNAs *Upregulated* que regulam genes que regulam Apoptose

Platelet Interactome	Systems	Gene Symbol	Description
CASP2	PlateletWeb	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase 29 total interacting proteins 13 platelet interacting proteins
		CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain 9 total interacting proteins 2 platelet interacting proteins

ANEXO A. ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO À TESE

**The miRNA Profile of Platelets Stored in a Blood Bank and Its Relation to
Cellular Damage from Storage**

ANEXO B. ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO À TESE

Differential Expression Profile of MicroRNAs During Prolonged Storage of Platelet Concentrates. As a Quality Measurement Tool in Blood Banks

RESEARCH ARTICLE

The miRNA Profile of Platelets Stored in a Blood Bank and Its Relation to Cellular Damage from Storage

Thaís Brilhante Pontes¹✉, Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes¹✉, Jersey Heitor da Silva Maués¹, Letícia Martins Lamarão², José Alexandre Rodrigues de Lemos^{2,3}, Raquel Carvalho Montenegro¹, Rommel Mário Rodriguez Burbano^{1*}

1 Laboratory of Human Cytogenetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, PA, 66075110, Brazil, **2** Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Foundation Center for Hemotherapy and Hematology of Pará (HEMOPA), Belém, PA, 66033–000, Brazil, **3** Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, PA, 66075110, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* rommel@ufpa.br



OPEN ACCESS

Citation: Pontes TB, Moreira-Nunes CdFA, Maués JHdS, Lamarão LM, de Lemos JAR, Montenegro RC, et al. (2015) The miRNA Profile of Platelets Stored in a Blood Bank and Its Relation to Cellular Damage from Storage. PLoS ONE 10(6): e0129399. doi:10.1371/journal.pone.0129399

Editor: Dermot Cox, Royal College of Surgeons, IRELAND

Received: July 22, 2014

Accepted: May 7, 2015

Published: June 29, 2015

Copyright: © 2015 Pontes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper. All miRNAs sequences of platelets are available in the NCBI Gene Expression Omnibus (GSE61856).

Funding: This paper was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, to RMRB), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA, to RMRB), the Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Pará (HEMOPA, to CFAMN and LML) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, TBP).

Abstract

Millions of blood products are transfused each year, and many lives are directly affected by transfusion. Platelet concentrate (PC) is one of the main products derived from blood. Even under good storage conditions, PC is likely to suffer cell damage. The shape of platelets changes after 5 to 7 days of storage at 22°C. Taking into consideration that some platelet proteins undergo changes in their shape and functionality during PC storage. Sixteen PC bags were collected and each PC bag tube was cut into six equal pieces to perform experiments with platelets from six different days of storage. Thus, on the first day of storage, 1/6 of the tube was used for miRNA extraction, and the remaining 5/6 was stored under the same conditions until extraction of miRNAs on each the following five days. Samples were sequenced on an Illumina Platform to demonstrate the most highly expressed miRNAs. Three miRNAs, mir127, mir191 and mir320a were validated by real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in 100 PC bags tubes. Our method suggests, the use of the miRNAs mir127 and mir320a as biomarkers to assess the "validity period" of PC bags stored in blood banks for long periods. Thus, bags can be tested on the 5th day of storage for the relative expression levels of mir127 and mir320a. Thus, we highlight candidate miRNAs as biomarkers of storage damage that can be used as tools to evaluate the quality of stored PC. The use of miRNAs as biomarkers of damage is unprecedented and will contribute to improved quality of blood products for transfusions.

Introduction

In 2012, there were over 3.6 million blood donations and 3.1 million blood transfusions performed in Brazil [1]. Many lives are affected by transfusions, and there is a growing need to

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

improve the tools and strategies that assess the quality of transfusion products during production and handling, thereby ensuring safety and efficacy for patient health [2].

Platelet concentrate (PC) is one of the main components used for transfusion medicine. Platelets are small, anucleate cells derived from cytoplasmic fragmentation of megakaryocytes in the bone marrow. When stimulated, platelets participate in clotting both through their physical shape and by releasing clotting factors. Thus, they are essential for maintaining homeostasis and vascular integrity and are activated by exposed collagen in the endothelium of damaged blood vessels [3–4].

PC transfusion is an important medical procedure for patients undergoing major surgery or high-dose chemotherapy and patients with thrombocytopenia [5]. Clinical indications for platelet transfusion are to prevent or control bleeding in patients with thrombocytopenia or, less often, in patients with thrombocytopathy [6].

PC is composed of a suspension of platelets in plasma, which is prepared by double centrifugation of a unit of whole blood (WB) or by apheresis, a method that selectively removes only this component from the donor [5,7]. Each component obtained from WB has ideal storage conditions that allow its specific activities and functions to be preserved [8].

Even under ideal storage conditions, modifications and/or degradation of components in blood bags may occur. Such changes, known as "storage damage", affect the useful lifespan and quality of products derived from stored blood and consist of morphological changes, platelet activation, changes to membrane glycoproteins and proteolysis and expression of platelet surface receptors [9, 10, 11, 12, 13].

MicroRNAs (miRNAs) are small, noncoding RNA molecules that are approximately 22 nucleotides long in their mature state and that are involved in regulating gene expression in the cell. This regulation occurs through the binding of the miRNA molecule to a messenger RNA with imperfect complementarity in the 3' untranslated region (UTR), thereby disrupting translation and preventing gene expression [14]. Because miRNAs can alter the level of translation without destroying the transcript, it is possible that significant changes can occur within the cell that are not detected at the transcriptome level [15,16, 17].

Edelstein et al., reported high levels of miRNAs in normal human platelets and evidence suggesting the biological and clinical relevance of these molecules, where beyond controlling gene expression, miRNAs would play an important role as biomarkers of hematological diseases and platelet reactivity and serve as a tool for understanding the mechanisms of gene expression in platelets [18].

To date, there are no reports in the literature characterizing the set of miRNAs expressed (miRnome) in PC after storage in blood banks. Therefore, the present study characterized the most highly expressed miRNAs in PC using high coverage sequencing, examined quantitative changes in miRNA levels during and after storage in a blood bank, then validated by real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) two miRNAs in 100 PC bags tubes and aimed to propose candidate miRNAs as biomarkers of PC storage damage. This study is novel.

Materials and Methods

Collection and Processing of Platelet Samples

Buffy coat, the traditional approach for obtaining PC, was used in this experiment [19, 20]. To obtain PC, a bag of WB (Bag-Matrix, 450 ml) was centrifuged (Thermo Scientific) and fractionated on a Compomat G5 hematologic processor (Fresenius Kabi), which, after separating platelets from red blood cells, automatically deposited the PC in a satellite bag [21] where 99,9% (>3 log₁₀) leukocytes were removed by filtration [22]. Next, a PC bag was established by pooling the PC from five satellite bags of healthy volunteers with the same blood type and

Table 1. Quality control of platelet concentrate bag tubes.

Parameters	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	7 day
Swirling	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Volume of the platelet concentrate (18 ml by PC bags tube).	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
WBC count ($10^9/70\text{ml}$)	$0,51 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,06$
Platelet count (10^{10})	$7,20 \pm 0,10$	$6,9 \pm 0,11$	$6,7 \pm 0,15$	$6,4 \pm 0,18$	$6,1 \pm 0,21$	$5,5 \pm 0,30$
pH	$7,2 \pm 0,00$	$7,2 \pm 0,01$	$7,2 \pm 0,01$	$7,3 \pm 0,02$	$7,3 \pm 0,03$	$7,4 \pm 0,03$

doi:10.1371/journal.pone.0129399.t001

Rh factor with negative serological results for blood-borne diseases provided by the Foundation Center for Hemotherapy and Hematology of Pará (Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará —HEMOPA).

For this study, PC bags containing 6.0×10^{10} platelets per bag were selected. In this work, the PC were stored in the same conditions as used in PC transfusion, that is optimal conditions. The quality control of PC bags was assessed at HEMOPA Foundation, using the following parameters: swirling, volume of the platelet concentrate, WBC count, platelet count and pH. For this experiment, each of the six days tested, two bags PC tubes were subjected to routine quality control tests and the results were similar to the PC bags used in blood transfusions (Table 1).

The method of preparing PC bags used in this study was performed following the criteria of Ordinance No. 1,353 from June 13, 2011 of the Brazilian Ministry of Health and was conducted within the first 8 hours after collection of WB in a closed circuit; the first RNA extraction was performed after 24 hours of storage [23]. Thus, "newly collected platelets" correspond to the first day of storage at the HEMOPA Foundation. Sixteen PC bags were collected; four were blood type A, 11 were type O, and one was type B. All bags were positive for Rh factor. As each PC bag consisted of platelets from five donors, this project analyzed platelet miRNAs from 80 donors in total.

PC Collection and microRNA Extraction to Solexa Sequencing

The upper edge of the PC bags had a tube or cord measuring approximately 38 cm that was filled with platelets and was removed from the PC bags to be used in this experiment. This tube or cord is comprised of the same plastic material "breathable" of the bags, which allows for maximum oxygen diffusion. Thus, the bag of remaining platelets was utilized as usual in blood transfusions without burdening the HEMOPA Foundation. Since the amount of extracted miRNA from one PC bag tube is not sufficient to perform a new individual generation sequencing, this experiment was performed using pools PC.

Each PC bag tube was cut into six equal pieces to perform experiments with platelets from six different days of storage (1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th and 7th). Thus, on the first day of storage, 1/6 of the tube was used for miRNA extraction, and the remaining 5/6 was stored under the same conditions as PC bags at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under constant agitation until extraction of miRNAs on each the following five days.

On each of the six days of storage, miRNA was extracted from 16 fragments of different PC bag tubes. As the PC is stored in the blood bank for a period ranging from three to five days, depending on the plasticizer in the storage bag [19], the 1st day is the high-quality control for platelets, and the 7th day is the low-quality control for platelets.

The mirVANA miRNA isolation kit (Life Technologies) was used to extract miRNA following the protocol suggested by the manufacturer. After analyzing and quantifying RNA integrity, homogeneous aliquots from the 16 extractions from each day of the experiment were

mixed in a single tube. Thus, when extractions were completed, six pools were isolated consisting of PC miRNAs from 80 donors participating in the experiment but for six different lengths of storage (PC from the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th and 7th days of storage).

PC Collection, miRNA Extraction and miRNA expression validation

To validate the results obtained by Solexa sequencing, which were performed on pools of PC, 100 different PC bags tubes were used, randomly chosen, which also was cut into six equal pieces to perform experiments with platelets from six different days of storage (1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th and 7th). Thus, on the first day of storage, 1/6 of the 100 tubes was used for miRNA extraction, and the remaining 5/6 of 100 PC bag tubes was stored under the same conditions as PC bags at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under constant agitation until extraction of miRNAs on each the following five days. On each of the six days of storage, miRNA was extracted from 100 fragments of different PC bag tubes, totaling 600 fragments.

The mirVANA miRNA isolation kit (Life Technologies) also was used to extract miRNA of 100 different PC bags tubes. As each PC bags tubes consists of five platelet donors, 500 donors were used to this validation experiment.

Quantification of RNA

Quantitation was performed using the Qubit Fluorometer (Invitrogen) spectrophotometer following the protocol recommended by the manufacturer. The quality of total RNA was measured by the amplification quality of the endogenous β -actin gene (ACTB).

Preparation of cDNA libraries

The cDNA libraries were constructed using the TruSeq Small RNA Sample Prep Kit (Illumina) following the protocol recommended by the manufacturer. The process is summarized by the binding of adapters to the 3' and 5' regions of the RNA molecule. The 3' adapter is specially modified to bind to the 3'-hydroxyl group of miRNAs and other small RNAs resulting from processing by Dicer. After adapter binding, a reverse transcriptase reaction synthesizes single-stranded complementary DNA (cDNA). The cDNA is then amplified by PCR using a common primer and a primer containing an index sequence in two separate and subsequent readings.

Analysis of RNA Integrity

RNA quality was determined by the RNA integrity number (RIN) using the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) platform. The RIN is an estimate of the integrity of total RNA samples.

Sequencing on the Illumina Platform. Libraries were sequenced on an Illumina GA IIX (SCS 2.8 software; Illumina, San Diego, CA, USA), with a 32-mer single-end sequence. Image analysis and base calling were performed using the RTA 1.8 software.

Processing of Sequencing Runs

The files generated by sequencing, with the.fastq extension, were converted to double encoder format and imported into the CutAdapt software (version 0.9.4) for the removal of adapters and conversion to the.fastq format, which is the input format for the alignment program. The FASTQC software (version 0.9.2) was used to assess read quality.

The latest version of the human genome (Hg19/GRCh37), as provided by The Genome Reference Consortium present in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), was used as a reference for the alignment of sequenced libraries. The Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) program was used to align sequences [24].

MiRNAs generated by sequencing were identified according to the most recent miRNA database, miRBase version 20 (<http://www.mirbase.org/>).

All miRNAs sequences of platelets are available in the NCBI Gene Expression Omnibus (GSE61856).

Analysis of Expression Data

To normalize the gene expression data values generated by mapping, the reads, in "reads per million" (RPM), were calculated in logarithm base 2 or binary logarithm (log2). The DEGseq program (version 1.17.1) present in the R analysis package was used to analyze the differential expression profiles of platelet miRNAs at each of the six different storage timepoints (1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th and 7th days of storage). This program identifies differentially expressed genes or isoforms from data generated by the sequencing of RNA in different samples [25]. The R analysis package was also used to generate graphs.

MiRNA expression validation

To quantitate miRNA levels of mir-127 and mir-320a, the miRNA was isolated from 100 PC bags tubes using mirVana™ miRNA isolation kit (Ambion). The miRNA was reverse transcribed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit according to the manufacturer's protocol (Life Technologies, USA) with TaqMan microRNA Assays for mir-127 (PN002229), mir-320a (PN002277) and mir-191 (PN002678) to RQ-PCR. Complementary DNA was then amplified by real-time PCR using the TaqMan Universal Master Mix II with UNG (Life Technologies, USA) on a Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany). mir-191 was selected as an internal control for miRNA input and reverse transcription efficiency because was the miRNA of most highly expressed on six different days of storage. All RQ-PCR reactions were performed in triplicate for both miRNA.

Results

Expression Profile of miRNAs in Freshly Collected Platelets

Sequence analysis and identification of miRNAs were performed according to the miRBase database (version 20), which to date contains information for 1870 registered miRNAs. Table 2 summarizes the number of miRNAs identified on the six days of PC storage in the HEMOPA Foundation. On the 1st day of PC storage, which represents the high-quality control for platelets, 675 miRNAs were identified. On the 7th day of PC storage, which corresponds to the low-quality control for these cells, 579 miRNAs were identified. However, the fewest miRNAs, 526, were detected on the fifth day of storage.

To define the differential expression profile of the platelet miRnome, sets of miRNAs expressed in the PC bags from the 2nd to 7th day of storage were compared with those from

Table 2. Number of miRNAs identified in the platelet concentrate (PC) according to miRBase version 20 on different days of storage.

*Periods	Days of PCs Storage						Total
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	7 th	
microRNAs	311	308	315	312	332	321	1899
(% microRNAs)	46.21	45.77	46.81	46.36	49.33	47.70	—
(Reads ≥ 10)	1.272.181	1.317.056	1.234.576	1.441.070	1.121.352	1.274.906	6.344.086

*days

doi:10.1371/journal.pone.0129399.t002

Table 3. Number of microRNAs highly expressed in platelet concentrate (PC), according to days of storage.

MicroRNA mature sequences detected in human platelets									
miRBase Database		Deep Sequencing (Raw_Reads)							
Platelets miRNAs	Mature Sequence	(nt)	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	7 th	
let-7b	5p-UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	22	76258.72	93880.88	81166.40	232478.10	154268.94	209761.63	
let-7g	5p-UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	22	30660.67	50650.96	31569.77	47051.60	32495.43	41100.61	
let-7i	5p-UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU	22	153624.39	177540.69	187708.74	156104.61	112702.28	158197.45	
miR-127	5p-CUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAU	22	53873.53	82979.84	79817.73	40357.34	27041.92	33505.19	
miR-191	5p-CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	23	389782.51	327464.40	306686.45	277301.57	207491.82	212457.63	
miR-22	5p-AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA	22	30309.21	32351.18	26765.51	20082.79	44801.51	36856.04	
miR-221	5p-ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU	22	28508.84	34872.78	34905.24	22588.03	21286.25	22400.77	
miR-320 ^a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	22	52054.80	60729.93	76080.13	89440.35	67412.33	81753.13	
miR-423	5p-UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	23	34337.39	46224.94	51367.02	71444.64	59088.24	60370.46	
miR-99b	5p-CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	22	28068.09	7844.89	9183.39	5535.05	5610.80	5743.72	

doi:10.1371/journal.pone.0129399.t003

the 1st day. The identified miRNAs were considered differentially expressed when the expression difference reached two-fold (2X) with $p \leq 0.05$ (Table 3).

Degradation profile of miRNAs

The quantitative loss of the 10 miRNAs with highest expression in the PC from the 1st to the 7th day of storage was analyzed. Expression was ranked based on raw RPM expression values. The 10 miRNAs with the highest expression on day 1 of PC storage, in descending order, were hsa-mir-191, hsa-let-7i, hsa-let-7b, hsa-mir-127, hsa-mir-320a, hsa-mir-423, hsa-let-7g, hsa-mir-22, hsa-mir-221 and hsa-mir-99b (Fig 1A).

On the 2nd day of PC storage, the expression profile featured nine of the 10 miRNAs most highly expressed on day 1 because miRNA hsa-mir-99b, which corresponds to the 10th most highly expressed miRNA, quantitatively decreased and miRNA hsa-mir-92a-1 replaced it among the 10 most highly expressed miRNAs (Fig 1B).

On the 3rd day of PC storage, the expression profile featured nine of the 10 most highly expressed miRNAs from the 1st and 2nd days because the 10th most highly expressed miRNA on the 2nd day of storage, hsa-mir-92a-1, quantitatively decreased and another miRNA, hsa-mir-4433b, replaced it among the 10 most highly expressed miRNAs (Fig 1C).

Analyzing the expression profile of miRNAs in PC on the 4th day of storage revealed that the miRNAs hsa-mir-221, hsa-mir-22 and hsa-mir-4433b, which were among the 10 most highly expressed miRNAs in PC between the 1st and 3rd days of storage, quantitatively decreased and were replaced on the 4th day of storage by miRNAs hsa-mir-92a-1, hsa-let-7d and hsa-mir-28 (Fig 1D).

A comparison of the PC from the 1st and the 5th days of storage revealed eight miRNAs in common because the 9th and 10th most highly expressed miRNAs from the 1st day of PC storage, hsa-mir-221 and hsa-mir-99b, respectively, began to quantitatively decline on day 5 and were replaced by miRNAs hsa-mir-92a-1 and hsa-let-7d. Additionally, starting on the 4th day of storage, the miRNA hsa-mir-28 quantitatively decreased and was replaced by the miRNA hsa-mir-22 on the list of the 10 most highly expressed miRNAs on the 5th day of storage (Fig 1E).

The expression profiles of the 10 most highly expressed miRNAs in PC were similar on the 5th and 7th days of storage, with quantitative variations, but the miRNAs occurred in the same

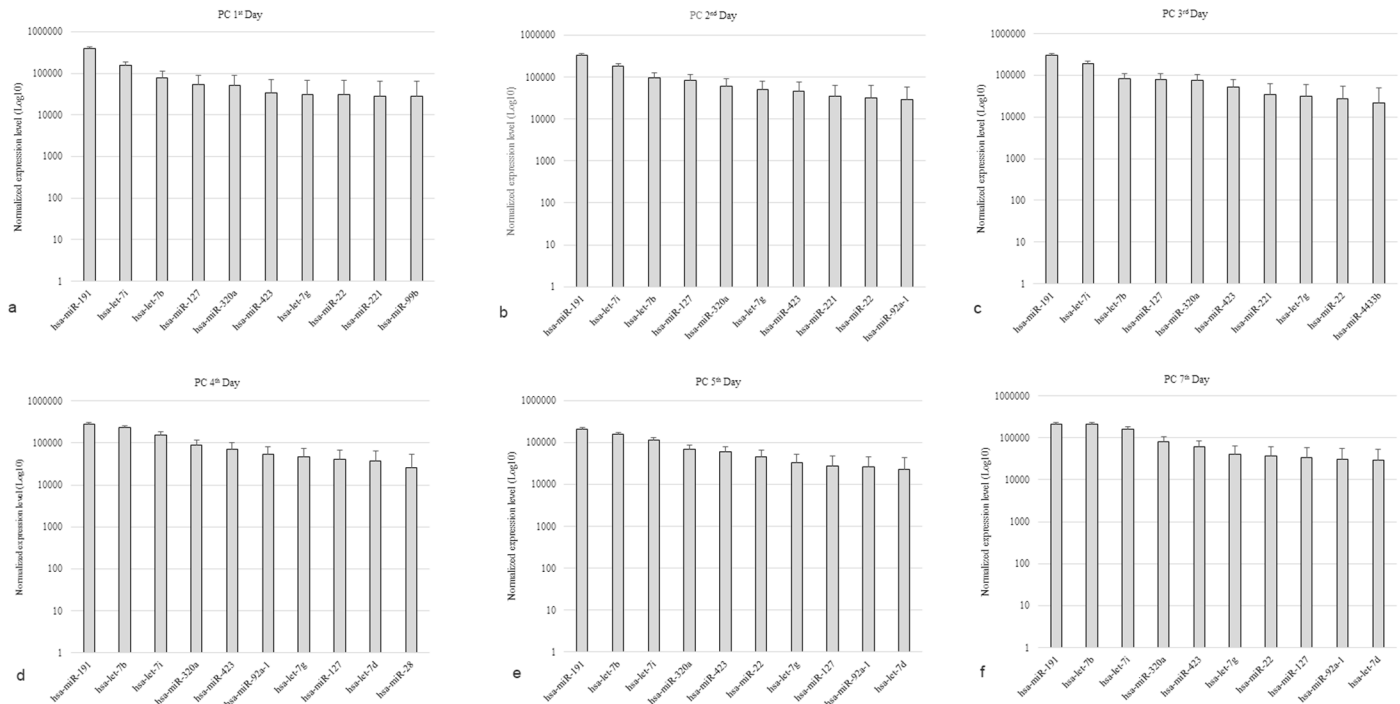


Fig 1. Expression profile of most highly expressed miRNAs, in log10 scale, in PCs on each day of storage. (A) Profile of the ten most expressed miRNAs on the 1st day of storage, considered as positive control; (B) Profile of the ten most expressed miRNAs on the 2nd day of storage with nine of the ten miRNAs present on the first day, differing only by miR-92a-1 in place of miR-99b; (C) Profile of the ten most expressed miRNAs on the 3rd day of storage, with nine of the ten most expressed miRNAs in the 1st and 3rd day; (D) Profile of the ten most expressed miRNAs on the 4th day of storage, with seven of the ten most expressed miRNAs on Day 1, differing by miRNAs let-7d, miR-28 and miR-92a-1; (E) Profile of the ten most expressed miRNAs on the 5th day of storage, with eight of the ten most expressed miRNAs on Day 1, with the exception of miR-92a-1 and let-7d; (F) Profile of the ten most miRNAs expressed in the 7th day of storage are similar to day 5, with quantitative variation. Errors bars show standard error of expression levels by reads per million.

doi:10.1371/journal.pone.0129399.g001

order from the most highly expressed miRNA (hsa-mir-191) to the miRNA with lowest expression (hsa-let-7d) (Fig 1F).

Fig 2 summarizes the list of the 10 most highly expressed miRNAs on the six days of PC storage. In total, 14 miRNAs are present on the six lists. The miRNA hsa-mir-191 was the most highly expressed on all six days of PC storage. The Fig 2 also shows that the miRNAs hsa-mir-127 (mir127) and hsa-mir-320a (mir320a) are the fourth and fifth most frequently occurring

Order	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	7 day
1	hsa-mir-191	hsa-mir-191	hsa-mir-191	hsa-mir-191	hsa-mir-191	hsa-mir-191
2	hsa-let-7i	hsa-let-7i	hsa-let-7i	hsa-let-7b	hsa-let-7b	hsa-let-7b
3	hsa-let-7b	hsa-let-7b	hsa-let-7b	hsa-let-7i	hsa-let-7i	hsa-let-7i
4	hsa-mir-127	hsa-mir-127	hsa-mir-127	hsa-mir-320a	hsa-mir-320a	hsa-mir-320a
5	hsa-mir-320a	hsa-mir-320a	hsa-mir-320a	hsa-mir-423	hsa-mir-423	hsa-mir-423
6	hsa-mir-423	hsa-let-7g	hsa-mir-423	hsa-mir-92a-1	hsa-mir-22	hsa-mir-22
7	hsa-let-7g	hsa-mir-423	hsa-mir-221	hsa-let-7g	hsa-let-7g	hsa-let-7g
8	hsa-mir-22	hsa-mir-221	hsa-let-7g	hsa-mir-127	hsa-mir-127	hsa-mir-127
9	hsa-mir-221	hsa-mir-22	hsa-mir-22	hsa-let-7d	hsa-mir-92a-1	hsa-mir-92a-1
10	hsa-mir-99b	hsa-mir-92a-1	hsa-mir-4433b	hsa-mir-28	hsa-let-7d	hsa-let-7d

Fig 2. List of the 10 most highly expressed miRNAs, in descending order, on the six days of platelet concentrate storage. In total, 14 miRNAs were included in the six lists.

doi:10.1371/journal.pone.0129399.g002

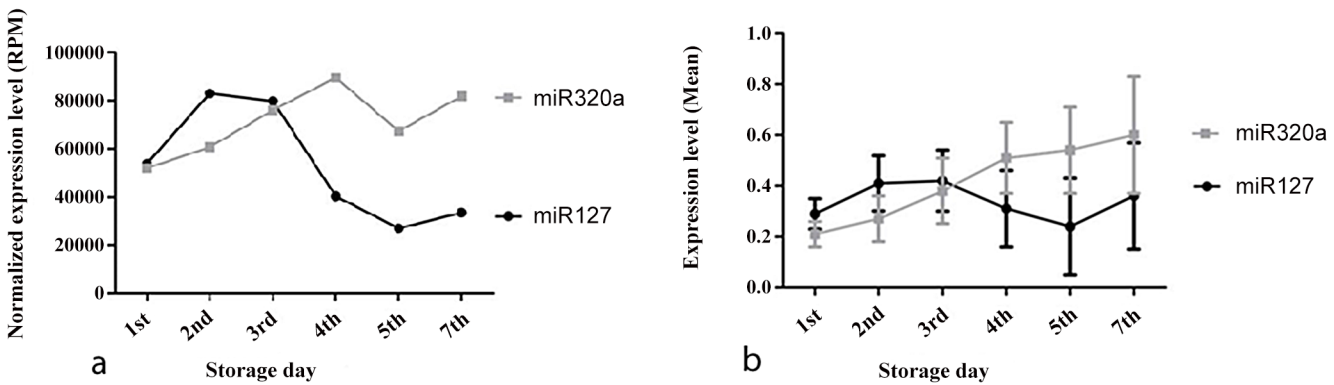


Fig 3. Expression profile of miRNAs hsa-miR-127 and hsa-miR-320a in PC bags during the six days of storage investigate. (A) Expression profile in reads per million of miRNAs miR-127 and miR-320a; (B) Average expression of miRNAs miR127 and miR320a and their respective standard deviations.

doi:10.1371/journal.pone.0129399.g003

during the first three days of storage, and these miRNAs switch positions on the following three days. Thus, mir320a becomes the 4th most highly expressed miRNA from the 4th to 7th day of storage, whereas mir127 becomes the 8th most highly expressed miRNA. This inverse expression between mir127 and mir320a depending on the storage time may allow us to identify PC bags that still exhibit physiologically normal platelets even after storage more than 5 days (Fig 3A).

MiRNA expression validation

The analyses of sequencing were made on pooled samples from 16 PC. Theoretically this means that increased levels of an individual miRNA could be caused by very high levels in just one or two of the concentrates and may not at all be present in some of the others. To check if this technical artifact happened, and to validate the miRNAs mir127 and mir320a as biomarkers to assess the "validity period" of PC bags stored in blood banks for more than 5 days, 100 PC bags tubes were tested to verify a quantitative relationship between mir320a mir127 in the six different days of storage. The miRNA mir-191 was selected as an internal control because was the miRNA of most highly expressed on six different days of storage. The relative quantification of miRNAs and mir127 mir320a, for mir-191, validated the results found in the Illumina sequencing platform. The inverse expression of these two miRNAs from the 4th day it was confirmed and can be seen in Fig 3A and 3B. In Table 4 we can observe that with increasing storage

Table 4. Average expression of miRNAs miR-127 and miR-320a in the six days of storage investigated, their standard errors and p-value.

Storage day	Mir-127		Mir-320a	
	*RQ (Mean±SD)	⁺ p-value	RQ (Mean±SD)	p-value
1 st	0.29 ± 0.06	0.784	0.21 ± 0.05	0.780
2 nd	0.41 ± 0.11	0.850	0.27 ± 0.09	0.815
3 rd	0.42 ± 0.12	0.852	0.38 ± 0.13	0.847
4 th	0.31 ± 0.15	0.787	0.51 ± 0.14	0.876
5 th	0.24 ± 0.19	0.772	0.54 ± 0.17	0.875
7 th	0.36 ± 0.21	0.793	0.60 ± 0.23	0.894

*Real-Time Quantitative PCR

⁺ p-value calculated by pair-sample T test.

doi:10.1371/journal.pone.0129399.t004

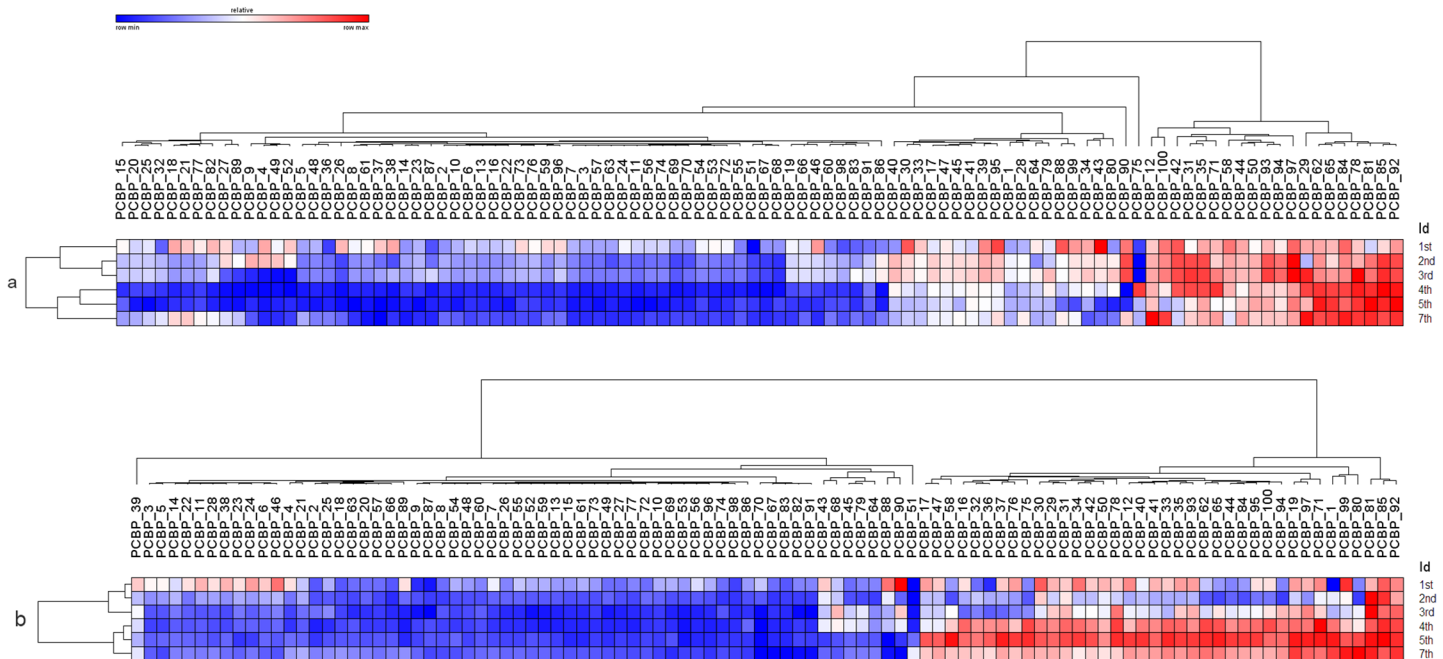


Fig 4. Heatmaps from relative expression of miRNAs, using as a metric the euclidean distance calculated between each PC bag and storage periods for hierarchical cluster construction. Heatmaps was performed with the GENE-E module from GenePattern tool version 3.9.1. The blue bar indicates decreased expression, while the red bar indicates increased expression. (A) A sample of the relative expression of 100 PC bags were hierarchically clustered and scored as statistically significant $p < 0.001$ for six periods of storage, showing that miR-127, was shown to be down-regulated in most PC bags experimentally validated. (B) A sample of the relative expression of 100 PC bags were also grouped hierarchically and scored as statistically significant at $p < 0.001$ during storage periods. This grouping confirmed that miR-320a, was down-regulated in most validated PC bags. In all these 100 PC bags used for the validation of miRNAs (miR-127 and miR-320a), there was a similarity in groups of the 4th, 5th and 7th periods of storage, showing down-regulated profiles that can be related with the biological function of these miRNAs to storage cell damage.

doi:10.1371/journal.pone.0129399.g004

time also increases the standard deviation of the expression of miRNAs mir127 mir320a and in the heatmaps of the Fig 4A and 4B we can observe the miRNAs expression variation during the storage days in 100 PC bags tested.

Discussion

Platelets help control bleeding by acting as hemostatic plugs in the vascular endothelium, thereby playing an important role in the primary hemostasis of patients [26]. miRNAs are a class of small RNA molecules of approximately 22 nucleotides in their mature state that are involved in regulating gene expression within cells. This regulation occurs through the binding of a miRNA molecule to a messenger RNA by imperfect complementarity in the 3' untranslated region (UTR), thereby interrupting translation and protein production [14].

A study by Landry et al., demonstrated the existence of diverse and abundant miRNAs as key regulators of mRNA translation in human platelets, thus establishing the existence and functionality of a gene regulation process based on miRNA in these anucleate cardiovascular cells [27]. However, there are still no published reports on the characterization of the PC miRnome before or after storage in blood banks.

Because platelets are small, anucleate cells derived from the cytoplasmic fragmentation of megakaryocytes [3], they are unable to synthesize new miRNAs, and therefore, the number of miRNAs is expected to decrease during storage in a blood bank. The half-life of a miRNA molecule varies [28], and miRNAs may suffer rapid turnover [29] or remain stable for longer than 12 days [30]. However, the half-life of platelet miRNAs is expected to be fairly short because

platelets circulate in the blood for approximately five days and are then removed from circulation and destroyed by the spleen [31].

PC should be stored between 20°C and 24°C for up to five days under sufficient agitation for proper oxygenation to prevent platelet aggregation [5]. Storage periods depend on local legislation and the additive used in PC solutions, and the validity period is limited by regulations from health authorities to ensure the safety and quality of the product from bacterial growth and the loss of platelet viability during storage due to causes such as lactate accumulation, morphological transformation and platelet aggregation [32].

Expression Profile of miRNAs in Platelets Stored in the Blood Bank

Approximately 22% of miRNAs were lost from the 1st to 5th day of storage; however, the number of miRNAs increased on the 7th day of storage, which corresponds to the low-quality control for platelets, relative to the 4th and 5th days of storage. This increase was not expected considering the gradual degradation of miRNAs over days in storage. However, it is likely that miRNA precursors (pre-miRNAs) of mature miRNAs that regulate senescence were cleaved after the 5th day of storage by RNA editing enzymes, such as RNase and RNA helicases, thereby increasing the number of identified miRNAs [33]. Another hypothesis that could explain the increase in the number of miRNAs from the 5th to the 7th day assumes that RNA precursors can be cleaved to produce fragments of small RNAs with a regulatory capacity to inhibit protein translation in response to stress [34]. In this case, specifically, the stress would result from aging due to storage for more than five days.

The six lists of the most highly expressed miRNAs contain 14 miRNAs in total; of these, the miRNAs hsa-mir-4433b, hsa-mir-221 and hsa-mir-423 have not previously been associated with platelet physiology. The miRNA hsa-mir-4433b is a precursor of the miRNAs hsa-mir-4433b-3p and hsa-mir-4433b-5p [35]; the expression of miRNAs hsa-mir-221 and hsa-mir-423 were mainly associated with cancers of the lungs [36] and liver [37], respectively, prior to the present study. Expression levels for the other 11 miRNAs (hsa-let-7b, hsa-let-7d, hsa-let-7i, hsa-let-7g, hsa-mir-22, hsa-mir-28, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-99b, hsa-mir-127, hsa-mir-191 and hsa-mir-320a) were reported in published studies on platelets [38–43]; however, some of these miRNAs are also involved in other cellular processes such as aging [44], control of the cell cycle [45] and bodily reactions such as the immune response [46] and inflammation [47,48].

The miRNA hsa-mir-191 was the most highly expressed on all six days of PC storage. At the other extreme, three miRNAs appeared only once on the list of the 10 most highly expressed miRNAs, all in tenth place: hsa-mir-99b, hsa-mir-4433b and hsa-mir-28. The list of the highly expressed miRNAs was somewhat different from previous reports, such as mir-223 [42, 47, 49] probably the analyses of sequencing that were made on pooled samples from 16 CP and the storage time of platelets in the blood bank, where first RNA extraction was performed after 24 hours of storage, may have induced a slight variation.

Biomarkers to assess the validity of platelet concentrate

The applicability of this study is to indicate biomarkers that can be used to assess the validity of platelet concentrate. An example of this can be observed in inverse expression between mir127 and mir320a that depending on the storage time may allow us to identify PC bags that still exhibit physiologically normal platelets (not activated) even after long storage periods (more than 5 days) that could be used for blood transfusions in the event that fresher bags are unavailable. To our knowledge, there is no report in the literature indicating a direct relationship between the miRNAs mir-127 and mir-320a to mechanisms of platelet activation and/or

apoptosis. As previously mentioned, after five days of storage in a blood bank, all unused PC bags are discarded [23]; however, many of these bags may contain functional platelets because the kinetics of cellular aging are influenced by age, type of nutrition and exposure to environmental agents of the blood donors [50,51].

Our example suggests the use of the miRNAs mir127 and mir320a as biomarkers to assess the "validity period" of PC bags stored in blood banks for more than 5 days. Thus, bags can be tested on the 5th day of storage for the relative expression levels of mir127 and mir320a. Expression levels of mir127 lower than those of mir320a would indicate that platelets suffered aging *in vitro* and most likely exhibit storage damage, which would make the PC bag unsuitable for transfusion because this is the PC profile after the 4th day of storage. However, expression levels of mir127 greater than or equal to those of mir320a would indicate that the PC bag still contains physiologically normal platelets because this is the PC profile during the first three days of storage. Validation of the expression of miRNAs mir127 and mir320a, in 100 PC bags tubes, confirmed the findings of Solexa Sequencing. Comparing Fig 3A with Fig 3B we can observe a similarity in the expression of these two miRNAs profile. The pattern of the relative amount of expression of miRNAs mir320a and mir127, and deviation, increase with increasing storage time of platelets in blood bank (Table 4), was due to each of the 100 PC bag is comprised of platelets from different donors and reinforces our hypothesis that miRNAs could be used as biomarkers of "Validity Period" of PC bags stored in blood banks. For example the fifth day of storage can be observed in the standard deviation of Fig 3B that some bags PC tube had a expression levels of mir127 greater than or equal to those of mir320a would indicate that the PC bag still contains physiologically normal platelets. Parameters as swirling, volume of the platelet concentrate, WBC count, platelet count and pH, endorsed this assumption. In future, the assessment of the platelet mitochondrial membrane potential using rhodamine 123 as a probe for mitochondrial membrane potential can confirm our hypothesis. Anyway, the bioinformatics analysis of the target gene prediction of the mir127 and mir320a using the miRWalk Database 2.0, and DAVID Bioinformatics Resources 6.7 for gene enrichment, showed us that these microRNAs regulates several genes of mitochondrial energy metabolism, opening a wide field of research in this area.

Interindividual differences among blood donors is reflected in the different degradation times of miRNAs and show that the use of miRNAs as biomarkers of aging platelets in the blood bank is a promising method. Detecting platelet activation can allow the early detection of changes that affect platelet viability during storage. To conclude that the use of miRNA will contribute to improved quality of blood products the results need to be correlated to morphological marker of platelet storage lesion. The unique morphology of platelets and certain functional characteristics can be assessed by flow cytometry, which uses monoclonal antibodies to recognize changes in the expression levels of glycoproteins on the surface of platelets that act as pro-coagulants [52,53]. However, the main purpose of detecting platelet activation during PC preparation and storage is to assess the final quality of the PC bag and allow the selection of PC bags that have been stored for more than 5 days but are still suitable for blood transfusion.

Conclusion

The firm conclusion that can be drawn from the data is that platelet concentrates contains miRNA and the concentrations varies over time. To our knowledge, there is no method to identify PC bags with functional platelets among those to be discarded after five days of storage in blood banks. Thus, evaluating the ratio of the expression levels of mir127 and mir320a (mir127/320a) may become a unique and extremely important methodology for transfusion

medicine because it can be performed quickly before PC bags are discarded. However, further studies are needed.

Acknowledgments

This paper was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, to RMRB), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA, to RMRB), the Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Pará (HEMOPA, to CFAMN and LML) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, to TBP).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TBP CFAMN LML RCM RMRB. Performed the experiments: TBP CFAMN LML. Analyzed the data: TBP CFAMN JARL JHSM RMRB. Contributed reagents/materials/analysis tools: CFAMN LML JHSM JARL RMRB. Wrote the paper: TBP CFAMN LML RMRB.

References

1. Ministério da Saúde (Brasil). (2014) Caderno de informação: Sangue e hemoderivados- Produção hemoterápica do Sistema único de saúde-SUS, Brasília, Distrito Federal. [Information booklet: Blood and blood derivatives-Hemotherapeutic production in the Public Healthcare System, Brasília, Federal District]. Ministério da saúde.
2. Liubruno GM. (2008) Proteomics: applications in transfusion medicine. *Blood Transfus.* 6:70–85. PMID: [18946951](#)
3. Vanni DS, Horstmann B, Benjo AM, Daher JPL, Kanaan S, Sleiman M. (2007) Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo/ Nitric oxide: inhibition of platelets and participation in thrombus formation. *J Bras Patol Med Lab.* 43: 181–9.
4. Nuytens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. (2011) Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res.* 127 Suppl 2:S26–9. doi: [10.1016/S0049-3848\(10\)70151-1](#) PMID: [21193111](#)
5. Thiele T, Steil L, Völker U, Greinacher A. (2010) Transfusion Medicine and Proteomics. Alliance or coexistence? *Blood Transfus.* 8 Suppl 3:s16–s25. doi: [10.2450/2010.004S](#) PMID: [20606745](#)
6. Sharma S, Sharma P, Tyler LN. (2011) Transfusion of blood and blood products: indications and complications. *Am Fam Physician.* 83:719–24. PMID: [21404983](#)
7. Ministério da Saúde (Brasil). (2002) Resolução da Diretoria Colegiada-RDC no. 343, de 13 de dezembro de 2002. Anexo 1- Regulamento Técnico dos Serviços de Hemoterapia, Brasília, Distrito Federal [Board Resolution no. 343 of December 13, 2002. Appendix 1—Technical Regulation of Hemotherapy Services, Brasília, Federal District]: Ministério da Saúde.
8. Schubert P, Devine DV. (2010) Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways. *Blood Transfus.*; 8 Suppl 3:s69–s72. doi: [10.2450/2010.011S](#) PMID: [20606753](#)
9. Zubair AC. (2010) Clinical impact of blood storage lesions. *Am J Hematol.* 85:117–122. doi: [10.1002/ajh.21599](#) PMID: [20052749](#)
10. Shrivastava M. (2009) The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci.* 41:105–13. doi: [10.1016/j.transci.2009.07.002](#) PMID: [19683964](#)
11. Delobel J, Rubin O, Prudent M, Crettaz D, Tissot J-D, Lion N. (2010) Biomarker Analysis of Stored Blood Products: Emphasis on Pre-Analytical Issues. *Int J Mol Sci.* 11:4601–17. doi: [10.3390/ijms11114601](#) PMID: [21151459](#)
12. Estebanell E, Díaz-Ricart M, Escolar G, Lozano M, Mazzara R, Ordinas A. (2000) Alterations in cytoskeletal organization and tyrosine phosphorylation in platelet concentrates prepared by the buffy coat method. *Transfusion.* 40:535–42. PMID: [10827255](#)
13. Dangwal S, Thum T. (2012) MicroRNAs in platelet biogenesis and function. *Thromb Haemost.* 108 (4):599–604. PMID: [22782083](#)
14. Mattick JS, Makunin IV. (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet.* 15:R17–29. PMID: [16651366](#)
15. Bartel DP. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 136:215–33. doi: [10.1016/j.cell.2009.01.002](#) PMID: [19167326](#)

16. Carthew RW, Sontheimer EJ. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136:642–55. doi: [10.1016/j.cell.2009.01.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035) PMID: [19239886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19239886/)
17. Chen JF, Callis TE, Wang DZ. (2009) microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci*. 122(Pt 1):13–20.
18. Edelstein LC, Bray PF. (2012) Small RNAs as potential platelet therapeutics. *Handb Exp Pharmacol*. 210:435–445. doi: [10.1007/978-3-642-29423-5_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_17) PMID: [22918741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22918741/)
19. Hogman CF. (1988) Immunologic transfusion reactions. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica Supplementum*. 89:4–12. PMID: [3067489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3067489/)
20. Vasconcelos E, Figueiredo AC, Seghatchian J. (2003) Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and apheresis. *Transfusion and Apheresis Science*. 29:13–16. PMID: [12877887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12877887/)
21. Bontekoe IJ, Van der Meer PF, Mast G, Korte D. (2014) Separation of centrifuged whole blood and pooled buffy coats using the new CompoMat G5: 3 years experience. *Vox Sanguinis*. 107 (2):140–147. doi: [10.1111/vox.12140](https://doi.org/10.1111/vox.12140) PMID: [24602034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24602034/)
22. Bruil A, Beugeling T, Feijen J, van Aken WG. (1995) The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfusion Medicine Reviews*. 9 (2):145–166. PMID: [7795332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7795332/)
23. Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. (2011) [Technical Regulation of Hemotherapy Procedures]. Ministério da Saúde (Brasil). Portaria N° 1.353, de 13 de junho de 2011.
24. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M and Gingeras TR. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 29 (1):15–21. doi: [10.1093/bioinformatics/bts635](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635) PMID: [23104886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23104886/)
25. Wang QZ, Xu W, Habib N, Xu R. (2009) Potential uses of microRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 9:572–94. PMID: [19519323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19519323/)
26. Viele M, Donegan E, Bossom EL. (2000) Banco de sangue e imuno-hematologia. [Blood banks and immuno-hematology]. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. 9ª ed. [Medical Immunology. 9th ed.] Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p:215–222.
27. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. (2009) Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol*. 16: 961–6. doi: [10.1038/nsmb.1651](https://doi.org/10.1038/nsmb.1651) PMID: [19668211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19668211/)
28. Volk N, Shomron N. (2011) Versatility of MicroRNA biogenesis. *PLoS One*. 6:e19391. doi: [10.1371/journal.pone.0019391](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019391) PMID: [21572999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21572999/)
29. Krol J, Busskamp V, Markiewicz I, Stadler MB, Ribi S, Richter J, Duebel J, Bicker S, Fehling HJ, Schübeler D, Oertner TG, Schratt G, Bibel M. (2010) Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell*. 141:618–31. doi: [10.1016/j.cell.2010.03.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.039) PMID: [20478254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20478254/)
30. Bauersachs J, Thum T. (2011) Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs. *Circ Res*. 109:334–47. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.110.228676](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.228676) PMID: [21778437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21778437/)
31. Nurden AT. (2011) Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 105 Suppl 1: S13–33. doi: [10.1160/THS10-11-0720](https://doi.org/10.1160/THS10-11-0720) PMID: [21479340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21479340/)
32. Murphy MF, Wallington TB, Kelsey P, Boulton F, Bruce M, Cohen H, Duguid J, Knowles SM, Poole G, Williamson LM. (2001) British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Guidelines for the clinical use of red cell transfusions. *Br J Haematol*. 113:24–31. PMID: [11328275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328275/)
33. Abdelmohsen K, Srikantan S, Kang MJ, Gorospe M. (2012) Regulation of senescence by microRNA biogenesis factors. *Ageing Res Rev*. 11:491–500. doi: [10.1016/j.arr.2012.01.003](https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.01.003) PMID: [22306790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22306790/)
34. Kato M, Slack FJ. (2013) Ageing and the small, non-coding RNA world. *Ageing Res Rev*. 12:429–35. doi: [10.1016/j.arr.2012.03.012](https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.012) PMID: [22504407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22504407/)
35. GeneCopoeia. <http://www.genecopoeia.com>. 2014.
36. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. (2010) miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:264–9. doi: [10.1073/pnas.0907904107](https://doi.org/10.1073/pnas.0907904107) PMID: [20018759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20018759/)
37. Wu S, Huang S, Ding J, Zhao Y, Liang L, Liu T, Zhan R, He X. (2010) Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*. 29:2302–8. doi: [10.1038/onc.2010.34](https://doi.org/10.1038/onc.2010.34) PMID: [20190813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20190813/)
38. Hussein K, Theophile K, Dralle W, Wiese B, Kreipe H, Bock O. (2009) MicroRNA expression profiling of megakaryocytes in primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Platelets*. 20:391–400. PMID: [19811223](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19811223/)

39. Kannan M, Mohan KV, Kulkarni S, Atreya C. (2009) Membrane array-based differential profiling of platelets during storage for 52 miRNAs associated with apoptosis. *Transfusion*. 49:1443–50. doi: [10.1111/j.1537-2995.2009.02140.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02140.x) PMID: [19389023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19389023/)
40. Girardot M, Pecquet C, Boukour S, Knoops L, Ferrant A, Vainchenker W, Giraudier S, Constantinescu SN. (2010) miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. *Blood*. 116:437–45. doi: [10.1182/blood-2008-06-165985](https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-165985) PMID: [20445018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20445018/)
41. Nagalla S, Shaw C, Kong X, Kondkar AA, Edelstein LC, Ma L, Chen J, McKnight GS, López JA, Yang L, Jin Y, Bray MS, Leal SM, Dong J and Bray PF. (2011) Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood*. 117:5189–97. doi: [10.1182/blood-2010-09-299719](https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-299719) PMID: [21415270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21415270/)
42. Osman A, Fälker K. (2011) Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes. *Platelets*. 22:433–41. doi: [10.3109/09537104.2011.560305](https://doi.org/10.3109/09537104.2011.560305) PMID: [21438667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21438667/)
43. Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P. (2012) The repertoire and features of human platelet microRNAs. *Plos One*. 7 (12):1–14.
44. Osman A, Hitzler WE, Meyer CU, Landry P, Corduan A, Laffont B, Boilard E, Hellstern P, Vamvakas EC, Provost P. (2014) Effects of pathogen reduction systems on platelet microRNAs, mRNAs, activation and function. *Platelet*. 21:1–10.
45. Freedman JE, Ercan B, Morin KM, Liu CT, Tamer L, Ayaz L, Kanadası M, Cicek D, Seyhan AI, Akilli RE, Camci C, Cengiz B, Oztuzcu S, Tanriverdi K. (2012) The distribution of circulating microRNA and their relation to coronary disease. *F1000Res*. 1:50. doi: [10.12688/f1000research.1-50.v1](https://doi.org/10.12688/f1000research.1-50.v1) PMID: [24358814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24358814/)
46. Lena AM, Mancini M, Rivetti di Val Cervo P, Saintigny G, Mahé C, Melino G, Candi E. (2012) MicroRNA-191 triggers keratinocytes senescence by SATB1 and CDK6 downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 423:509–14. doi: [10.1016/j.bbrc.2012.05.153](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.153) PMID: [22683624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22683624/)
47. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. (2007) The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*. 67:7713–22. PMID: [17699775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17699775/)
48. Kumar M, Ahmad T, Sharma A, Mabalirajan U, Kulshreshtha A, Agrawal A, Ghosh B. (2011) Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 128:1077–85. doi: [10.1016/j.jaci.2011.04.034](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.034) PMID: [21616524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21616524/)
49. Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. (2007) A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem*. 282:28929–38. PMID: [17660297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17660297/)
50. Pope CA 3rd, Hansen ML, Long RW, Nielsen KR, Eatough NL, Wilson WE, Eatough DJ. (2004) Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ Health Perspect*. 112:339–45. PMID: [14998750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14998750/)
51. Leytin V. (2012) Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev*. 26:51–63. doi: [10.1016/j.blre.2011.10.002](https://doi.org/10.1016/j.blre.2011.10.002) PMID: [22055392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22055392/)
52. Landi EP, Marques Júnior JFC. (2003) Flow cytometric characterization of platelet activation in platelet concentrates. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 25:39–46.
53. Carubbi C, Masselli E, Gesi M, Galli D, Mirandola P, Vitale M, Gobbi G. (2014) Cytofluorimetric Platelet Analysis. *Semin Thromb Hemost*. 40(01):088–098.

Differential Expression Profile of MicroRNAs During Prolonged Storage of Platelet Concentrates As a Quality Measurement Tool in Blood Banks

Jersey Heitor da Silva Maués,^{1,*} Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes,^{1,2,*} Thaís Brilhante Pontes,³ Priscilla Cristina Moura Vieira,³ Raquel Carvalho Montenegro,² Letícia Martins Lamarão,⁴ Eleonidas Moura Lima,⁵ and Rommel Mário Rodriguez Burbano³

Abstract

Platelet concentrate (PC) is a key blood component, which even in good storage conditions, susceptible to cellular damage over time. Hence, blood banks discard unused PC bags after 5 days of storage. Biomarkers of PC quality are therefore highly sought after in blood bank governance. We used the data (Gene Expression Omnibus: GSE61856) generated with next-generation sequencing to examine the expression profiles of microRNAs (miRNAs) from PCs that were stored for 6 days in a blood bank, that is, 1 day longer than is normally stored PC. We identified the 14 most differentially expressed miRNAs by comparing a control PC on the first day of storage with the PCs on each of the subsequent 5 days of storage from day 1 to 6. In all, we identified nine miRNAs with the downregulated profile (miR-145-5p, miR-150-5p, miR-183-5p, miR-26a-5p, miR-331-3p, miR-338-5p, miR-451a, miR-501-3p, and miR-99b-5p) and five upregulated miRNAs (miR-1304-3p, miR-411-5p, miR-432-5p, miR-668-3p, and miR-939-5p). These miRNAs were validated by real-time quantitative PCR in 100 PC units. As each PC unit is composed of platelets of five individuals, the validation was thus performed in 500 individuals (250 men and 250 women, comprised 18–40 years old adults). The data were analyzed with hierarchical clustering and principal component analysis, which revealed the variation of mean relative expression and the instability of miRNAs half-life on the fourth day of PC storage, which coincides with time of onset of platelet storage lesions. These new observations can usefully inform future decision-making and governance in blood banks concerning PC quality.

Keywords: platelet concentrates, diagnostic medicine, storage lesions, microRNA, blood bank

Introduction

PLATELET CONCENTRATE (PC) IS ONE OF THE MAJOR BLOOD PRODUCTS used in therapeutic transfusion. This blood component requires special storage; however, even under good storage conditions, modifications or degradations may occur and are known as storage lesions (Handigund et al., 2016). Under normal storage conditions, platelets can be activated causing cellular storage damage that affects life and quality of PC. These PC modifications include morphological and physiological changes, platelet activation, changes in membrane glycoproteins and proteolysis, and expression of platelet surface receptors.

These changes may alter the structure and function of platelets and are referred to as the platelet storage lesion (PSL) (Cho et al., 2018). One reason for this loss of quality is due to mitochondrial dysfunction and apoptosis and ultimately viability loss during storage (Dahiya et al., 2015).

A serious problem that affects public and private health is the lack of PCs that commonly affect countries with few blood donors, such as Brazil. In addition to the lack of donors, the main difficulty is that after 5 days of storage in the blood bank, all unused PC bags are discarded as a result of storage lesions (Ministério da saúde, 2012), and on the sixth day PCs may be missing from the stock, causing serious problems to hospitals dependent on a blood bank. However, many of these

¹Laboratory of Human Cytogenetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil.

²Laboratory of Pharmacogenetics, Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

³Laboratory of Molecular Biology, Ophir Loyola Hospital, Belém, Brazil.

⁴Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Foundation Center of Hemotherapy and Hematology of Para (HEMOPA), Belém, Brazil.

⁵Laboratory of Structural Molecular Biology and Oncogenetics—LBMEO, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Brazil.

*These two authors contributed equally to this work.

packets may still contain functional platelets, since the kinetics of cellular aging are influenced by the age, type of feeding, and exposure to environmental agents, to which blood donors may have undergone (Leytin, 2012; Pope et al., 2004). Biomarkers of PC quality are therefore highly sought after in blood bank governance.

Studies have shown that a proposed mechanism based on the molecular regulation of platelet microRNAs (miRNAs) has been shown to be relevant for *ex vivo* storage lesions, since platelets when stored, continue to translate proteins from mRNA (Pontes et al., 2015; Yan et al., 2016). Although they are enucleated cells, many necessary components for regulation of genes in mature platelets are preserved from their megakaryocytes (e.g., mRNA, pre-miRNAs, Dicer, TRBP2 e Ago2) (Edelstein et al., 2013; Landry et al., 2009; Opalinska et al., 2010).

Platelets maintained under storage conditions continue to translate protein, process pre-miRNAs into mature miRNAs, confirming a correlation between the platelet transcriptome and its proteomic profile supporting the capacity of *de novo* protein synthesis in platelets storage (Schubert and Devine, 2010; Schwertz et al., 2010; Yan et al., 2016). During storage, the release of miRNA-rich microparticles triggered primarily by factors such as shear stress and activation that may modify expression profiles of the miRNAs (Boilard and Belleannée, 2016; Laffont et al., 2013). The biological role of miRNA is mainly linked to its ability to act together and mediate sequence-specific regulation by repressing translation of mRNAs at specific nontranslated binding sites (Laffont et al., 2013).

In our earlier study, we characterized the most expressed miRNAs in PCs during 6 days of blood bank storage, independently, without comparing 1 day with the other (Pontes et al., 2015). The objective of this work was to identify in a database, generated by our research group, the miRNAs with more frequent differential expression, when we compared 6 days of storage of the PCs with a control PC (PC of the first day of storage). Afterward, we validated 14 miRNAs in 100 PC units and also queried the predicted target genes that can be regulated by these miRNAs and their relationship with the lesions of storage of platelets, in addition to their variation during the storage.

Materials and Methods

Ethics statement

For all platelet experiments of Foundation Center for Hemotherapy and Hematology of Pará (Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará—HEMOPA), blood donor volunteers signed a free and informed consent form. All biosafety policy guidelines were applied in the involved laboratories, with the approval of the Ethics Committee (#194, 196, approval October 17, 2012).

In silico identification of miRNAs

The reads obtained from the sequence read archive (Table 1) of the six libraries were downloaded from Gene Expression Omnibus: GSE61856. These 3' adapter reads detected with a sequence length <17 nucleotides (nt) were removed with Cutadapt (Martin, 2011). We identified more than 90% of the high-quality reads in all libraries, which had already been evaluated by FASTQC software in our first study (Pontes et al., 2015). The second strategy was to verify the quality of miRNA

TABLE 1. SAMPLES USED IN THIS STUDY

<i>Cell type: platelets</i>			
<i>Samples (GEO)^a</i>	<i>Sample name</i>	<i>SRA</i>	<i>Reference</i>
GSM1515807	Platelets first day	SRX716593	PMID:
GSM1515808	Platelets second day	SRX716594	26121269
GSM1515809	Platelets third day	SRX716595	
GSM1515810	Platelets fourth day	SRX716596	
GSM1515811	Platelets fifth day	SRX716597	
GSM1515812	Platelets seventh day	SRX716598	

^aAccess number GSE61856, (<http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE61856>).

GEO, Gene Expression Omnibus; SRA, sequence read archive.

reads. We identified a variation of 15–27 nt in the reads quality of miRNAs that were shown to be centered at 22 nt and had a length <20% of a total of 44% of human miRNAs.

When we changed the length criterion of the qualified reads to a length of 15–35 nt, we noticed that the six libraries showed strong peaks in the length of 32 nt (Supplementary Table S1). Analysis of the reads category showed that most of these reads greater than 22 nt belonged to noncoding RNA. Then, with CAP-miRSeq (Sun et al., 2014), we identified and quantified the known miRNAs based on the miRBase annotation, version 21 (<http://mirbase.org/>).

Identification of miRNAs between PC from different storage days

We identified the common miRNAs between first day storage PCs used as control, and the PCs of the other storage days as the target of this study. Then, we made the following comparisons: first versus second, first versus third, first versus fourth, first versus fifth, and first versus seventh days of storage. We used the InteractVenn tool (Heberle et al., 2015) to identify miRNAs, in the region of the intersection of the Venn diagram, that were subsequently selected for differential expression analysis. miRNAs with ≥ 10 reads were selected for clustering paired with Venn diagrams between two PCs (control vs. target).

Analysis of differentially expressed miRNAs

The raw reads for each miRNA sequence were first normalized using in reads per million (RPM), and the differentially expressed sequence counts between the two PCs (control vs. target) were then analyzed using the Poisson distribution method (Audic and Claverie, 1997) with the algorithm IDEG6 (Romualdi et al., 2003). The Log_2 Fold-Change (FC) = (target/control) measurement was applied to estimate the differential expression of miRNAs. The statistical significance of the miRNAs between two libraries of the investigated conditions was estimated by the *p*-values. We used the *p*-value correction with the Bonferroni method (Abdi, 2007).

miRNA expression validation in 100 PC units

Buffy coat, a traditional approach to obtaining PC, was used in this experiment (Högman, 1988; Vasconcelos et al., 2003). To obtain the PC, a bag of whole blood (Bag-Matrix; 450 mL) was centrifuged (Thermo Scientific) and fractionated on a the Compomat G5 hematological processor (Fresenius Kabi), which after the separation of the platelets from the red blood

cells automatically deposited the PC in a satellite bag (Bon-tekoe et al., 2014), and 99.9% (>3 log10) leukocytes were removed by filtration (Bruil et al., 1995).

Each PC consists of platelets from five donors, so validation was performed on 500 donors (250 men and 250 women in the age group that comprises young adults—between 18 and 40 years old). Six days of storage were analyzed in a blood bank, and the first day was the control for the other 5 days. Thus, five differential expression comparisons were performed for each of the 14 miRNAs found, giving a total of 70 analyses per PC. In 100 PCs, there were 7000 analyses, the total of this validation. Mir-191 was selected as an internal control for miRNA input and reverse transcription efficiency because the miRNA was most highly expressed on six different days of storage (Pontes et al., 2015). All real-time quantitative PCR (RQ-PCR) reactions were performed in triplicate for both miRNA.

To quantify miRNA levels of miR-145-5p, miR-150-5p, miR-183-5p, miR-26a-5p, miR-331-3p, miR-338-5p, miR-451a, miR-501-3p, miR-99b-5p, miR-1304-3p, miR-411-5p, miR-432-5p, miR-668-3p, and miR-939-5p, miRNA was isolated from 100 different PC units, using mirVana™ miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

The miRNA was reverse transcribed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific) with TaqMan microRNA Assays for miR-145-5p (002278), miR-150-5p (000473), miR-183-5p (002269), miR-26a-5p (000405), miR-331-3p (002233), miR-338-5p (002658), miR-451a (001141), miR-501-3p (001047), miR-99b-5p (000436), miR-1304-3p (002874), miR-411-5p (001610), miR-432-5p (001026), miR-668-3p (467282_mat), and miR-939-5p (002182) to RQ-PCR. Complementary DNA was then amplified by real-time PCR using the TaqMan Universal Master Mix II with UNG (Thermo Fisher Scientific) on a Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany).

Statistical analysis

To test the level of relative expression of the miRNAs, a first analysis of variance (ANOVA) test was applied in multiple comparisons between the days tested. Subsequently, a second ANOVA test was applied in multiple comparisons to estimate the significance of the relative mean of miRNAs in 100 PC units with ($p < 0.001$). A third Wilcoxon signed rank test ($p < 0.001$) between (second and fourth day) relative expression of the miRNAs was applied.

Analyses were done with GraphPad Prism™ Software (GraphPad Software, Inc., CA, USA, www.graphpad.com).

Supervised hierarchical cluster analysis and heatmaps of differential miRNA profiling in PC were performed using

the GENE-E module of the GenePattern 3.9.6 tool (<http://broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/>). Analysis with principal component analysis (PCA) was made using the ClustVis (Metsalu and Vilo, 2015). Ellipses were predicted with 95% confidence to ensure segregation between groups.

Results

Analyses de libraries sequenced

In this study, we analyzed data from six libraries sequenced with next-generation sequencing (NGS), corresponding to the 6 days of storage, which generated 16–28 million reads (Table 2). The six libraries that were sequenced with NGS produced together a total of 108,557,843 high-quality reads (Supplementary Table S1). We identified the highest amount of precursors in the control PC ([GSM1515807], Table 2), with a total of 612 pre-miRNAs that were annotated to be expressed on the first day. However, this amount decreased in PCs from the second to the fifth day and increased only in the PCs of the last day ([GSM1515812], Table 2), with a total of 630 counted precursors.

This behavior was also monitored for the number of mature miRNAs. In the control PC, there were 807 mature miRNAs identified, corresponding to more than 5 million mapped readings, later there was a decrease according to the time of increasing storage. However, on the last day, there was an increase of 810 mature miRNAs (Table 2). The results of the amount of precursor and mature miRNAs are in Supplementary Table S2.

Comparison of differentially expressed miRNAs during platelet storage

When comparing the first day (storage control) with the second day of storage, we found 284 miRNAs differentially expressed in common; when we repeated this comparison between the first and third day of storage, we identified 290 miRNAs differentially expressed in common. All five comparisons of this genus are described in Supplementary Table S3.

We compared frequencies of occurrences of differentially expressed miRNAs between first versus second, first versus third, first versus fourth, first versus fifth, and first versus seventh storage, based on the Poisson distribution approach (Audic and Claverie, 1997). With this, we identified 50, 68, 157, 150, and 149 miRNAs, respectively (Supplementary Table S4). Of these five sets of miRNAs, we identified 14 common to all (Fig. 1A). Of the 14 miRNAs, 9 were expressed downregulated (miR-145, miR-150, miR-183, miR-26a-1, miR-331, miR-338, miR-451a, miR-501, and miR-99b), while

TABLE 2. DATA SUMMARY FOR MICRORNA PLATELETS

Categories	First day	Second day	Third day	Fourth day	Fifth day	Seventh day
Total reads number	16,212,635	13,594,963	17,214,842	25,325,847	16,161,626	28,515,834
High quality (Trimmed)	15,179,341	12,594,629	16,110,892	23,520,798	14,946,449	26,205,734
Precursor miRNA reads	1,273,327	1,318,186	1,235,562	1,442,130	1,122,239	1,275,954
Total: precursor miRNA	612	565	571	545	495	630
Mature miRNA reads	5,288,808	3,428,769	3,314,392	2,242,834	1,221,476	3,064,272
Mature miRNAs	807	739	737	704	622	810

The number of reads and miRNAs identified in platelet concentrate (PC) in the six samples studied. miRNA, microRNA.

the other five upregulated (miR-1304, miR-411, miR-432, miR-939, and miR-668).

Then, we identified the mature miRNAs of these precursors, based on the highest standard expression rates: miR-145-5p, miR-150-5p, miR-183-5p, miR-26a-5p, miR-331-3p, miR-338-5p, miR-451a, miR-501-3p, miR-99b-5p, miR-1304-3p, miR-411-5p, miR-432-5p, miR-668-3p, and miR-939-5p, (Supplementary Table S5). This estimation of expression quantification was inferred based on the number of sequences generated, which was proportional to the abundance of transcripts (Weyrich, 2012). In Table 3, 14 miRNAs are differentially expressed in our PCs. Detailed information on these miRNAs is shown in the expression profile, FC and mature sequence, and specific arm annotation (5p-arm/3p-arm).

Profile of quantified miRNAs in PC

The quantitative variation of the miRNAs establishes the predominance of a pattern of expression, since the downregulated profile in the greater quantity in the PC was more stable and was normalized to a total of 97,633 RPM, while the upregulated profile normalized to a total of 24,694 RPM.

This result confirms analysis of the unsupervised cluster of miRNAs with distinctly defined expression profile when stored in a blood bank for more than 5 days, as shown in Fig. 1B. Expression variation of miRNAs on the Log₁₀ scale with normalized expression reflected the signature of miRNA profiles during storage. The downregulated profile had a normalized expression rate between 10 and slightly above 10,000 RPM. We noticed the decrease in the expression of most of these miRNAs on the fourth and seventh day, except for the miR-99b that presented the highest level of normalized expression (Fig. 1C).

We identified nine mature miRNAs with a downregulated profile (miR-145-5p, miR-150-5p, miR-183-5p, miR-26a-5p, miR-331-3p, miR-338-5p, miR-451a, miR-501-3p, and miR-99b-5p) que that correspond to 97,633 reads that were mapped from 84,605 reads of their pre-miRNAs, (Supplementary Table S5). Upregulated miRNAs varied normalized expression between 10 and 10,000 RPM. miR-432 obtained the highest normalized expression rate (Fig. 1D). For five mature miRNAs with an upregulated profile (miR-1304-3p, miR-411-5p, miR-432-5p, miR-668-3p, and miR-939-5p), 24,694 reads from 72,705 reads of their pre-miRNAs were mapped (Supplementary Table S5).

Validation of differentially expressed miRNAs by RQ-PCR

We validate 14 miRNAs by RQ-PCR in 100 PC units to test differential expression results in the NGS data (Supplementary Table S6). The relative quantification pattern of these miRNAs confirms the results obtained by NGS. We confirmed the downregulated profile of miR-145-5p, miR-150-5p, miR-183-5p, miR-26a-5p, miR-331-3p, miR-338-5p, miR-451a, miR-501-3p, and miR-99b-5p. For example, expression levels of miR-150-5p, miR-501-3p, miR-338-5p, and miR-99b-5p showed that they were the first to decrease during PC storage (Fig. 2).

When we compared these changes in 100 PC units, the mean expression of these miRNAs was the lowest, compared with the other six miRNAs that were also confirmed in our validation (Fig. 2D–I). On the contrary, miRNAs upregulated miR-1304-3p, miR-411-5p, miR-432-5p, miR-668-3p, and

TABLE 3. FOURTEEN DIFFERENTIALLY EXPRESSED MICRORNAs MOST COMMON IN FIVE CONDITIONS

miRNA	miRBase: (5p-arm/3p-arm)	Log ₂ fold-change = (target/control)														Profile
		Second/		Third/		Fourth/		Fifth/		Seventh/		p-Value	Profile			
first	p-Value	first	p-Value	first	p-Value	first	p-Value	first	p-Value	first	p-Value			first	p-Value	
miR-145	5p-guccaguuuccaggaaucuccu	-2.13	0.00005 (**)	-1.85	0.00453 (*)	-1.98	0.00000 (**)	-1.92	0.00000 (**)	-3.04	0.00000 (**)	Downregulated				
miR-150	5p-ucuccaaccuuuuacacagug	-2.08	0.03883 (**)	-3.43	0.00000 (**)	-2.82	0.00000 (**)	-1.58	0.00000 (**)	-3.47	0.00000 (**)	Downregulated				
miR-183	5p-uauaggcacuuguaauucacu	-2.04	0.00366 (**)	-1.72	0.00000 (**)	-1.15	0.00000 (**)	-1.23	0.00057 (**)	-1.54	0.00002 (**)	Downregulated				
miR-26a-1	5p-uucagaauuaccaggauaggu	-1.20	0.00036 (**)	-1.23	0.05688 (*)	-2.95	0.00000 (**)	-1.41	0.00000 (**)	-3.74	0.00000 (**)	Downregulated				
miR-331	3p-gcccugggcuuuccuagaa	-1.25	0.00423 (*)	-1.99	0.00092 (**)	-3.20	0.00000 (**)	-2.03	0.00000 (**)	-2.49	0.00000 (**)	Downregulated				
miR-338	5p-aacauuaccuggucugagug	-1.34	0.00630 (**)	-2.11	0.00000 (**)	-3.59	0.00000 (**)	-2.22	0.00000 (**)	-2.38	0.00000 (**)	Downregulated				
miR-451a	aaacguuacauuacugaguu	-1.25	0.00000 (**)	-1.20	0.00000 (**)	-2.48	0.00000 (**)	-2.20	0.02921 (*)	-2.70	0.00000 (**)	Downregulated				
miR-501	3p-aauagcaccgggcaagaaucu	-2.07	0.00000 (**)	-1.82	0.00000 (**)	-3.12	0.00000 (**)	-2.70	0.00000 (**)	-2.74	0.00000 (**)	Downregulated				
miR-99b	5p-caccguagaccgaccuuagg	-1.89	0.00000 (**)	-1.57	0.00000 (**)	-2.52	0.00000 (**)	-2.14	0.00000 (**)	-2.29	0.00000 (**)	Downregulated				
miR-1304	3p-ucacacuguaagccuaaccucc	2.58	0.00000 (**)	2.32	0.00000 (**)	1.91	0.00000 (**)	1.31	0.01760 (*)	1.54	0.00001 (**)	Upregulated				
miR-411	5p-uaguuagaccuauagcuaagc	1.27	0.00000 (**)	1.47	0.00157 (*)	1.76	0.00000 (**)	2.38	0.00000 (**)	1.30	0.00001 (**)	Upregulated				
miR-432	5p-ucuuaggaguuaguuagggugg	1.28	0.00000 (**)	1.42	0.00000 (**)	2.23	0.00000 (**)	1.77	0.00000 (**)	1.90	0.00000 (**)	Upregulated				
miR-668	3p-ugucacucgucggcccaacuac	1.57	0.00000 (**)	1.22	0.00007 (**)	1.15	0.00000 (**)	1.04	0.00133 (**)	1.09	0.00048 (**)	Upregulated				
miR-939	5p-uggggagcugaggcucuggggug	1.00	0.00000 (**)	1.45	0.00000 (**)	2.35	0.00000 (**)	2.31	0.00000 (**)	2.26	0.00000 (**)	Upregulated				

The absolute value of Log₂ (FC) > 1 or Log₂ (FC) < -1, and 0.01 ≤ p-value < 0.05 (***) after the p-value).

The absolute value of Log₂ (FC) > 1 or Log₂ (FC) < -1, and p-value ≤ 0.01 (****) after the p-value).

FC, fold-change; miRBase, the microRNA database.

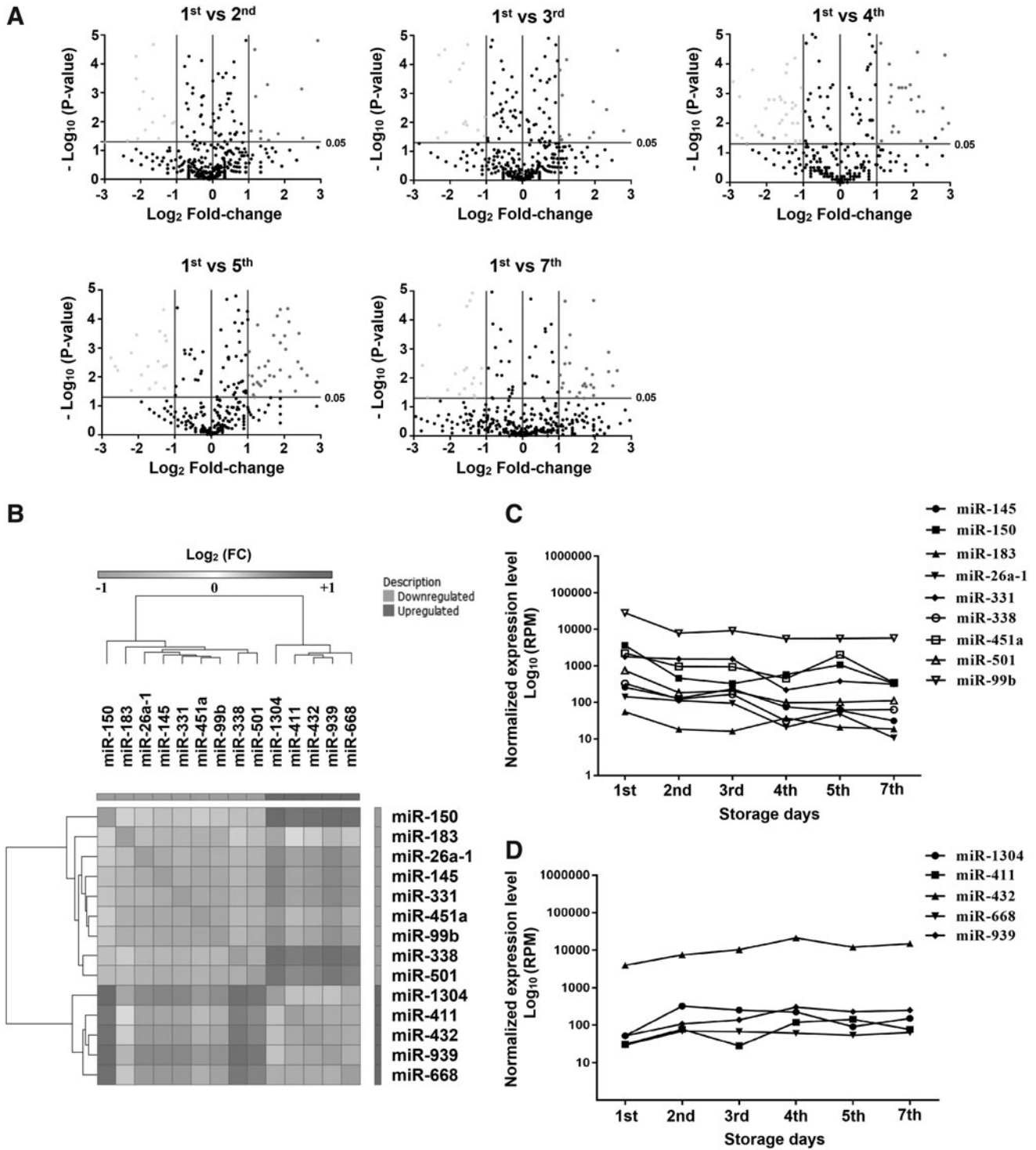


FIG. 1. Profile of quantified miRNAs in PC. (A) Volcano plots show the number of miRNAs differentially expressed in each comparison. In the X-axis, the values of FC, and in the Y-axis, the values of $\text{Log}_{10}(p\text{-value})$. The gradients in *light gray* represent the downregulated miRNAs, and the *dark gray*, upregulated miRNAs. (B) Heatmap shows distinctly defined expression profile of miRNAs when stored in a blood bank for more than 5 days. The Euclidean distance metric was used to group the miRNAs with similar profiles. (C) Standardized expression level on the Log_{10} scale (reads per million) of the downregulated miRNAs and (D) upregulated miRNAs. In graphs C and D, the X-axis shows normalized expression level values, and the Y-axis shows the days of storage. FC, fold-change; miRNA, microRNA; PC, platelet concentrate.

miR-939-5p, exhibited the highest mean relative expression in 100 PC unit (Fig. 3), surpassing the expression of the downregulated miRNAs.

Analysis of hierarchical clustering and PCA

The results of the expression levels of miRNAs obtained by NGS and their validation with RQ-PCR were analyzed with hierarchical clustering and PCA. In Illumina data, there were two groups in the hierarchical cluster that showed higher FC similarity, clearly showing the two expression profiles in the PC (Fig. 4A).

The hierarchical cluster also showed how the variation of the mean relative expression reflected the instability of the miRNAs half-life on the fourth day of PC storage. This means that there was a gradual decrease in the number of miRNAs, mainly after the fourth day of platelet storage, where the miRNAs were quantified below the predicted mean for both expression profiles, as shown in Figures 2 and 3.

We used a PCA analysis and identified in the NGS data that the miRNAs were grouped with separate ellipses, displaying the difference between the two expression profiles (down- and upregulated) (Fig. 4C). The relative quantification data observed by both the hierarchical grouping (Fig. 4B) and the clustering, established by the overlapping ellipses of the PCA (Fig. 4D), confirmed the variation in the mean expression of all miRNAs after the fourth day.

Consequently, this variation in expression reflected the decrease in the amount of miRNAs during platelet storage. For all the miRNAs, we tested with Wilcoxon signed rank test ($p < 0.001$) this variation between the second and fourth day (Figs. 5 and 6). We conclude that the miRNAs presented the smallest relative expressions in the PCs of the fourth day and probably decreased during the last 2 days of storage. For example, miR-150-5p, miR-501-3p, miR-338-5p, and miR-99b-5p (Fig. 5) presented the smallest relative expressions in the PCs of the fourth day when compared with the upregulated

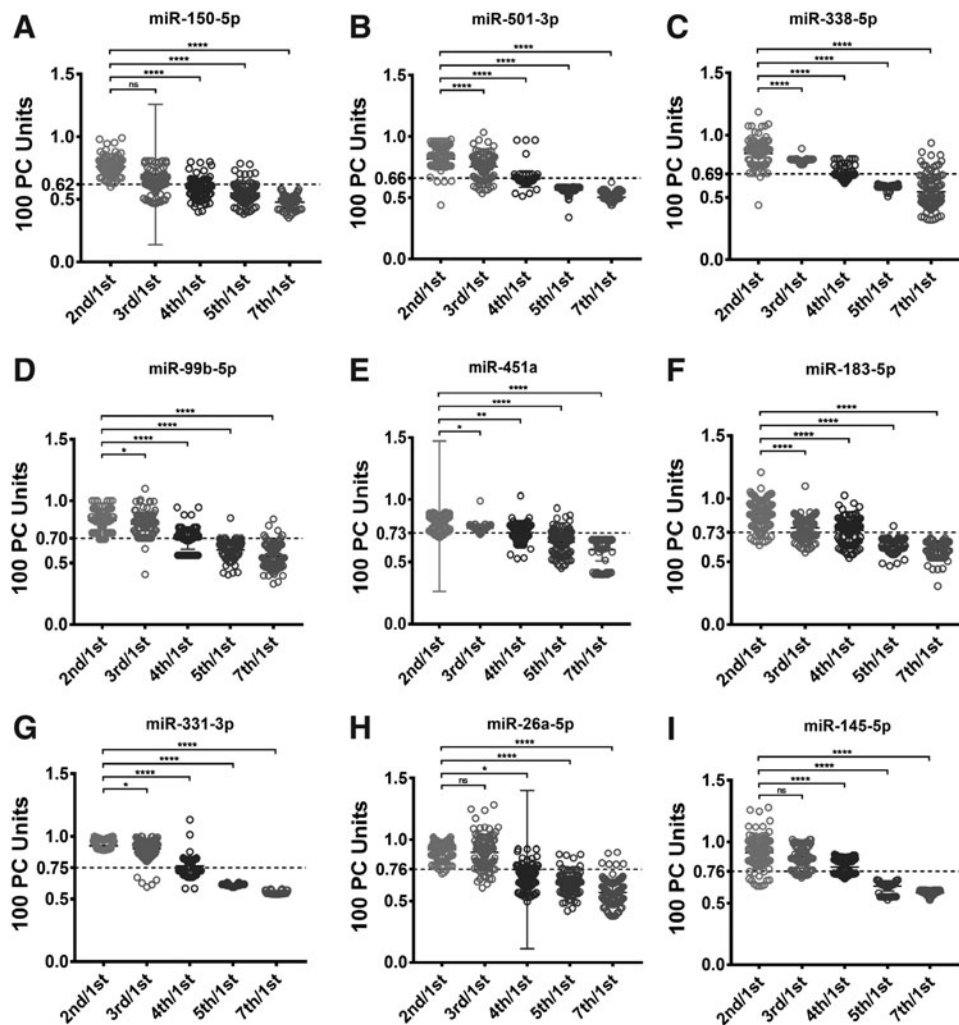


FIG. 2. Relative mean expression of miRNAs downregulated (RQ-PCR analysis). In the experiment, miR-150-5p, miR-501-3p, and miR-338-5p (A–C) presented an average of 0.6 of expression level in 100 PC units, while the others (D–I) had an average of 0.7. ANOVA was applied in multiple comparison tests to estimate the significance of the relative mean of miRNAs in 100 PC units. (ns, not significant, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $****p < 0.001$). In all graphs, the X-axis shows the storage time of the PCs, and the Y-axis, the 100 PC units. ANOVA, analysis of variance; RQ-PCR, real-time quantitative PCR.

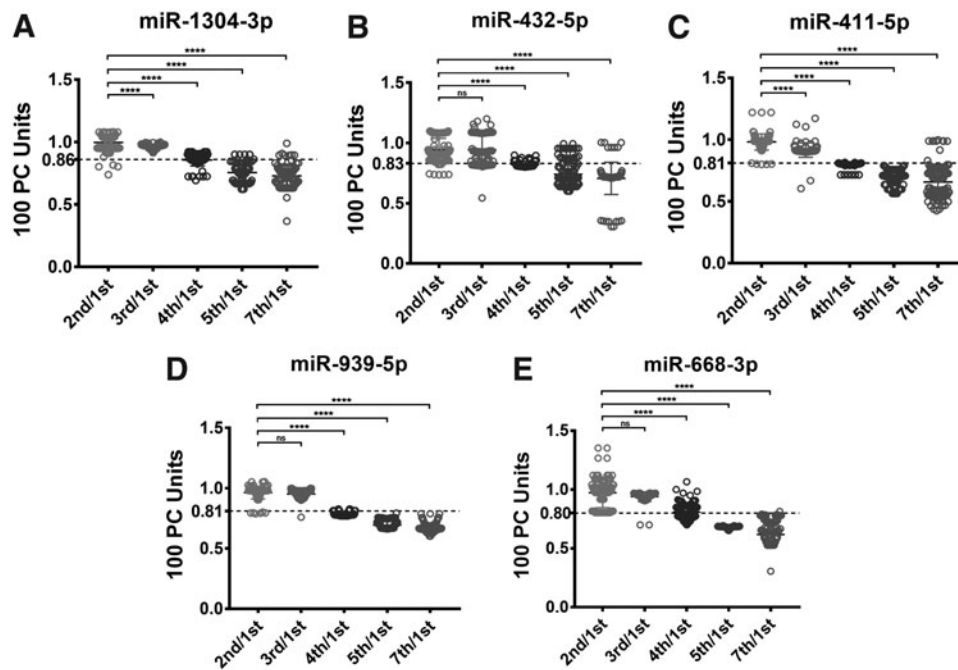


FIG. 3. Relative mean expression of miRNAs upregulated (RQ-PCR analysis). In the experiment, the upregulated (A–E) presented mean expression level 0.8 in 100 PC units. ANOVA was applied in multiple comparison tests to estimate the significance of the relative mean of miRNAs in 100 PC units. (ns, not significant, **** $p < 0.001$). In all graphs, the X-axis show the storage time of the PCs, and the Y-axis, the 100 PC units.

miRNAs (Fig. 6). These results provide a reliable prediction of differentially expressed miRNAs for the fourth day tested.

Discussion

Platelets circulate in the blood for ~ 5 days, and after that period, they are withdrawn from the circulation and destroyed in the spleen. Analogously, this aging also happens *in vitro*, where blood banks in most countries despise the platelets after 5 days of storage (Árnason and Sigurjónsson, 2017). Aging is a progressive process of loss of physiological integrity, including molecular, cellular and organ impairment, and finally, increased chronic inflammation and vulnerability to disease and death. Research in screening molecular markers of age to predict or monitor the physiological decline associated with age and disease has experienced an unprecedented breakthrough in recent years (Yu et al., 2016).

In our previous study, we described the 10 most expressed miRNAs on the different storage days (Pontes et al., 2015). In this study, we focused the profile of miRNAs differentially expressed in PCs stored in a blood bank, which in our knowledge has not yet been reported. In these two types of analyses, we identified that the number of miRNAs decreased from the first to the fifth day of storage; however, the number of miRNAs increased on the seventh day (Table 2). For example, miR-223 is the most abundant in megakaryocytes and platelets (Sunderland et al., 2017) and was also found in large quantities in the present study on all days of storage (Supplementary Table S2), but was not identified as one of the most differentially expressed (Supplementary Table S4) due to the kinetics of its degradation, and this reason was not validated in the present study.

During storage the amount of miRNAs is expected to decrease (Yan et al., 2016), however, the amount of these transcripts increased from the fifth to the seventh day. This unexpected increase, if we take into account the gradual degradation of miRNAs during storage, was probably caused by platelet activation due to the aging caused by storage that may have released miRNA-rich microparticles (Boilard and Belleannée, 2016; Laffont et al., 2013). However, it is also likely that pre-miRNAs that regulate senescence were cleaved after the fifth day of enzymatic storage by RNA editing enzymes, RNases, and RNA helicases, thus increasing the number of miRNAs (Abdelmohsen et al., 2012).

Another hypothesis that could explain the increase in the number of miRNAs from the fifth to the seventh day assumes that precursor RNAs can undergo cleavage by producing fragments of small RNAs with a regulatory capacity to inhibit the translation of proteins in response to stress (Kato and Slack, 2013). In this case, the stress would also be due to the aging caused by the storage period of more than 5 days. However, posttranscriptional modifications may influence the biogenesis and stability of miRNAs during *ex vivo* storage, such as molecular changes in DICER1, reducing the number of miRNAs that strongly regulate reactivity (Nagalla et al., 2011).

To understand the changes that occur during PC storage, the differential expression of miRNAs seems to be a useful approach to identify possible changes in platelet physiology (Dahiya et al., 2015; Yan et al., 2016). Differential miRNA profiling can predict and monitor how miRNA molecule half-life varies and undergoes rapid changes in stability during storage days. It is believed that half-life of these small molecules in platelets can be very short, as abundant RNase in circulating blood rapidly degrades plasma RNA. When

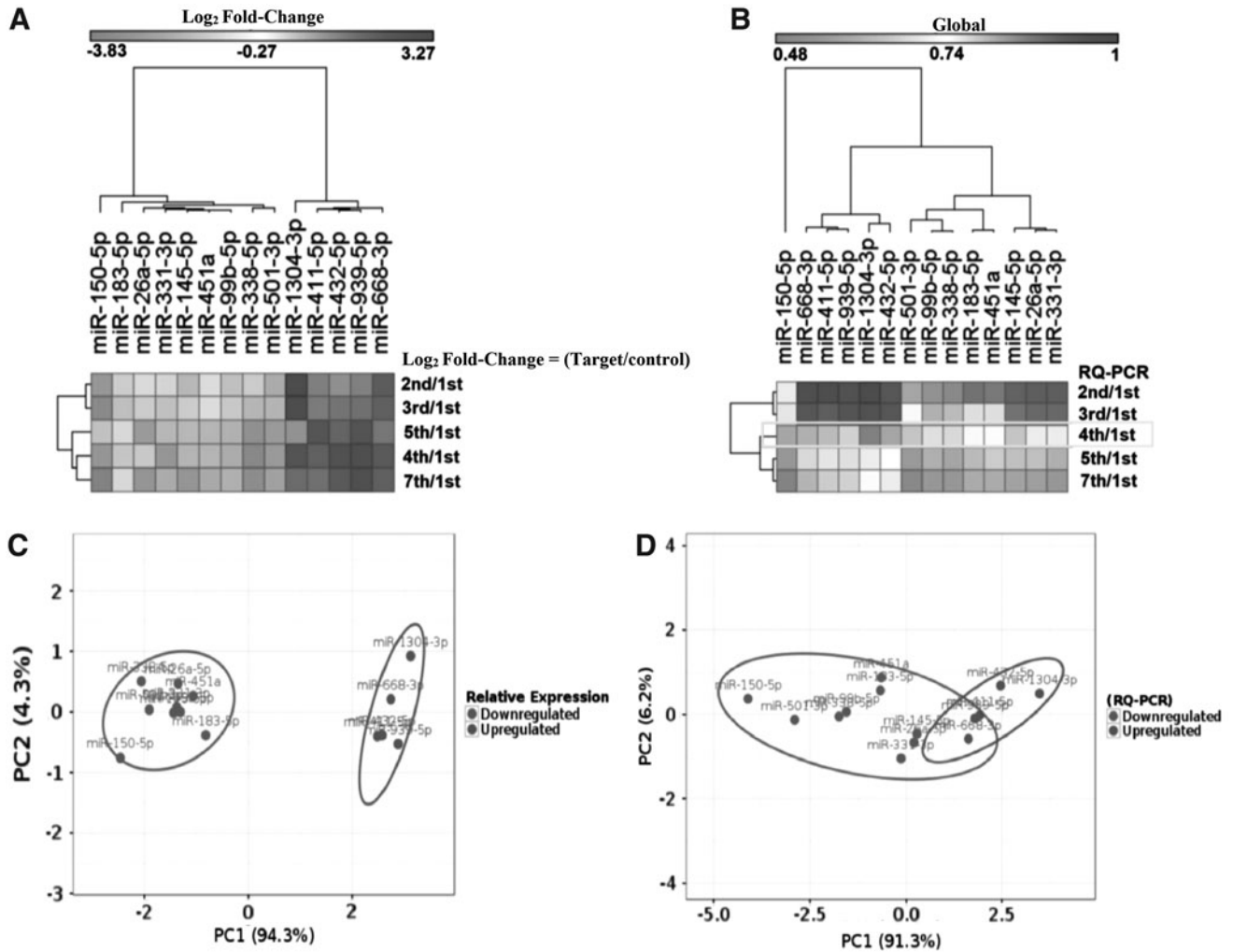


FIG. 4. Hierarchical clustering and PCA. Hierarchical clusters (A) and (B) show the correlation between the samples in the NGS and RQ-PCR data. In the NGS data, the heatmap generated two groups: miRNAs with downregulated profile were represented by *light gray* (low correlation), and miRNAs with upregulated profile were represented by *dark gray* (high correlation). The RQ-PCR data, the fourth day showed the limit between the high and low correlation represented by each profile. The Pearson correlation metric was used to generate the clusters. PCA (C) miRNAs in NGS data and (D) RQ-PCR data comparing by calculating the major components in the SVD. In graphs C and D, the X-axis shows the values of the main components 1, and the Y-axis, the main components 2. PCA, principal component analysis; NGS, next-generation sequencing; SVD, Unit Variance scale.

miRNAs are transported in circulating microparticles, they stabilize for their transport of action, mainly after activation (Diehl et al., 2012; Jansen et al., 2014).

The applicability of our study is related to obtaining a quality test for the PC bags. The differential expression profile of 14 miRNAs, common to the 6-day storage of PCs, can provide information on the *in vitro* aging of platelets. For example, miR-150-5p, miR-501-3p, and miR-338-5p had the lowest mean expression (Fig. 2) and suggest that the greater the decrease the greater the deterioration of stored platelets.

Our data revealed that there are more downregulated miRNAs than upregulated, which shows that platelets undergo aging *in vitro* and storage lesions by degradation of RNAs, since they do not present nucleus. Most of these miRNAs are associated with platelet physiology (Kannan et al., 2009; Edelstein and Bray, 2011). These miRNAs have been shown in other studies to have functional roles in the

storage of platelets and clinical utility platelets (Dahiya et al., 2015), regulation of extracellular matrix (Rutnam et al., 2013), cancer (Mangolini et al., 2014), cell migration (Urbich et al., 2008), cell cycle control (Bueno and Malumbres, 2011), aging process (Harries, 2014), and apoptosis (Yu et al., 2014). Specifically, the expression of miR-338-5p, miR-331-3p, and miR-99b-5p has been reported with platelet reactivity (Kaudewitz et al., 2016; Rowley et al., 2011).

On the fourth day of platelet storage, PCs are still suitable for transfusion and on fifth day most countries do not. We illustrate in our results the miRNAs that were quantified in the highest relative expression means on fourth day: miR-1304-3p, miR-432-5p, miR-411-5p, miR-668-3p, and miR-939-5p, (Fig. 3). These miRNAs can identify PCs from the fifth day of storage that still have physiologically normal platelets and are suitable for transfusion. Since on the fifth day, PC bags are discarded because the “majority of platelets” have storage

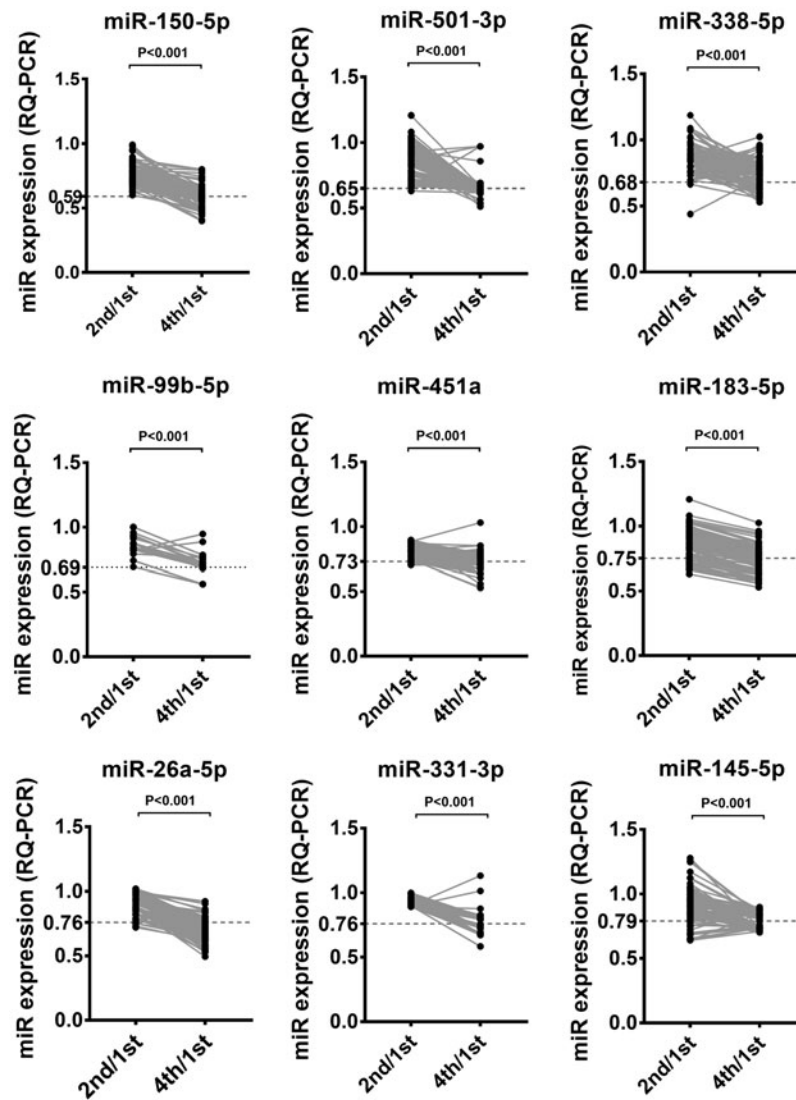


FIG. 5. RQ-PCR analysis of downregulated miRNAs on the fourth day of the PC. The quantitative expression of downregulated miRNAs in periods of advanced storage shows that on fourth day were significantly lower when compared with the second determined by Wilcoxon signed rank test ($p < 0.001$). In all graphs, the X-axis shows the storage time of the PCs, and the Y-axis, the values of RQ-PCR.

lesions, and the miRNAs can differentiate the minority that does not have these lesions, it is a hypothesis.

Depending on the number of blood donors with suboptimal health status (SHS), from which the PC bag is composed, there will be more or less durability of platelet physiology. SHS is characterized by (i) ambiguous health complaints, (ii) loss of vitality, (iii) chronic fatigue, and (iv) low energy levels within a period of 3 months. Individuals with SHS present a relative shortening of telomeres (Alzain et al., 2017) that may lead to early platelet aging.

On the contrary, the upregulated miRNAs are expressed on all storage days and should probably regulate genes that keep the platelet alive although activated or aged. These upregulated miRNAs are potential candidates to regulate platelet physiology in *ex vivo* conditions since they raise suspicion of the existence of posttranscriptional regulation mechanisms for controlling translation of mRNAs from apoptosis pathways that is a cause of PSL (Kannan et al., 2009; Yu et al.,

2014, 2015). Studies have pinpointed these miRNAs in biological pathways that are relevant to cancer (Romero-Cordoba et al., 2012).

This increased expression of miRNAs in PC suggests that the downregulated regulation of their targets (Kannan et al., 2009). Kannan et al. (2009) have demonstrated that during platelet storage in *ex vivo* conditions, target genes regulated by upregulated miRNAs are potentially downregulated, making it clear that platelets utilize posttranscriptional regulatory mechanisms to control translation of mRNAs that activate apoptotic pathways and accelerate cell death process (Kannan et al., 2009; Nagalla et al., 2011). Another study of this nature explored the regulation of miRNAs during platelet storage, showing that there is an association of apoptosis process with PSL and consequent loss of viability of these cells becoming ineffective *in vivo* after transfusion (Yu et al., 2014).

To make our understanding even clearer, we consulted an *in silico* analysis of predicted target genes regulated by

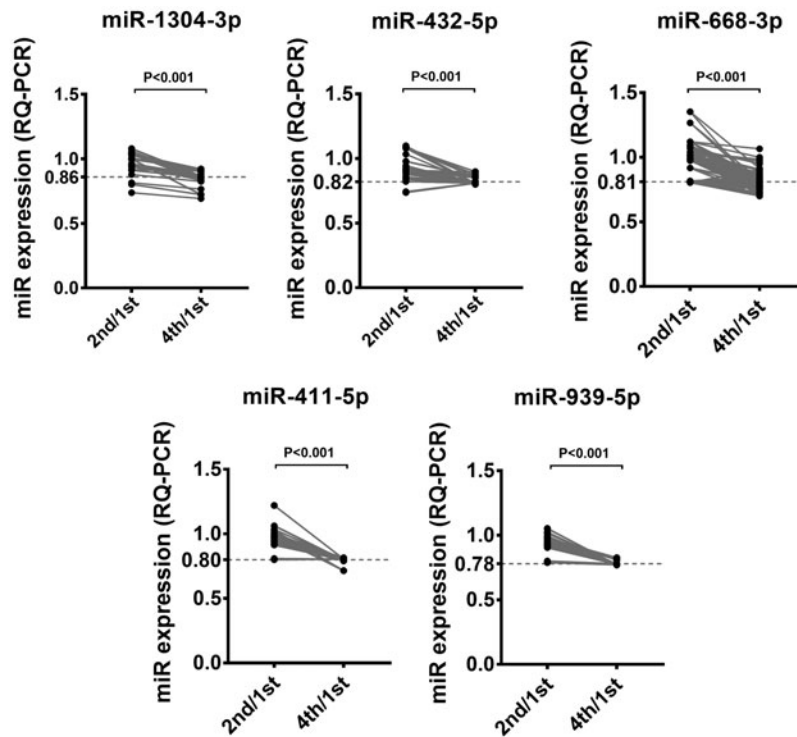


FIG. 6. RQ-PCR analysis of upregulated miRNAs on the fourth day of the PC. The quantitative expression of the upregulated miRNAs in periods of advanced storage shows that on fourth day were significantly lower when compared with the second determined by Wilcoxon signed rank test ($p < 0.001$). In all graphs, the X-axis shows the storage time of the PCs, and the Y-axis, the values of RQ-PCR.

these miRNAs with miRWalk (Dweep and Gretz, 2015) and PlateletWeb (Boyanova et al., 2011) (Supplementary Table S7). Through this consultation, we find the targets of these biologically relevant miRNAs that may help us in the future to understand the mechanisms of gene expression of platelets stored in blood banks.

The downregulated miRNAs (miR-150-5p, miR-501-3p, miR-338-5p, and miR-99b-5p) appear to regulate mitochondrial ATPase family genes, apoptosis, tyrosine kinase family proteins, and cell surface proteins, while upregulated miRNAs (miR-1304-3p e miR-432-5p) probably regulate genes that have been enriched in mitochondrial ATPase families, caspases, and proteins that act strongly on platelet aggregation. In the future, our results will be confirmed by absolute quantification to estimate the exact number of copies of each platelet miRNA (Yuan et al., 2006).

Conclusions

This study is important for transfusion medicine since miRNA biomarkers, such as those mentioned above, can be quantified rapidly before PC bags are discarded, which could then usefully inform future decision-making and governance in blood banks concerning PC quality.

Acknowledgments

This article was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant: 305220/2013-6 to R.M.R.B.), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA, to R.M.R.B.), the

Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Pará (HEMOPA, to C.de.F.A.M.-N. and L.M.L.), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, to J.H.da.S.M.).

Author Disclosure Statement

The authors declare that no conflicting financial interests exist.

References

- Abdelmohsen K, Srikantan S, Kang MJ, and Gorospe M. (2012). Regulation of senescence by microRNA biogenesis factors. *Ageing Res Rev* 11, 491–500.
- Abdi HH. (2007). The Bonferonni and Šidák corrections for multiple comparisons. *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. Vol. 1, 1–9.
- Alzain MA, Asweto CO, Zhang J, et al. (2017). Telomere length and accelerated biological aging in the china sub-optimal health cohort: A case–control study. *OMICS* 21, 333–339.
- Árnason NÁ, and Sigurjónsson ÓE. (2017). New strategies to understand platelet storage lesion. *ISBT Sci Ser* 1–5.
- Audic S, and Claverie J. (1997). The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 7, 986–995.
- Boilard E, and Belleannée C. (2016). (Dicer)phering roles of microRNA in platelets. *Blood* 127, 1733–1734.
- Bontekoe IJ, van der Meer PF, Mast G, and de Korte D. (2014). Separation of centrifuged whole blood and pooled buffy coats using the new CompoMat G5: 3 years experience. *Vox Sanguinis* 107, 140–147.

- Boyanova D, Nilla S, Birschmann I, Dandekar T, and Dittrich M. (2011). PlateletWeb: A systems biological analysis of signaling networks in human platelets. *Blood* 119, 22–35.
- Bruil A, Beugeling T, Feijen J, and van Aken WG. (1995). The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfus Med Rev* 9, 145–166.
- Bueno MJ, and Malumbres, M. (2011). MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 1812, 592–601.
- Cho J, Kim H, Song J, Cheong JW, et al. (2018). Platelet storage induces accelerated desialylation of platelets and increases hepatic thrombopoietin production. *J Transl Med* 16, 199.
- Dahiya N, Sarachana T, Vu L, Becker KG, et al. (2015). Platelet microRNAs: An overview. *Transfus Med Rev* 29, 215–219.
- Diehl P, Fricke A, Sander L, et al. (2012). Microparticles: Major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* 93, 633–644.
- Dweep H, and Gretz N. (2015). miRWalk2.0: A comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods* 12, 697.
- Edelstein LC, and Bray PF. (2011). MicroRNAs in platelet production and activation. *Blood* 117, 5289–5296.
- Edelstein LC, Mckenzie SE, Shaw C, et al. (2013). MicroRNAs in platelet production and activation. *J Thromb Haemost* 11, 340–350.
- Handigund M, Bae TW, Lee J, and Cho YG. (2016). Evaluation of in vitro storage characteristics of cold stored platelet concentrates with N acetylcysteine (NAC). *Transfus Apher Sci* 54, 127–138.
- Harries LW. (2014). MicroRNAs as mediators of the ageing process. *Genes* 5, 656–670.
- Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, et al. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16, 169.
- Högman CF. (1988). Immunologic transfusion reactions. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 89, 4–12.
- Jansen F, Yang X, Proebsting S, et al. (2014). MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc* 3, e001249.
- Kannan M, Mohan KVK, Kulkarni S, and Atreya C. (2009). Membrane array-based differential profiling of platelets during storage for 52 miRNAs associated with apoptosis. *Transfusion* 49, 1443–1450.
- Kato M, and Slack FJ. (2013). Ageing and the small, non-coding RNA world. *Ageing Res Rev* 12, 429–435.
- Kaudewitz D, Skroblin P, Bender LH, et al. (2016). Association of microRNAs and YRNAs with platelet function. *Circ Res* 118, 420–432.
- Laffont B, Corduan A, Ple H, et al. (2013). Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2-microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* 122, 253–261.
- Landry P, Plante I, Ouellet DL, et al. (2009). Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol* 16, 961–966.
- Leytin V. (2012). Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev* 26, 51–63.
- Mangolini A, Bonon A, Volinia S, et al. (2014). Differential expression of microRNA501-5p affects the aggressiveness of clear cell renal carcinoma. *FEBS Open Bio* 4, 952–965.
- Martin M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 17, 10–12.
- Metsalu T, and Vilo J. (2015). ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* 43(W1), W566–W570.
- Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. (2012). Technical Regulation of Hemotherapy Procedures. Ministério da saúde. (Brasil). Portaria MS no 1.353, de 13.06.2011.
- Nagalla S, Shaw C, Kong X, Kondkar A, et al. (2011). Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood* 117, 5189–5197.
- Opalinska JB, Bersenev A, Zhang Z, et al. (2010). MicroRNA expression in maturing murine megakaryocytes. *Blood* 116, e128–e138.
- Pontes TB, Moreira-Nunes CFA, Maués JHS, et al. (2015). The miRNA profile of platelets stored in a blood bank and its relation to cellular damage from storage. *PLoS One* 10, 6.
- Pope CA, Hansen, ML, Long RW, et al. (2004). Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ Health Perspect* 112, 339–345.
- Romero-Cordoba S, Rodriguez-Cuevas S, Rebollar-Vega R, et al. (2012). Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer. *PLoS One* 7, e31904.
- Romualdi C, Bortoluzzi S, D’Alessi F, and Danieli GA. (2003). IDEG6: A web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiol Genomics* 12, 159–162.
- Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, et al. (2011). Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 118, e101–e111.
- Rutnam ZJ, Wight TN, and Yang BB. (2013). MiRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. *Matrix Biol* 32, 74–85.
- Schubert P, and Devine DV. (2010). De novo protein synthesis in mature platelets: A consideration for transfusion medicine. *Vox Sanguinis* 99, 112–122.
- Schwartz H, Köster S, Kahr WHA, et al. (2010). Anucleate platelets generate progeny. *Blood* 115, 3801–3809.
- Sun Z, Evans J, Bhagwate A, et al. (2014). CAP-miRSeq: A comprehensive analysis pipeline for microRNA sequencing data. *BMC Genomics* 15, 1–10.
- Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, et al. (2017). MicroRNA biomarkers and platelet reactivity: The clot thickens. *Circ Res* 120, 418–435.
- Urbich C, Kuehbacher A, and Dimmeler S. (2008). Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79, 581–588.
- Vasconcelos E, Figueiredo AC, and Seghatchian J. (2003). Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and apheresis. *Transfus Apher Sci* 29, 13–16.
- Weyrich AS. (2012). Platelet mRNA: The meaning behind the message. *Curr Opin Hematol* 19, 385–391.
- Yan Y, Zhang J, Zhang Q, et al. (2016). The role of microRNAs in platelet biology during storage. *Transfus Apher Sci* 56, 147–150.
- Yu S, Deng G, Qian D, et al. (2014). Detection of apoptosis-associated microRNA in human apheresis platelets during storage by quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Blood Transfus* 12, 541–547.
- Yu S, Huang H, Deng, G, et al. (2015). miR-326 targets anti-apoptotic Bcl-xL and mediates apoptosis in human platelets. *PLoS One* 10, e0122784.
- Yu X, Wang Y, Kristic J, et al. (2016). Profiling IgG N-glycans as potential biomarker of chronological and biological ages: A community-based study in a Han Chinese population. *Medicine (Baltimore)* 95, e4112.

Yuan JS, Reed A, Chen F, and Stewart CN. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7, 85.

Address correspondence to:
Jersey Heitor da Silva Maués, MS
Laboratory of Human Cytogenetics
Institute of Biological Sciences
Federal University of Pará
Belem, PA 66075-110
Brazil

E-mail: jerseyhm@ufpa.br

Rommel Mário Rodriguez Burbano, PhD
Laboratory of Molecular Biology
Ophir Loyola Hospital
Belem, PA 66060-281
Brazil

E-mail: rommel@ufpa.br

Abbreviations Used

ANOVA = analysis of variance
DE = differential expression
FC = fold-change
GEO = Gene Expression Omnibus
miRBase = the microRNA database
miRNA = microRNA
NGS = next-generation sequencing
nt = nucleotides
PC = platelet concentrate
PCA = principal component analysis
PSL = platelet storage lesion
RPM = reads per million
RQ-PCR = real-time quantitative reverse transcription
SHS = suboptimal health status
SRA = sequence read archive
SVD = unit variance scale