



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**MICRORNAS Y VESÍCULAS EXTRACELULARES
EN SANGRE**

Tesis que presenta

Alonso Marino Chávez Valdespino

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Luis A. Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., diciembre 2024



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**MICRORNAS Y VESÍCULAS EXTRACELULARES EN SANGRE**”
presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular
fue elaborada por **Alonso Marino Chávez Valdespino** y aprobada el 6 de
diciembre de 2024 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la
División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y
Tecnológica, A.C.

Dr. Luis A. Salazar Olivo

Director de Tesis

Dra. Ana María Estrada Sánchez

Miembro del Comité Tutorial

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda

Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis A. Salazar Olivo.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU: 986305) y apoyos especiales del Comité de Becas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Esta tesis contó con el apoyo del Laboratorio de Microscopía para Muestras Biológicas, del laboratorio de Biología Estructural y del Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Dedicatorias

Le dedico este trabajo a mis padres Lucia y Ernesto, por su apoyo incondicional a mis sueños, por siempre inspirarme, darme ánimos y fuerzas para finalizar procesos y la confianza para que siga dedicándome a lo que amo.

A mi hermano Luis por también apoyarme e impulsarme a seguir creciendo con nuevas metas y sueños.

“Failing isn't a disaster, in fact, failure is part of science, if you never fail you are probably not at the forefront of your research activity.”

Paul Nurse, Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 2001

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por el apoyo institucional.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría.

A mi asesor el Dr. Luis A. Salazar Olivo que siempre busco brindarme todas las herramientas, me dio la confianza y libertad para desarrollar mi proyecto además de apoyarme en mi crecimiento personal y profesional no solo en la maestría.

Al Médico Genetista José de Jesús Vázquez Montante por su apoyo, y colaboración para poder obtener las muestras de sangre seca de los recién nacidos.

Al Hospital Del Niño y La Mujer “Dr. Alberto López Hermosa” y su personal por su colaboración para el proyecto y recolección de las muestras.

A la Mtra. Patricia Rodil García por sus consejos y asesoría teórica-práctica además de su invaluable amistad.

A mis compañeras y amigas María Isabel Martin Del Campo Andrade y Nataly Guzmán Herrera que me apoyaron mucho en el laboratorio.

A la Dra. Araceli Patrón por su apoyo con el microscopio electrónico de transmisión.

Al Dr. Samuel Lara Gonzales por su apoyo y facilitar acceso a sus equipos.

A Dr. Sergio Casas Flores por su apoyo y facilidades para acceder a sus equipos.

Al Dr. Nicolas Gómez Hernández por su apoyo y comentarios.

Al Dr. Saul Jijón Moreno por su apoyo y comentarios.

A la Dra. Ana María Estrada Sánchez, por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda, por sus comentarios y sugerencias.

A la Biol. Mireya Guadalupe Sánchez Garza por su apoyo brindado en el laboratorio.

A la Dra. María Teresa Rosales Saavedra por su apoyo técnico del laboratorio.

A Gloria López, por toda la ayuda brindada en el laboratorio de biotecnología médica y pecuaria.

Al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), por los servicios brindados.

Y a mis amigos Zeltzin, Kinberli, Luz, Karen y José Juan que sin su apoyo no hubiese tenido una gran experiencia y ánimos en la maestría.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vii
Contenido	ix
Índice de Tablas	x
Índice de Figuras	xi
Material Suplementario	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
MicroRNAs y vesículas extracelulares en sangre	1
1. Introducción	1
2. Métodos	3
2.1. Sujetos y recolección de muestras	3
2.2. Extracción de vesículas extracelulares (EVs)	4
2.6. Purificación de miRNAs	5
2.7. RT-PCR	6
2.8. Análisis de datos	7
3. Resultados	7
3.1. Características de las muestras	7
3.2 Recuperación de EVs a partir de DBS	8
3.3. Cuantificación de miRNAs en EVs obtenidas de DBS	10
3.4. Presencia de miRNAs específicos	12
4. Discusión	13
6. Referencias	16
7. Material Suplementario	20

Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados.	6
Tabla 2. Características de los neonatos donantes de las muestras de sangre.	7
Tabla 3. Estadística descriptiva de la concentración de miRNAs purificados	11

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de diseño experimental y estructuración de grupos para su posterior análisis.	4
Figura 2 Imágenes de microscopía de transmisión (TEM) de vesículas extracelulares obtenidas a partir de muestras de sangre seca.	9
Figura 3. Resultados del análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS).	10
Figura 4. Concentración de miRNAs de los diferentes grupos.	12
Figura 5. Presencia de miRNAs específicos por PCR en EVs a partir de DBS.	13

Material Suplementario

Figura Suplementaria 1. Geles de agarosa para miR-486 para grupo 2 y 4. Muestras en carriles 1-12 con marcador de peso (MP) en el carril 13 y en el carril 14 el control negativo (CN)	23
Figura Suplementaria 2. Geles de agarosa para miR-33b para grupo 2 y 4. Muestras en carriles 1-12 con marcador de peso (MP) en el carril 13 y en el carril 14 el control negativo (CN)	23
Figura Suplementaria 3. Geles de agarosa para miR-375 para grupo 2 y 4. Muestras en carriles 1-12 con marcador de peso (MP) en el carril 13 y en el carril 14 el control negativo (CN)	23
Tabla Suplementaria 1. Datos DLS de las muestras para tamaño de partícula	20
Tabla Suplementaria 2. Concentración de miRNAs para cada muestra por grupos.	22

Abreviaturas

DOHaD: *Developmental Origins of Health and Disease*; Ontogenia de la salud y la enfermedad.

miRNAs: MicroRNAs

EVs: *Extracellular Vesicles*; Vesículas extracelulares.

NBSC: *Newborn Screening Cards*; Tarjetas de tamiz neonatal.

DBS: *Dried Blood Spots*; Gotas de sangre seca.

ATPS: *Aqueous Two Phase System*; Sistema acuoso de dos fases.

DLS: *Dynamic Ligth Scattering*; Dispersión dinámica de la luz.

TEM: *Transmision Electron Microscopy*; Microscopía electrónica de transmisión.

CONAN: *Augmented Colorimetric Nanoplasmonic Assay*; Ensayo aumentado de colorimetría nanoplasmónica.

TP: Solución de trehalosa en PBS.

SAPs: *Soluble exogenous single and aggregated proteins*; Proteínas exógenas solubles y agregadas.

Resumen

Objetivo: Los miRNAs en las tarjetas de tamiz neonatal (NBSC) podrían servir como biomarcadores tempranos de enfermedades conforme a la teoría de la ontogenia de la salud y la enfermedad (DOHaD). Sin embargo, se desconoce si estos miRNAs en NBSC están libres o encapsulados en vesículas extracelulares (EVs). En este estudio se evaluó la presencia de miRNAs libres o encapsulados en EVs en muestras de sangre seca (DBS) en NBSC. También se evaluó el tratamiento de NBSC con una solución de trehalosa 25 mM (TP) y su impacto en el rendimiento de recuperación de miRNAs en DBS y EVs de NBSC.

Métodos: Quince muestras de sangre capilar de neonatos se colectaron en NBSC estándar y con pretratamiento TP. Posteriormente se recuperaron las EVs presentes en las DBS en NBSC mediante un sistema acuoso de dos fases (ATPS) y se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de la luz (DLS) y el ensayo aumentado de colorimetría nano plasmónica (CONAN). En cada muestra de DBS en NBSC, estándar y tratada con TP, se purificaron y cuantificaron los miRNAs totales y los miRNAs de EVs. Además, se identificaron por PCR a miR-486, miR-33b y miR-375 a partir de EVs de DBS en NBSC.

Resultados: Se observaron EVs con tamaños entre 20 y 100 nm en las muestras de DBS en NBSC. Se confirmó la presencia de miRNAs encapsulados en EVs. No se encontraron diferencias significativas entre las NBSC estándar y con tratamiento (TP) en el rendimiento de recuperación de miRNAs en EVs y DBS de NBSC. Fue confirmada la presencia de miR-33b, miR-486 y miR-375 en EVs de DBS en NBSC.

Conclusiones: Es posible aislar EVs y purificar miRNAs a partir de DBS en NBSC. Los miRNAs en DBS se encuentran en forma libre y encapsulados en EVs. El tratamiento de NBSC con TP no parece afectar la recuperación de miRNAs. Nuevas posibilidades para la investigación de EV-miRNAs en NBSC y su potencial como biomarcadores se plantean con este estudio, contribuyendo al área de la teoría de DOHaD.

Palabras clave: microRNAs, vesículas extracelulares, exosomas, tarjetas de tamiz neonatal, sangre seca, biomarcadores.

Abstract

Objective: MiRNAs on neonatal screening cards (NBSCs) could serve as early biomarkers of diseases according to the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) theory. It is unknown whether these miRNAs in NBSC are free or encapsulated in extracellular vesicles (EVs). This study evaluated the presence of free or encapsulated miRNAs in EVs in dried blood samples (DBS) in NBSC. A 25 mM trehalose (TP) solution in NBSC was assessed to see if it affected the recovery performance of miRNAs in DBS and EVS of NBSC.

Methods: Fifteen capillary blood samples from neonates were collected in standard NBSC and with TP pretreatment. The EVs present in DBS in NBSC were recovered using a two-phase aqueous system (ATPS) and analyzed by transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), and augmented nano plasmonic colorimetry assay (CONAN). In each DBS sample in NBSC, standard and treated with TP, total miRNAs, and from EVs, were purified and quantified. In addition, miR-486, miR-33b, and miR-375 were identified by PCR from EVs recovered from DBS at NBSC.

Results: EVs with sizes between 20 and 100 nm were observed in DBS samples. The presence of miRNAs encapsulated in EVs was confirmed. In the recovery of miRNAs with TP treatment, no significant differences were found concerning standard NBSC. The presence of miR-33b, miR-486, and miR-375 in EVS in NBSC samples was confirmed.

Conclusions: It is possible to isolate EVs and purify miRNAs from DBS in NBSCs. The miRNAs in DBS are in free form and encapsulated in EVs. Treatment of NBSC with TP does not appear to affect miRNA recovery. This study raises new possibilities for investigating EV-miRNAs in NBSC and their potential as biomarkers, contributing to the DOHaD theory area.

Keywords: microRNAs, extracellular vesicles, exosomes, newborn screening cards, dried blood, biomarkers.

1 **MicroRNAs y vesículas extracelulares en sangre**

2 **A. Marino Chávez-Valdespino¹, Isabel Martín del Campo-Andrade¹, Patricia Rodil-**
3 **García¹, José de Jesús Vázquez Montante², Francisco Goldaracena Orozco², Luis**
4 **A. Salazar-Olivo¹**

5 *¹Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria, División de Biología Molecular,*
6 *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la Presa San*
7 *José 2055, San Luis Potosí 78216, S.L.P., México.*

8 *²Hospital del Niño y la Mujer "Dr. Alberto López Hermosa" Blvd. Antonio Rocha*
9 *Cordero #2510, San Juan de Guadalupe, San Luis Potosí 78364, S.L.P., México.*

10 **Correspondencia:** Dr. Luis A. Salazar-Olivo. E-mail: olivo@ipicyt.edu.mx; ORCID:
11 0000-0001-6906-4561

12 **1. Introducción**

13 El concepto de la teoría de ontogenia de la salud y enfermedad (DOHaD; *Developmental*
14 *Origins of Health and Disease*) sugiere que el ambiente que rodea un individuo durante
15 su desarrollo fetal y neonatal influye en su salud a lo largo de toda la vida, incluyendo la
16 predisposición a la obesidad y las enfermedades metabólicas ^[1].

17 En este contexto, las tarjetas de tamiz neonatal (NBSC; *Newborn Screening Cards*) se
18 presentan como una oportunidad única para la investigación de biomarcadores
19 tempranos. Las NBSC, utilizadas en la prueba de tamizaje neonatal desde 1960,
20 consisten en tarjetas de papel filtro sobre las que se depositan gotas de sangre capilar,
21 obtenidas mediante punción del talón del neonato. En la actualidad, estas tarjetas se
22 utilizan para la detección de enfermedades metabólicas a través del análisis de proteínas
23 y enzimas ^[2]. Sin embargo, las NBSC también contienen una gran cantidad de
24 información molecular y se ha comprobado que es posible analizar DNA, RNA mensajero
25 y RNAs no codificantes a partir de ellas ^[3,4].

26 Entre estos RNAs no codificantes se encuentran los microRNAs (miRNAs), que son
27 pequeñas moléculas de RNA que participan en la regulación de la expresión

28 postranscripcional, al unirse a secuencias complementarias específicas de los RNA
29 mensajeros. El descubrimiento de los miRNAs y su papel en la regulación génica ha
30 revolucionado nuestra comprensión de diversos procesos biológicos, incluyendo el
31 desarrollo, la diferenciación celular y la respuesta a enfermedades [5].

32 Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron la factibilidad de analizar miRNAs
33 circulantes en muestras de sangre seca (DBS; *Dried Blood Spots*) obtenidas de NBSC
34 [6,7]. Estos estudios abren nuevas posibilidades para la investigación de biomarcadores,
35 el estudio de la expresión génica y la comprensión de los mecanismos moleculares
36 subyacentes a diversas condiciones de salud y enfermedad. El uso de NBSC para el
37 análisis de miRNAs presenta ventajas en comparación con muestras de sangre fresca,
38 como la facilidad de recolección, manejo y almacenamiento, el bajo costo, y la mínima
39 invasividad [8,9].

40 Si bien se ha demostrado la presencia de miRNAs circulantes en NBSC^[7,10], aún se
41 desconoce si estos miRNAs circulan libremente en sangre o encapsulados en vesículas
42 extracelulares, como los exosomas. Los exosomas son nano vesículas secretadas por
43 las células que desempeñan un papel fundamental en la comunicación intercelular. Estas
44 vesículas transportan una variedad de moléculas, incluyendo proteínas, lípidos y miRNAs
45 [11]. Se plantea que la encapsulación exosomal de miRNAs les confiere protección contra
46 la degradación y facilita su transporte a través de fluidos biológicos, como la sangre. [9,11].

47 Determinar la condición libre o encapsulada en vesículas exosomales de los miRNAs
48 circulantes en sangre y presentes en DBS podría proporcionar información valiosa sobre
49 su origen, estabilidad y función biológica. El objetivo de este estudio fue determinar si los
50 miRNAs que se han obtenido previamente a partir de DBS en NBSC circulan en sangre
51 libres o encapsulados en EVs, los miRNAs seleccionados son el miR-33b, el miR-486 y
52 el miR-375 que se encuentran relacionados con la macrosomía en neonatos o bien se
53 encuentran relacionados en procesos metabólicos relacionados a la obesidad [6,7,12]. Por
54 otra parte se evaluó el efecto de un pretratamiento de las tarjetas con una solución de
55 trehalosa 25 mM (TP), en el rendimiento de recuperación de miRNAs a partir de DBS y
56 EVs en DBS en NBSC. Esta investigación contribuirá al conocimiento sobre la presencia
57 y estabilidad de los miRNAs en EVs a partir de DBS en NBSC, un área poco explorada

58 hasta ahora, y que podría tener implicaciones importantes en el futuro para el estudio de
59 biomarcadores al inicio de la vida.

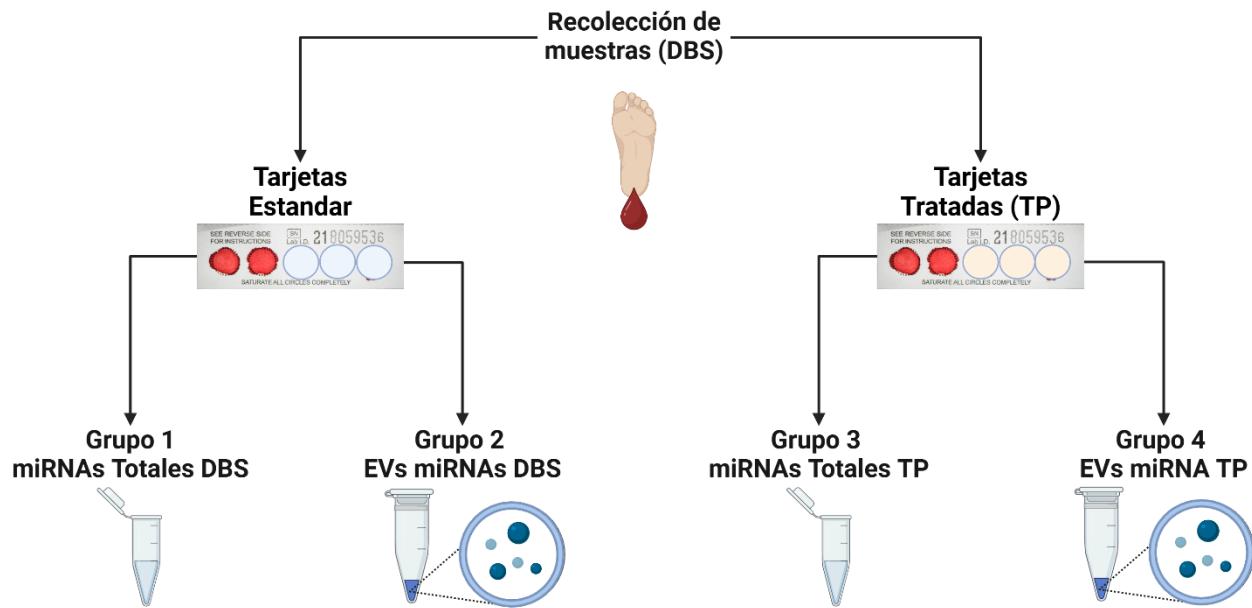
60 **2. Métodos**

61 **2.1. Sujetos y recolección de muestras**

62 Quince muestras de sangre capilar se recolectaron en el Hospital del Niño y la Mujer "Dr.
63 Alberto López Hermosa" en San Luis Potosí, SLP, México; con previa autorización de los
64 padres, a través de un consentimiento informado. La toma de muestra se realizó
65 mediante punción del talón, siguiendo el lineamiento técnico establecido por la Secretaría
66 de Salud de México para la obtención de muestras sanguíneas para tamiz neonatal ^[13].

67 Se recolectaron las gotas de sangre de recién nacidos de entre 5 días a 1 mes de edad
68 sobre una tarjeta de papel Whatman 903 estándar o sobre el mismo papel filtro pretratado
69 con una solución de trehalosa 25 mM en PBS (TP), asegurando el mismo tiempo de
70 secado mínimo (2 h), posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 10$
71 $^{\circ}\text{C}$) y humedad ambiente (30%-60%) protegidas de la luz, durante un período de 4 a 6
72 meses hasta su análisis. Las DBS se dividieron en cuatro grupos como se muestra en la
73 **Figura 1.**

74 Durante la toma de muestra se registraron los siguientes datos: fecha de toma de
75 muestra, fecha de nacimiento, tipo de parto, semanas de gestación, sexo, peso y talla al
76 nacer, tipo de alimentación, y complicaciones durante el parto y el embarazo.



77

78 **Figura 1.** Diagrama de flujo de diseño experimental y estructuración de grupos para su posterior análisis.
79 **Grupo 1:** Muestras en NBSC sin pretratamiento de las cuales se purificaron miRNAs totales. **Grupo 2:**
80 Muestras en NBSC sin tratamiento previo de las cuales se separaron las EVs por ATPS previo a la
81 purificación de miRNAs. **Grupo 3:** Muestras en NBSC con pretratamiento TP de las cuales se purificaron
82 miRNAs totales. **Grupo 4:** Muestras en NBSC con pretratamiento TP de las cuales se separaron las EVs
83 por ATPS previo a la purificación de miRNAs.

84

85 2.2. Extracción de vesículas extracelulares (EVs)

86 Porciones de las DBS (equivalentes a ~40 μ L de sangre) se solubilizaron en 1 mL de
87 PBS (Grupo 1 y 3) o en 1 mL de solución TP (Grupo 2 y 4) durante 12 h a 4 °C. Los
88 sobrenadantes obtenidos se procesaron por el método del sistema acuoso de dos fases
89 (ATPS) propuesto por Kırbaş et al. (2019), con modificaciones. A continuación, se
90 describe el proceso: las muestras rehidratadas se centrifugaron a 20,000 x g durante 30
91 min a 4 °C. Los sobrenadantes resultantes se filtraron a través de membranas 0.22 μ m
92 Durapore® de difluoruro de poli vinilideno (PVDF) (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA)
93 y se mezclaron con una solución de trabajo ATPS, compuesta por 1.65% (p/v) de dextrán
94 y 3.35% (p/v) de polietilenglicol en agua proveniente del sistema de agua ultrapura Milli-
95 Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Estas mezclas se centrifugaron a 10,000 x g durante 10
96 min a 4 °C. Los sedimentos obtenidos se lavaron dos veces, eliminando el 80% del
97 sobrenadante y reemplazándolo con solución de ATPS diluida 1:1 en agua. Finalmente,
98 se recuperó la fracción resultante (20%) para posteriores análisis.

99 **2.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

100 La solución recuperada mediante ATPS se analizó por TEM. Se utilizaron soportes de
101 cobre con Formvar/Carbón de número de malla 200 (TED PELLA, California, USA,
102 01800-F). La malla se sumergió en una solución de azul de alciano (1%) durante 5 min
103 y luego en ácido acético (1%) durante 1 min. Después, se colocó una gota de la muestra
104 en la rejilla y se permitió sedimentar durante 10 min. Se realizó la tinción negativa
105 cubriendo la rejilla con una solución de molibdato de amonio al 2%, pH de 7.19 durante
106 2 min ^[15]. Las muestras se procesaron en un microscopio JEM-200 CX (JEOL, Tokio,
107 Japón).

108 **2.4. Dispersión dinámica de la luz (DLS)**

109 La distribución de tamaños de partícula para las EVs en las muestras se analizó mediante
110 DLS empleando un dispersor Zetasizer® APS (Malvern, Herrenberg, Germany). Se
111 analizaron 100 µL de la muestra diluida 1:5. Las mediciones se realizaron en una posición
112 fija con un atenuador automático a 25°C. El experimento se realizó por duplicado. Se
113 obtuvieron los siguientes parámetros de las mediciones de DLS: diámetro hidrodinámico,
114 índice de polidispersividad y distribución de tamaño. Los datos se analizaron utilizando
115 el software de Zetasizer® (Malvern, Herrenberg, Germany) ^[16].

116 **2.5. Ensayo aumentado de colorimetría nanoplasmónica (CONAN)**

117 La síntesis de nanopartículas se realizó mediante el método de Turkevich, seguido por
118 el ensayo de colorimetría conforme lo reportan ^[17]. Se utilizó dimiristoilfosfatidilcolina
119 (DMPC) como estándar y el cambio de color se observó visualmente.

120 **2.6. Purificación de miRNAs**

121 Los miRNAs se purificaron a partir de DBS de todos los grupos utilizando el kit
122 miRNEASY® Advanced (Qiagen, Hilden, Germany, 217204), siguiendo las instrucciones
123 del fabricante con una modificación, en el paso previo a la adición de isopropanol se
124 agregaron 0.3 µL de glicógeno grado biología molecular (Thermo Scientific, Cat. No.
125 R0561) como co-precipitante ^[18].

126 La concentración de los miRNAs purificados se determinó mediante fluorómetro, el
127 Qubit® 2.0 empleando el kit Qubit® microRNA Assay (Invitrogen, Cat. No. Q32880), de
128 acuerdo con las instrucciones del fabricante^[18].

129 **2.7. RT-PCR**

130 Se una realizó retro transcripción usando un volumen fijo de RNA (2 µL) para todas las
131 muestras. Se añadió 2 µL de primer stem-loop (1 µM), 2 µL de mezcla de dNTPs (10
132 mM), 0.1µL de transcriptasa reversa M-MLV (200 U/µL) (Promega, Madison, WI, USA),
133 4 µL de M-MLV RT 5 x Reaction Buffer, 0.03 µL de RNasin inhibitor (2,500 U/µL), y agua
134 libre de nucleasas para un volumen final de 20 µL por reacción. Las reacciones fueron
135 incubadas a 16°C por 30 min, seguidas por 60 ciclos a 30°C por 30 s, 42°C por 30 s, y
136 50°C por 1 s. Al final se incubaron a 85°C por 5 min.^[19]

137 La reacción de PCR se llevó a cabo usando un volumen fijo de cDNA (2 µL) para todas
138 las muestras. Se añadió 0.2 µL de primer forward y 0.2 µL de primer reverse (10 µM), 0.4
139 µL de mezcla de dNTPs (10 mM), 0.1 µL de polimerasa (200 U/µL) (New England Biolabs,
140 Ipswich, MA, USA), 4 µL de Buffer de reacción, y agua libre de nucleasas para un
141 volumen final de 20 µL por reacción. Las reacciones fueron incubadas a 95°C por 4 min,
142 seguidas por 45 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, y 72°C por 30 s. Al final se
143 incubaron a 85°C por 5 min.

144 Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% con
145 bromuro de etidio, en una corrida durante 50 min a 90V y 150 mA y se revelaron en una
146 cámara de transiluminación UV. La **Tabla 1** incluye todos los cebadores para las
147 reacciones de retro transcripción y PCR.

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados.

miRNA	Tipo	Secuencia
miR-33b	Stem-loop	5' GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACG CAA TG 3'
miR-375	Stem-loop	5' GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACT CAC GC 3'
miR-486	Stem-loop	5' GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACA CTC GGG 3'
miR-33b	Forward	5'-GTT TGG GTG CAT TGC TGT TG-3'

miR-375	Forward	5'-TGG TTT TTG TTC GTT CGG CT-3'
miR-486	Forward	5'-TGT TTT TTT TTT TCC TGT ACT GAG CTG-3'
Reverse	Reverse	5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'

148 Para cada primer se incluye el nombre del miRNA, el tipo de análisis y la secuencia.

149 **2.8. Análisis de datos**

150 Los datos obtenidos de TEM se analizaron con el software Image J para revisar
 151 morfología y medir el diámetro de las vesículas extracelulares [19]. En el caso del DLS,
 152 los datos se analizaron utilizando el software de Zetasizer® (Malvern, Herrenberg,
 153 Germany).

154 Para comparar entre los grupos considerando el número de muestras y que se
 155 desconoce la distribución de la población se condujeron pruebas no paramétricas. Para
 156 los datos de EVs (diámetro e índice de polidispersividad) se realizó una prueba U de
 157 Mann-Whitney. Para la concentración de miRNAs se condujo una prueba de Kruskal-
 158 Wallis con prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Todos los análisis estadísticos
 159 se realizaron en el apartado de gráficos de BioRender.com. La significancia estadística
 160 se estableció a partir de $p<0.05$.

161 **3. Resultados**

162 **3.1. Características de las muestras**

163 Se recolectaron 15 muestras de neonatos, de las cuales 60% pertenecieron a mujeres y
 164 40% a hombres. El peso promedio al nacimiento fue de 3.1 ± 0.8 kg y la talla fue de
 165 49.5 ± 5.5 cm, por lo que tenemos en promedio pesos y tallas normales. Las muestras se
 166 recolectaron en julio de 2023 de niños con máximo un mes de nacidos y se almacenaron
 167 a temperatura ambiente protegidas de la luz, durante un período de 4 a 6 meses antes
 168 de su análisis. La **Tabla 2** describe algunas características de la población muestreada.

Tabla 2. Características de los neonatos donantes de las muestras de sangre.

Características	Datos
n (% mujeres)	15 (60%)
Peso al nacimiento (kg)	2.3 kg – 3.9 kg (SD 0.5)
Talla al nacimiento (cm)	44 – 55 (SD 2.9)

Edad gestacional (semanas)	32-41 (SD 2.4)
Nacimiento múltiple (%)	Único (93.4%)
	Múltiple (6.6%)
	Ninguna (66.7%)
	Obesidad (6.6%)
Condiciones durante el embarazo (%)	Hipertensión (13.3%)
	Hipotensión (6.6%)
	Diabetes gestacional (6.6%)

169 SD. Desviación Estándar

170 **3.2 Recuperación de EVs a partir de DBS**

171 Se procesaron las muestras DBS en NBSC estándar y tratadas con TP mediante el
 172 método de ATPS dando origen a los grupos 2 y 4 respectivamente. A partir de las
 173 muestras procesadas, se identificó cualitativamente la presencia de EVs en las muestras
 174 mediante el ensayo CONAN. Este método se basa en la interacción entre las EVs y
 175 nanopartículas de oro (AuNPs), donde una solución con EVs induciría un cambio de color
 176 de rojo a azul, mientras que la presencia de proteínas exógenas solubles y agregadas
 177 (SAPs) impediría este cambio, manteniendo la solución roja. Como se observa en la
 178 **Figura 2 A**, el segundo pocillo corresponde a el control negativo para la prueba de
 179 CONAN y muestra un intenso color rojo, el cual tiene exclusivamente la presencia de
 180 AuNPs, a partir del tercer pocillo se puede observar una reducción en la intensidad del
 181 color, lo cual corresponde a la dilución en la concentración de las EVs, que va de 2% a
 182 0.02% Este ensayo nos permitió confirmar de forma cualitativa la presencia de EVs
 183 agregadas con AuNPs.

184 A partir de las muestras de los grupos 2 y 4, se mostró la presencia de estructuras
 185 circulares con el análisis de las muestras por TEM, y se observaron con un centro más
 186 claro y bordes oscuros, correspondientes a las estructuras reportadas como EVs en
 187 trabajos previos ^[15,20]. Se observaron estructuras con tamaños de entre 20 y 100 nm,
 188 tanto en el grupo 2 como en el grupo 4 (**Figura 2, B, C**). La forma como el tamaño de las
 189 estructuras identificadas son consistentes con la presencia de exosomas, los cuales han
 190 sido ampliamente asociados con el transporte de miRNAs ^[11,21]. No se observaron
 191 diferencias en la morfología entre ambos grupos.

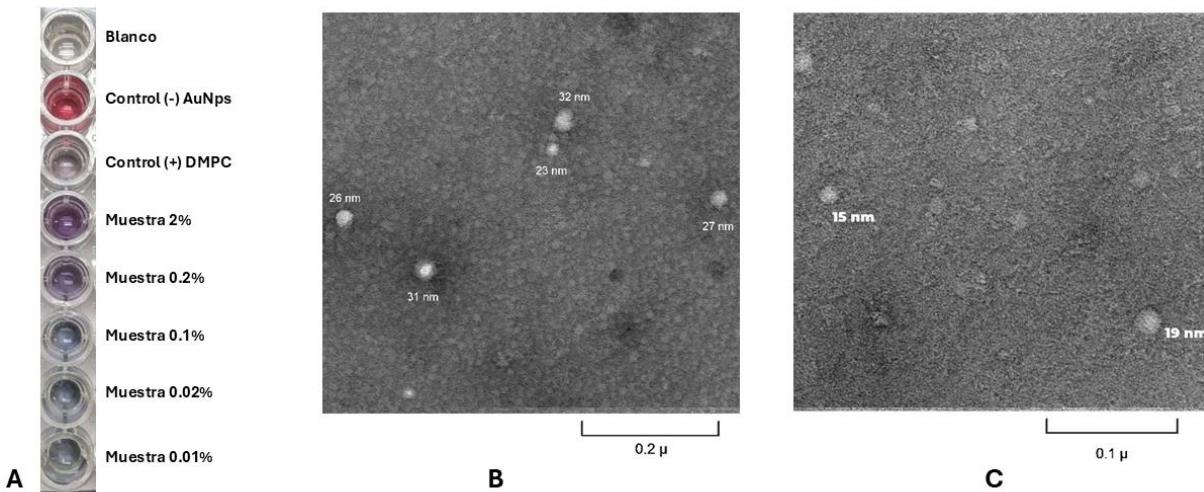


Figura 2 Imágenes de microscopía de transmisión (TEM) de vesículas extracelulares obtenidas a partir de muestras de sangre seca.

A: Prueba cualitativa de CONAN para muestra de vesículas extracelulares sin tratamiento TP. **B:** Micrografía de vesículas extracelulares en muestra DBS sin tratamiento TP grupo 1. **C:** Micrografía de vesículas extracelulares en muestra DBS con tratamiento TP grupo 2.

192 El análisis de DLS en los grupos 2 y 4 reveló una distribución de tamaños de partículas
 193 entre 30 y 600 nm por intensidad, y entre 10 y 100 nm por masa. En todas las muestras
 194 se observaron fracciones de entre 10 y 100 nm correspondientes a exosomas un tipo
 195 específico de EVs [22]. Las fracciones de mayor tamaño podrían corresponder a otro tipo
 196 de vesículas [23,24], pero dado que durante el método ATPS se realiza una filtración con
 197 membranas de 0.2 μ m este resultado se puede explicar por la presencia de exosomas
 198 agregados.

199 Del análisis DLS se obtuvieron otros parámetros como el diámetro hidrodinámico
 200 promedio de las EVs, el cual fue de 141.1 ± 112.3 nm para el grupo 2 y de 41 ± 23.25 nm
 201 para el grupo 4, mientras que el índice de polidispersidad fue de 0.633 y de 0.321,
 202 respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre

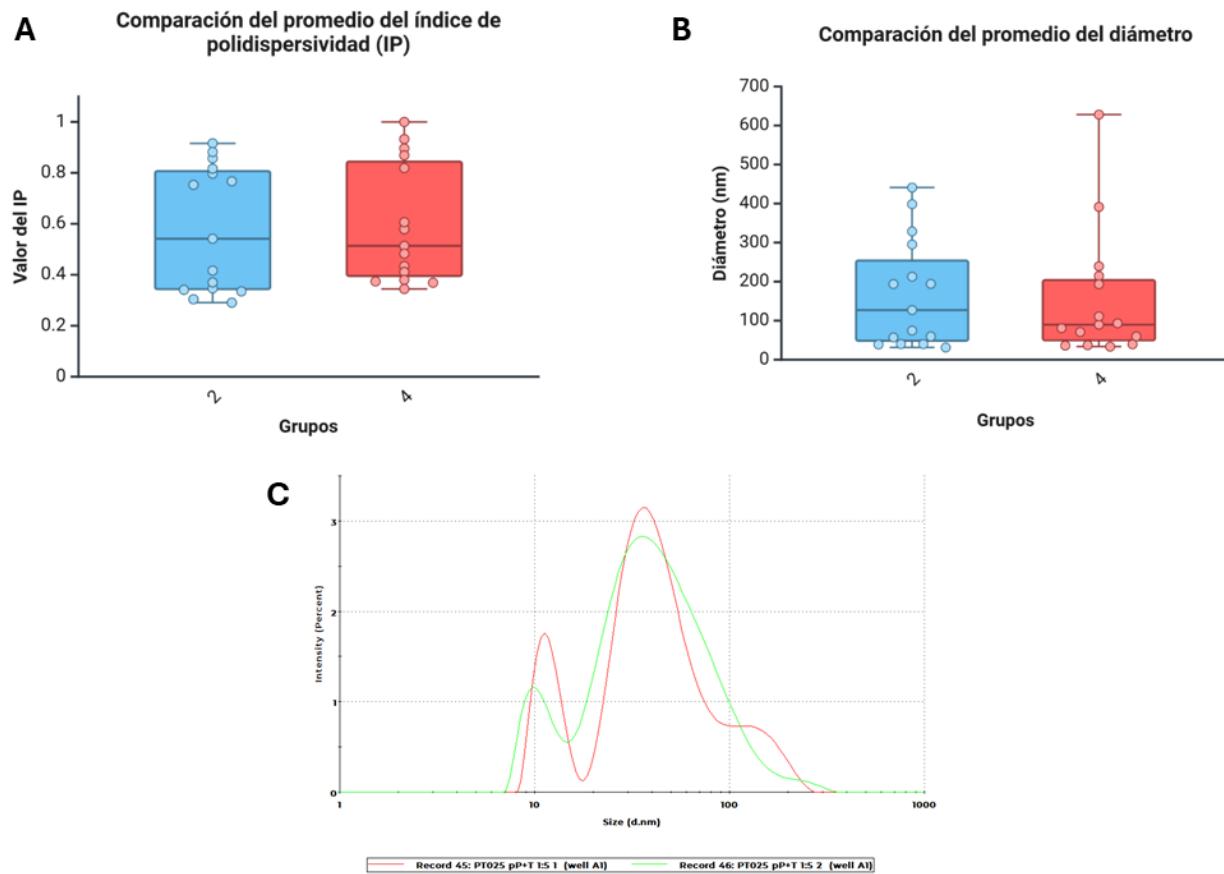


Figura 3. Resultados del análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS).

A: Comparación de Índice de Polidispersidad entre grupos 2 y 4. **B:** Comparación de diámetro de partículas entre grupos 2 y 4. **C:** Distribución de diámetro de partículas para una muestra representativa (M7).

203 ambos grupos (**Figura 2**).

204 **3.3. Cuantificación de miRNAs en EVs obtenidas de DBS**

205 Se purificaron miRNAs de todos los grupos (1, 2, 3 y 4). Los grupos 1 y 3 corresponden
 206 a los miRNAs totales de las NBSC estándar y tratadas con TP, respectivamente. Los
 207 grupos 2 y 4 corresponden a los miRNAs provenientes de EVs de las NBSC estándar y
 208 tratadas con TP, respectivamente. La concentración de miRNAs en cada grupo se

209 cuantificó utilizando un método fluorométrico. Los grupos 2 y 4 mostraron un rendimiento
210 menor comparados con los grupos 1 y 3 (**Figura 4**). Este es un resultado esperado ya
211 que los miRNAs provenientes de EVs representan solo una fracción de los miRNAs
212 totales presentes en las DBS.

213 Las concentraciones promedio de miRNAs purificados de los distintos grupos
214 experimentales fueron 12.9 ng/mL para el grupo 1, 6.4 ng/mL, 12.59 ng/mL y 4.77 ng/mL
215 para los grupos 2, 3 y 4, respectivamente (**Tabla 3**). La fracción de miRNAs provenientes
216 de EVs representó entre el 19% y el 39% del total de miRNAs presentes por muestra.

217 Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en la concentración de
218 miRNAs totales entre las NBSC con y sin tratamiento previo (grupos 1 y 3), ni en la
219 concentración de miRNAs provenientes de EVs de NBSC con y sin tratamiento previo
220 (grupos 2 y 4). Es importante destacar que las muestras M5 y M6 presentaron la mayor
221 concentración de miRNAs en todos los grupos, lo que sugiere que la variabilidad entre
222 individuos podría ser un factor más relevante que el tratamiento de la NBSC en la
223 concentración de miRNAs.

Tabla 3. Estadística descriptiva de la concentración de miRNAs purificados

Grupo	Media	SD	SEM
1	12.9753	8.1874	2.114
2	6.4187	8.0448	2.2764
3	12.5947	8.8164	2.2764
4	4.7767	6.2997	1.6266

Los datos de la media son de concentración de miRNAs purificados a partir de los cuatro grupos,
datos en ng/mL SD. Desviación estandar. SEM. Error estandar de la media descriptiva.

224

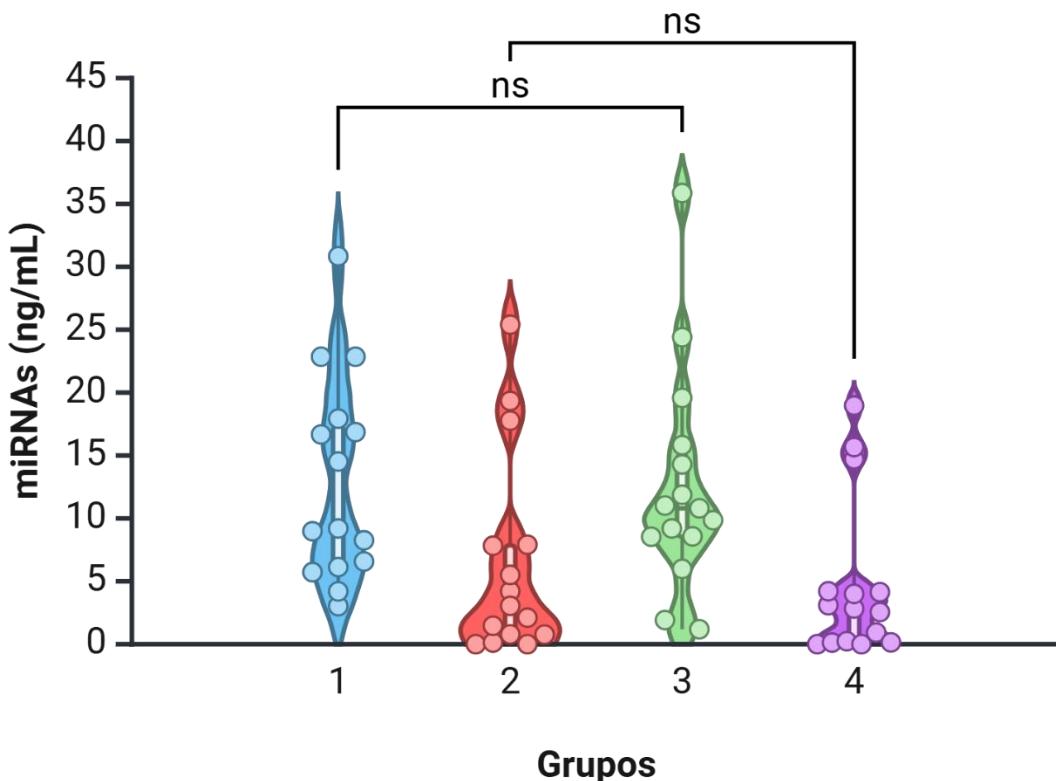


Figura 4. Concentración de miRNAs de los diferentes grupos.
Significancia estadística $p < 0.05$.

225 **3.4. Presencia de miRNAs específicos**

226 Los miRNAs purificados de cada grupo se analizaron mediante stem-loop RT-PCR [25],
227 para determinar la presencia de miR-33b, miR-375 y miR-486, se eligieron estos miRNAs
228 porque han sido previamente reportados en DBS [6,7] La presencia de estos miRNAs se
229 evaluó utilizando geles de agarosa. Los miR-33b, miR-375 y miR-486 mostraron bandas
230 cercanas a 100pb en la mayoría de las muestras (M1-M6) para los grupos 2 y 4, lo cual
231 sugiere la presencia de estos miRNAs derivados de EVs en DBS. Las muestras M8 y M9
232 para los grupos 2 y 4 muestran presencia para miR-33b y miR-486, sin embargo no se
233 muestran para miR-375 (Figura 5). Se puede ver que se mantienen presentes en el resto
234 de las muestras (Figura Suplementaria 1-3)

235

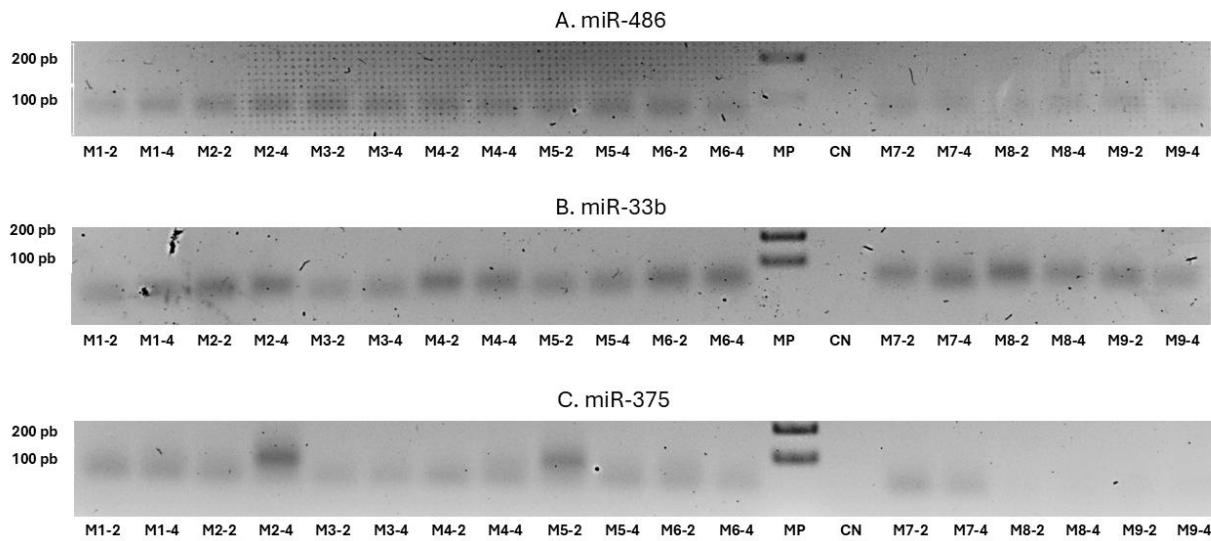


Figura 5. Presencia de miRNAs específicos por PCR en EVs a partir de DBS. **A.** Muestras 1-9 grupos 2 y 4 para miR-486. **B.** Muestras 1-9 grupos 2 y 4 para miR-33b. **C.** Muestras 1-9 grupos 2 y 4 para miR-375. MP, Marcador de Peso. CN, Control Negativo.

236 4. Discusión

237 En este estudio, se logró identificar la presencia de miRNAs en EVs derivadas de DBS
 238 utilizando un método accesible y se exploró la utilidad de una solución de trehalosa para
 239 optimizar la recuperación de biomarcadores de NBSC. Si bien diversos estudios han
 240 reportado el uso de DBS en análisis multiómicos (genómica, transcriptómica y
 241 metabolómica) y de ácidos nucleicos específicos como biomarcadores [3,7,8,26], este
 242 trabajo representa el primero en reportar la extracción de miRNAs en EVs a partir de
 243 muestras en NBSC utilizando el método de ATPS.

244 Investigaciones previas han reportado la identificación de EVs a partir de muestras de
 245 papel sin analizar su contenido de miRNAs [27,28], y también se ha logrado la purificación
 246 de miRNAs en papel a partir de suero sanguíneo separando los miRNAs libres de los
 247 contenidos en vesículas, sin embargo, el tipo de papel empleado es diferente y las
 248 muestras fueron manipuladas previo a depositarlas en el papel [29]. Este estudio se
 249 diferencia de investigaciones previas al confirmar la purificación de EVs a partir de DBS
 250 en tarjetas Whatman 903, las cuales son ampliamente utilizadas para el tamiz neonatal.
 251 Se incluyeron dos tipos de NBSC en el análisis: NBSC estándar y NBSC tratadas con
 252 TP.

253 El método ATPS utilizado para la extracción de EVs ha sido reconocido por su bajo costo
254 y por no requerir infraestructura especializada en el sitio de toma de muestra [14,30,31].
255 Esto representa una gran ventaja para su futura implementación como plataforma para
256 el diagnóstico o pronóstico molecular, particularmente en zonas sin acceso a
257 infraestructura especializada.

258 El tamaño y la morfología de las EVs obtenidas en este trabajo son consistentes con la
259 literatura sobre exosomas [20,24,32]. Los miRNAs contenidos en exosomas han sido
260 propuestos como mejores biomarcadores en comparación con los miRNAs libres de
261 células debido a su calidad y estabilidad [9,33,34]. Diversos estudios han encontrado
262 miRNAs exosomales asociados con enfermedades no transmisibles, como la obesidad
263 en adultos y la obesidad infantil como el miRNA 33a exosomal [35–38].

264 La presencia de miRNAs específicos (miR-33b, miR-486 y miR-375) en las muestras de
265 EVs (grupos 2 y 4) es relevante para la teoría de DOHaD, ya que estos miRNAs han sido
266 asociados con alteraciones en procesos metabólicos [7,12]. El miR-486 se ha asociado
267 con procesos celulares que, al verse alterados, pueden resultar en condiciones como
268 obesidad, diabetes, cáncer, macrosomía fetal, preclampsia e inclusive COVID19 [6,12,39–42].
269 El miR-33b se ha asociado con diversas enfermedades relacionadas con la regulación
270 de lípidos, incluyendo diabetes, obesidad, preclampsia e interrupción del embarazo
271 [40,43,44]. También se ha reportado como alterado en neonatos con macrosomía. [6,7].

272 A la fecha, no hay métodos estandarizados para la extracción de miRNAs de EVs a partir
273 de DBS. Se han reportado diferentes métodos para la extracción de EVs de papel,
274 incluyendo el uso de kits, pero no se había intentado usar un método de separación de
275 fases para este tipo de muestras en NBSC [27–29,45].

276 En este estudio, se exploró el uso de trehalosa como agente preservante para mantener
277 la calidad de las muestras y aumentar el rendimiento en la extracción de EVs y miRNAs.
278 Si bien la trehalosa se utiliza en numerosos estudios para la preservación celular [46] y un
279 reporte previo indicó que podría aumentar la recuperación de miRNAs y exosomas a
280 partir de suero [29], en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la
281 recuperación de miRNAs entre grupos de muestras tratadas y no tratadas con trehalosa.
282 Tampoco se observaron diferencias notables en la morfología de las EVs, lo que sugiere

que la trehalosa no afecta la integridad estructural de las vesículas. Estos resultados podrían deberse a las diferencias en la concentración de trehalosa utilizada. Se necesitan estudios futuros que incluyan diferentes concentraciones de trehalosa y comparan su uso con el de otros agentes preservantes [47–50].

El análisis de miRNAs en NBSC ofrece un enorme potencial para la investigación biomédica y la medicina personalizada. Sin embargo, es crucial optimizar los métodos de obtención, almacenamiento, aislamiento y purificación de miRNAs, tanto libres como encapsulados en EVs, para asegurar la reproducibilidad y la validez de los resultados.

Futuros estudios deberán abordar las limitaciones de este estudio, como el tamaño de la muestra y la falta de análisis de variables adicionales en correlación con las condiciones de la población. Además, será necesario confirmar la identidad de los exosomas mediante el análisis de marcadores específicos y evaluar con mayor detalle la eficiencia en la recuperación de miRNAs y EVs a partir de DBS.

La optimización de la metodología de purificación, incluyendo la evaluación de diferentes tipos de papel, preservantes y tiempos de almacenamiento, será crucial para mejorar la recuperación y la integridad de las EVs y los miRNAs.

Finalmente, la cuantificación de la expresión de miRNAs específicos en NBSC permitirá analizar su asociación con diferentes condiciones de salud y explorar su potencial como biomarcadores tempranos, en línea con la teoría DOHaD.

En conjunto, estos esfuerzos contribuirán a una mejor comprensión de la biología de los miRNAs y las EVs al inicio de la vida, y podrían conducir al desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas basadas en el análisis de DBS contenidas en NBSC.

306 **6. Referencias**

- 307 1. Lynch F *et al.* Epigenetics and DOHaD: how translation to predictive testing will
308 require a better public understanding. *J Dev Orig Health Dis* 2022; 13(4): 424–430.
309 doi:10.1017/S2040174421000568.
- 310 2. Levy HL. Robert Guthrie and the Trials and Tribulations of Newborn Screening. *Int*
311 *J Neonatal Screen* 2021; 7(1): 5. doi:10.3390/ijns7010005.
- 312 3. Grauholm J *et al.* Gene expression profiling of archived dried blood spot samples
313 from the Danish Neonatal Screening Biobank. *Mol Genet Metab* 2015; 116(3):
314 119–124. doi:10.1016/J.YMGME.2015.06.011.
- 315 4. Bybjerg-Grauholm J *et al.* RNA sequencing of archived neonatal dried blood
316 spots. *Mol Genet Metab Rep* 2017; 10: 33–37.
317 doi:10.1016/J.YMGMR.2016.12.004.
- 318 5. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350–5.
319 doi:10.1038/nature02871.
- 320 6. Ortiz-Dosal A *et al.* Circulating microRNAs overexpressed in macrosomia: An
321 experimental and bioinformatic approach. *J Dev Orig Health Dis* 2020; 11(5): 464–
322 472. doi:10.1017/S2040174420000422.
- 323 7. Rodil-Garcia P *et al.* Analysis of microRNA expression in newborns with
324 differential birthweight using newborn screening cards. *Int J Mol Sci* 2017; 18(12).
325 doi:10.3390/ijms18122552.
- 326 8. Diener C *et al.* MicroRNA profiling from dried blood samples. *Crit Rev Clin Lab Sci*
327 2019; 56(2): 111–117. doi:10.1080/10408363.2018.1561641.
- 328 9. Mori MA *et al.* Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology
329 and Disease. *Cell Metab* 2019; 30(4): 656–673. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.011.
- 330 10. Ponnusamy V *et al.* A study of microRNAs from dried blood spots in newborns
331 after perinatal asphyxia: A simple and feasible biosampling method. *Pediatr Res*
332 2016; 79(5): 799–805. doi:10.1038/pr.2015.276.
- 333 11. Valadi H *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel
334 mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 654–9.
335 doi:10.1038/ncb1596.
- 336 12. Ortiz-Dosal A *et al.* Circulating microRNAs in human obesity: a systematic review.
337 *Biomarkers* 2019; 24(6): 499–509. doi:10.1080/1354750X.2019.1606279.

- 338 13. Secretaría de Salud. *Tamiz Neonatal Detección, Diagnóstico, Tratamiento y*
339 *Seguimiento de los Errores Innatos del Metabolismo. Lineamiento Técnico.*, 1st
340 ed. (Veloz Avila P, ed.). Ciudad de México: DataColor Impresores, 2010.
- 341 14. Kırbaş OK *et al.* Optimized Isolation of Extracellular Vesicles From Various
342 Organic Sources Using Aqueous Two-Phase System. *Sci Rep* 2019; 9(1): 19159.
343 doi:10.1038/s41598-019-55477-0.
- 344 15. Rikkert LG *et al.* Quality of extracellular vesicle images by transmission electron
345 microscopy is operator and protocol dependent. *J Extracell Vesicles* 2019; 8(1).
346 doi:10.1080/20013078.2018.1555419.
- 347 16. Palmieri V *et al.* Dynamic light scattering for the characterization and counting of
348 extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool. *Journal of Nanoparticle*
349 *Research* 2014; 16(9): 2583. doi:10.1007/s11051-014-2583-z.
- 350 17. Zendrini A *et al.* Augmented COlorimetric NANoplasmonic (CONAN) Method for
351 Grading Purity and Determine Concentration of EV Microliter Volume Solutions.
352 *Front Bioeng Biotechnol* 2019; 7: 452. doi:10.3389/fbioe.2019.00452.
- 353 18. Wright K *et al.* Comparison of methods for miRNA isolation and quantification
354 from ovine plasma. *Sci Rep* 2020; 10(1). doi:10.1038/S41598-020-57659-7.
- 355 19. Schneider CA *et al.* NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*
356 2012; 9(7): 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089.
- 357 20. Božič D *et al.* Stability of erythrocyte-derived nanovesicles assessed by light
358 scattering and electron microscopy. *Int J Mol Sci* 2021; 22(23).
359 doi:10.3390/ijms222312772.
- 360 21. Chen H *et al.* Exosomes, a New Star for Targeted Delivery. *Front Cell Dev Biol*
361 2021; 9. doi:10.3389/fcell.2021.751079.
- 362 22. Welsh JA *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles
363 (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 2024;
364 13(2). doi:10.1002/jev2.12404.
- 365 23. Gao Y *et al.* Small Extracellular Vesicles: A Novel Avenue for Cancer
366 Management. *Front Oncol* 2021; 11: 441.
367 doi:10.3389/FONC.2021.638357/BIBTEX.
- 368 24. Khan MA *et al.* Determining the Size Distribution and Integrity of Extracellular
369 Vesicles by Dynamic Light Scattering. In: *Methods in molecular biology* (Clifton,
370 N.J.), Vol 2413., 2022: 165–175. doi:10.1007/978-1-0716-1896-7_17.

- 371 25. Varkonyi-Gasic E *et al.* Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection
372 and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 2007; 3(1): 12.
373 doi:10.1186/1746-4811-3-12.
- 374 26. Malsagova K *et al.* Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects.
375 *Diagnostics (Basel)* 2020; 10(4). doi:10.3390/diagnostics10040248.
- 376 27. Bæk R, Jørgensen MM. Multiplexed phenotyping of small extracellular vesicles
377 using protein microarray (EV array). *Methods in Molecular Biology* 2017; 1545:
378 117–127. doi:10.1007/978-1-4939-6728-5_8/FIGURES/3.
- 379 28. Jørgensen MM *et al.* Extraction and analysis of intact EVs collected from dried
380 blood spots. 2018.
- 381 29. Neo SH *et al.* Trehalose significantly enhances the recovery of serum and serum
382 exosomal miRNA from a paper-based matrix. *Sci Rep* 2017; 7(1).
383 doi:10.1038/s41598-017-16960-8.
- 384 30. Torres-Bautista A *et al.* Characterization and optimization of polymer-polymer
385 aqueous two-phase systems for the isolation and purification of CaCo2 cell-
386 derived exosomes. *PLoS One* 2022; 17(9): e0273243.
387 doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0273243.
- 388 31. Han BH *et al.* Isolation of extracellular vesicles from small volumes of plasma
389 using a microfluidic aqueous two-phase system. *Lab Chip* 2020; 20(19): 3552–
390 3559. doi:10.1039/d0lc00345j.
- 391 32. Witwer KW *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis
392 methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013; 2(1): 20360.
393 doi:10.3402/jev.v2i0.20360.
- 394 33. Nik Mohamed Kamal NNSB, Shahidan WNS. Non-Exosomal and Exosomal
395 Circulatory MicroRNAs: Which Are More Valid as Biomarkers? *Front Pharmacol*
396 2019; 10: 1500. doi:10.3389/fphar.2019.01500.
- 397 34. Jahromi FNA *et al.* Recent advances in the roles of exosomal microRNAs
398 (exomiRs) in hematologic neoplasms: pathogenesis, diagnosis, and treatment.
399 *Cell Communication and Signaling* 2023; 21(1): 88. doi:10.1186/s12964-023-
400 01102-7.
- 401 35. Garcia-Martin R *et al.* Tissue differences in the exosomal/small extracellular
402 vesicle proteome and their potential as indicators of altered tissue metabolism.
403 *Cell Rep* 2022; 38(3): 110277. doi:10.1016/j.celrep.2021.110277.

- 404 36. Zhao R *et al.* Composition, isolation, identification and function of adipose
405 tissue-derived exosomes. *Adipocyte* 2021; 10(1): 587–604.
406 doi:10.1080/21623945.2021.1983242.
- 407 37. Eirin A *et al.* The Micro-RNA Cargo of Extracellular Vesicles Released by Human
408 Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Is Modified by Obesity. *Front
409 Cell Dev Biol* 2021; 9. doi:10.3389/fcell.2021.660851.
- 410 38. Cabiati M *et al.* Circulating and Exosomal microRNA-33 in Childhood Obesity.
411 *Biomedicines* 2023; 11(8). doi:10.3390/biomedicines11082295.
- 412 39. Li C *et al.* Serum miR-486-5p as a diagnostic marker in cervical cancer: with
413 investigation of potential mechanisms. *BMC Cancer* 2018; 18(1): 61.
414 doi:10.1186/s12885-017-3753-z.
- 415 40. Giannubilo SR *et al.* Circulating miRNAs and Preeclampsia: From Implantation to
416 Epigenetics †. *Int J Mol Sci* 2024; 25(3). doi:10.3390/ijms25031418.
- 417 41. Tang H *et al.* The noncoding and coding transcriptional landscape of the
418 peripheral immune response in patients with COVID-19. *Clin Transl Med* 2020;
419 10(6). doi:10.1002/ctm2.200.
- 420 42. Al Azzouny MA *et al.* Serum microRNA-486-5p expression in obese Egyptian
421 children and its possible association with fatty liver. *Diabetes & Metabolic
422 Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2021; 15(5): 102258.
423 doi:10.1016/j.dsx.2021.102258.
- 424 43. Kimura Y *et al.* Clinical significance of determining plasma microRNA33B in type
425 2 diabetic patients with dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2016; 23(11): 1276–
426 1285. doi:10.5551/jat.33670.
- 427 44. Ono K *et al.* MicroRNA-33a/b in lipid metabolism – Novel “thrifty” models.
428 *Circulation Journal* 2015; 79(2): 278–284. doi:10.1253/circj.CJ-14-1252.
- 429 45. Hsiao Y-H, Chen C. Paper-Based for Isolation of Extracellular Vesicles. In:
430 *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), Vol 1660. Humana Press, New York,
431 NY, 2017: 43–54. doi:10.1007/978-1-4939-7253-1_5.
- 432 46. Bosch S *et al.* Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci
433 Rep* 2016; 6. doi:10.1038/srep36162.
- 434 47. Görgens A *et al.* Identification of storage conditions stabilizing extracellular
435 vesicles preparations. *J Extracell Vesicles* 2022; 11(6): 11.
436 doi:10.1002/jev2.12238.

- 437 48. Jeyaram A, Jay SM. Preservation and Storage Stability of Extracellular Vesicles for
 438 Therapeutic Applications. *AAPS Journal* 2018; 20(1). doi:10.1208/s12248-017-
 439 0160-y.
- 440 49. Gelibter S *et al.* The impact of storage on extracellular vesicles: A systematic
 441 study. *J Extracell Vesicles* 2022; 11(2). doi:10.1002/jev2.12162.
- 442 50. Deville S *et al.* Comparison of extracellular vesicle isolation and storage methods
 443 using high-sensitivity flow cytometry. *PLoS One* 2021; 16(2 February).
 444 doi:10.1371/journal.pone.0245835.

445

446 **7. Material Suplementario**

447 **Tabla Suplementaria 1. Datos DLS de las muestras para tamaño de partícula**

#	Muestra (EVs)	Z-Ave (d.nm)	Promedio (d.nm)	Pdl	Promedio Pdl
1	M1-2	169.9		0.622	
2	M1-2	84.27	127.085	0.461	0.5415
3	M1-4	92.93		0.434	
4	M1-4	68.23	80.58	0.434	0.434
5	M2-2	285.8		0.974	
6	M2-2	139.5	212.65	0.62	0.797
7	M2-4	238.6		0.842	
8	M2-4	190.5	214.55	0.95	0.896
9	M3-2	525.9		1	
10	M3-2	131.4	328.65	0.506	0.753
11	M3-4	37.62		0.415	
12	M3-4	34.86	36.24	0.407	0.411
13	M4-2	184.7		0.792	
14	M4-2	201.8	193.25	0.846	0.819
15	M4-4	246.4		1	
16	M4-4	141.1	193.75	0.633	0.8165
17	M5-2	606.4		1	
18	M5-2	190.5	398.45	0.832	0.916
19	M5-4	581.9		1	

20	M5-4	200.9	391.4	0.738	0.869
21	M6-2	132.1		0.675	
22	M6-2	89.52	110.81	0.482	0.5785
23	M6-4	45.43		0.317	
24	M6-4	32.52	38.975	0.376	0.3465
25	M7-2	103.9		0.417	
26	M7-2	45	74.45	0.265	0.341
27	M7-4	37.34		0.393	
28	M7-4	36.86	37.1	0.355	0.374
29	M8-2	56.92		0.336	
30	M8-2	56.88	56.9	0.334	0.335
31	M8-4	839.1		1	
32	M8-4	416.9	628	1	1
33	M9-2	364		0.903	
34	M9-2	226.2	295.1	0.811	0.857
35	M9-4	101.6		0.617	
36	M9-4	40.09	70.845	0.596	0.6065
37	M10-2	465.2		0.898	
38	M10-2	416.8	441	0.866	0.882
39	M10-4	319.7		0.871	
40	M10-4	158.9	239.3	0.994	0.9325
41	M11-2	45.26		0.268	
42	M11-2	34.84	40.05	0.34	0.304
43	M11-4	100.2		0.529	
44	M11-4	79.04	89.62	0.498	0.5135
45	M12-2	266.9		1	
46	M12-2	121.4	194.15	0.534	0.767
47	M12-4	131.9		0.601	
48	M12-4	54.31	93.105	0.365	0.483
49	M13-2	43.16		0.256	
50	M13-2	36.89	40.025	0.325	0.2905
51	M13-4	35.35		0.39	
52	M13-4	31.53	33.44	0.37	0.38
53	M14-2	73.15		0.48	

54	M14-2	45.99	59.57	0.353	0.4165448
55	M14-4	57.89		0.391	
56	M14-4	61.31	59.6	0.347	0.369
57	M15-2	30.81		0.368	
58	M15-2	31.55	31.18	0.372	0.37
59	M15-4	41.04		0.321	
60	M15-4	37.78	39.41	0.368	0.3445
	Promedio	161.64		0.59	

Z-Ave, es el diámetro promedio calculado por peso. Pdl, Indice de polidispersividad.

449

450 **Tabla Suplementaria 2. Concentración de miRNAs para cada muestra por grupos.**

MUESTRA	GRUPO 1	GRUPO 3	GRUPO 2	GRUPO 4
M1	8.98	8.54	7.83	3.1
M2	9.2	9.2	4.21	4.21
M3	16.67	1.92	7.91	14.71
M4	22.85	24.4	0	0
M5	30.84	35.86	25.4	15.67
M6	22.85	15.82	19.34	18.97
M7	8.26	1.19	3.05	2.84
M8	5.73	19.58	5.51	2.56
M9	16.86	14.29	1.47	0.13
M10	6.13	8.57	0.13	4
M11	6.58	11.02	17.77	0.24
M12	14.52	11.88	0.78	4.14
M13	3.03	9.86	0	0
M14	17.93	10.8	0.77	0.93
M15	4.2	5.99	2.11	0.15

La concentración esta expresada en ng/mL. Grupo 1, miRNAs totales derivados de DBS en NBSC estándar. Grupo 3, miRNAs totales derivados de DBS en NBSC tratadas con TP. Grupo 2, miRNAs provenientes de EVs de DBS en NBSC no tratadas. Grupo 4, miRNAs provenientes de EVs de DBS en NBSC tratadas con TP.

451

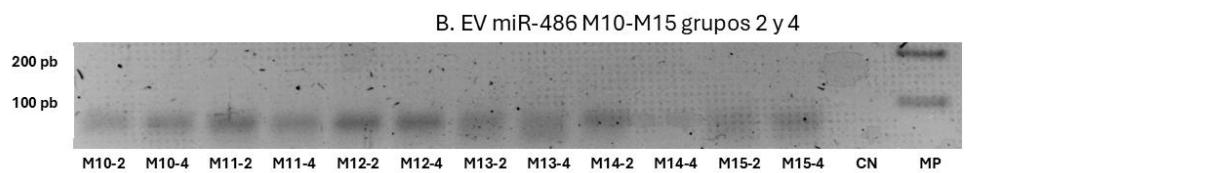
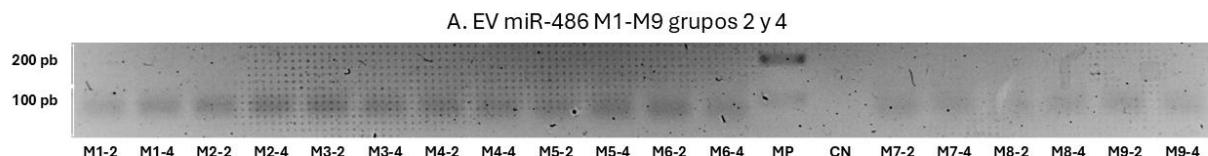


Figura Suplementaria 1. Geles de agarosa para miR-486 para grupo 2 y 4. Muestras en carriles 1-12 con marcador de peso (MP) en el carril 13 y en el carril 14 el control negativo (CN)

452

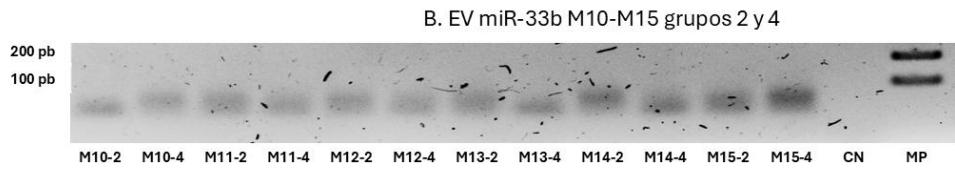
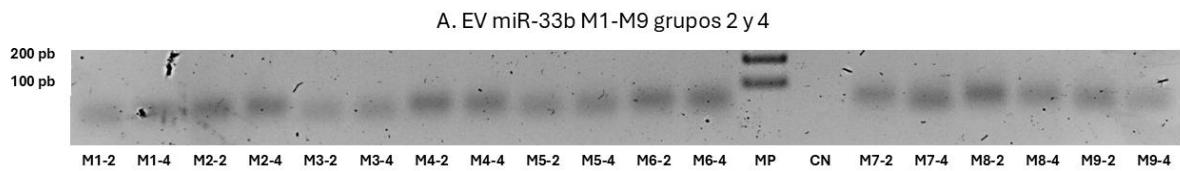


Figura Suplementaria 2. Geles de agarosa para miR-33b para grupo 2 y 4. Muestras en carriles 1-12 con marcador de peso (MP) en el carril 13 y en el carril 14 el control negativo (CN)

453

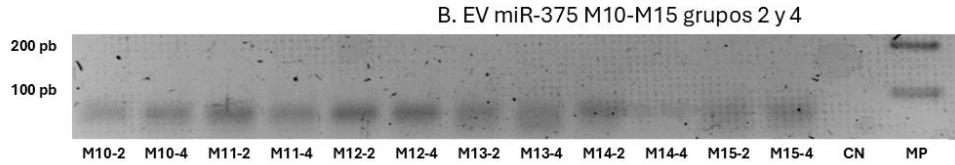
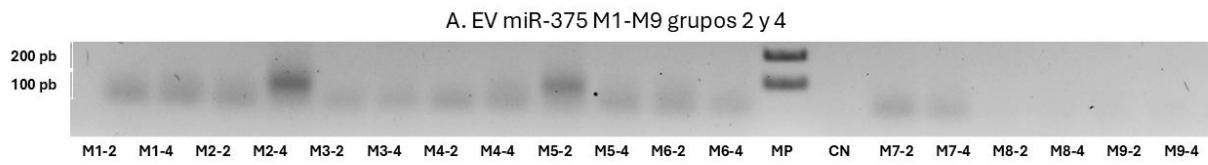


Figura Suplementaria 3. Geles de agarosa para miR-375 para grupo 2 y 4. Muestras en carriles 1-12 con marcador de peso (MP) en el carril 13 y en el carril 14 el control negativo (CN)

454