



**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 Light Scattering*; Dispersión dinámica de la luz.

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

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

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.

MicroRNAs y vesículas extracelulares en sangre

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

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

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

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

1. Introducción

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Métodos

2.1. Sujetos y recolección de muestras

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

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

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

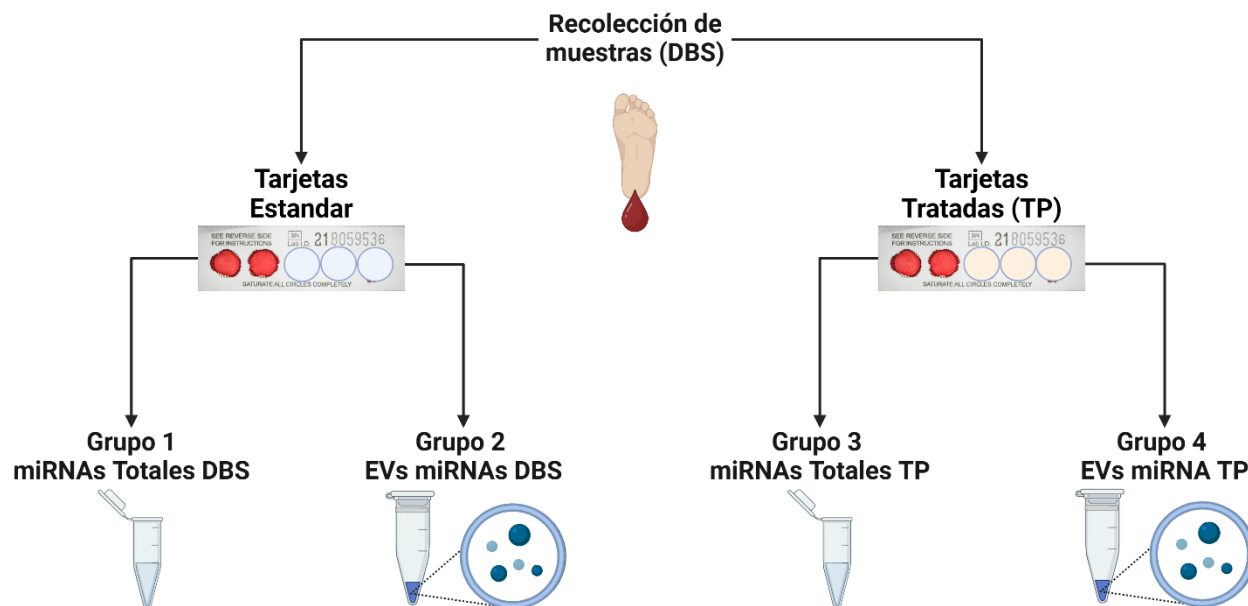


Figura 1. Diagrama de flujo de diseño experimental y estructuración de grupos para su posterior análisis. **Grupo 1:** Muestras en NBSC sin pretratamiento de las cuales se purificaron miRNAs totales. **Grupo 2:** Muestras en NBSC sin tratamiento previo de las cuales se separaron las EVs por ATPS previo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

2.2. Extracción de vesículas extracelulares (EVs)

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

2.3. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

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

2.4. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

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

2.5. Ensayo aumentado de colorimetría nanoplasmonica (CONAN)

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

2.6. Purificación de miRNAs

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

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

2.7. RT-PCR

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

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

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

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

2.8. Análisis de datos

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

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

3. Resultados

3.1. Características de las muestras

Se recolectaron 15 muestras de neonatos, de las cuales 60% pertenecieron a mujeres y 40% a hombres. El peso promedio al nacimiento fue de 3.1 ± 0.8 kg y la talla fue de 49.5 ± 5.5 cm, por lo que tenemos en promedio pesos y tallas normales. Las muestras se recolectaron en julio de 2023 de niños con máximo un mes de nacidos y se almacenaron a temperatura ambiente protegidas de la luz, durante un período de 4 a 6 meses antes 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%) |
| Condiciones durante el embarazo (%) | Obesidad (6.6%) |
| | 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.

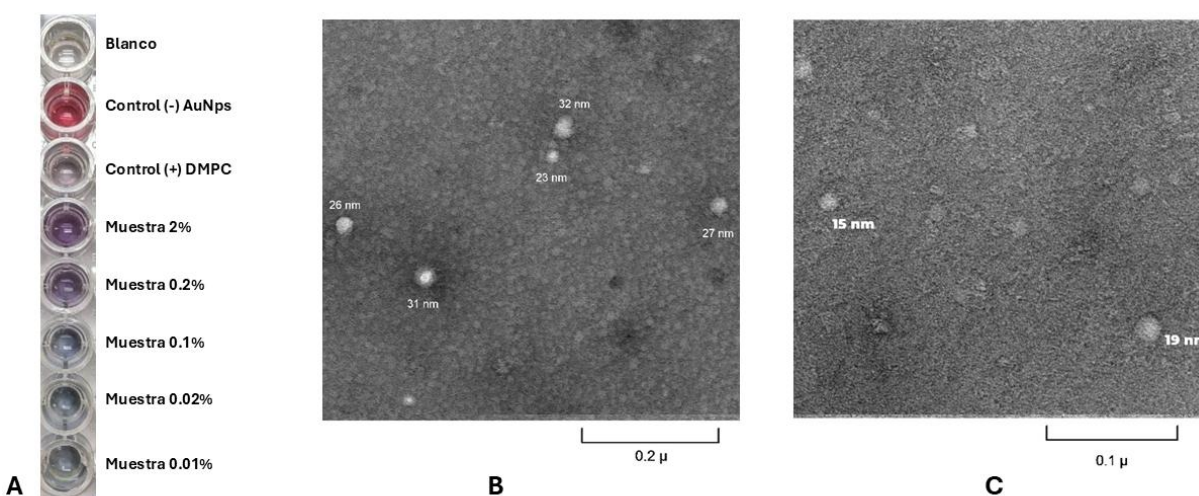


Figura 2 Imágenes de microscopía de transmisión (TEM) de vesículas extracelulares obtenidas a partir de muestras de sangre seca.

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.

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

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

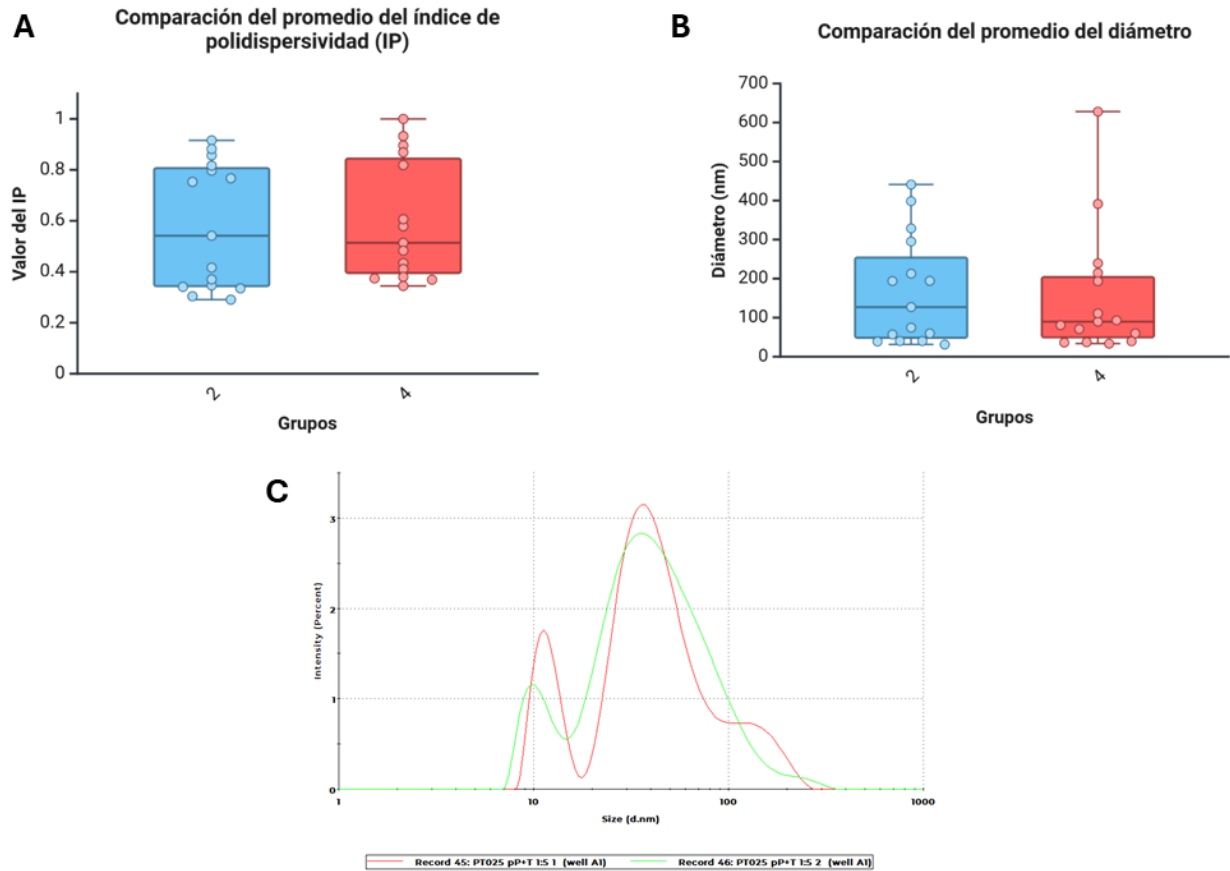


Figura 3. Resultados del análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS).

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).

ambos grupos (**Figura 2**).

3.3. Cuantificación de miRNAs en EVs obtenidas de DBS

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

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

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

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

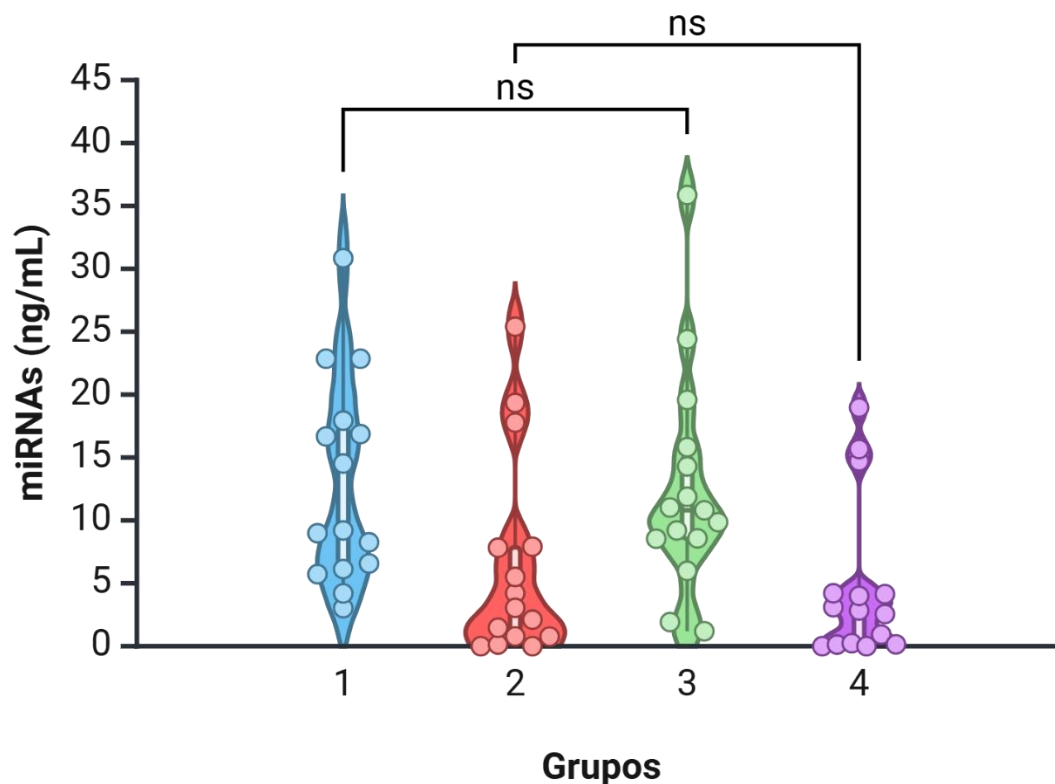


Figura 4. Concentración de miRNAs de los diferentes grupos.
Significancia estadística $p < 0.05$.

3.4. Presencia de miRNAs específicos

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

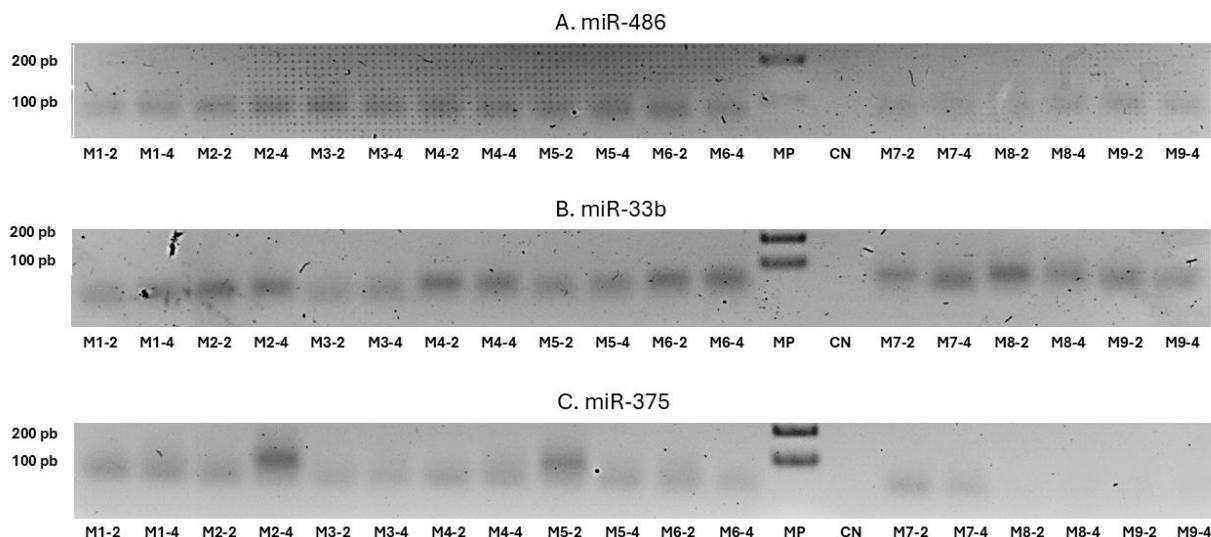


Figura 5. Presencia de miRNAs específicos por PCR en EVs a partir de DBS.
A. Muestras 1-9 grupos 2 y 4 para miR-486. **B.** Muestras 1-9 grupos 2 y 4 para miR-33b. **C.** Muestras 1-9 grupos 2 y 4 para miR-375. MP, Marcador de Peso. CN, Control Negativo.

4. Discusión

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Referencias

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

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

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

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

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

7. Material Suplementario

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, Índice 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

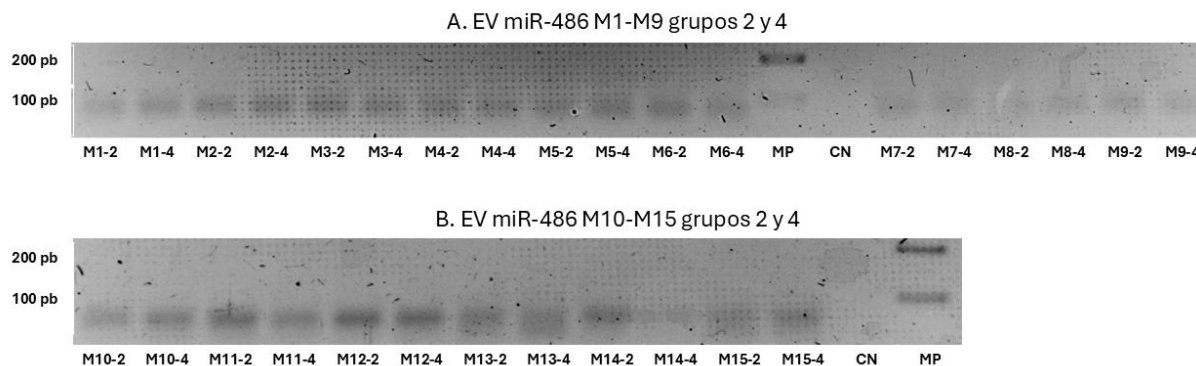


Figura Suplementaria 1. Geles de agarosa para miR-486 para grupo 2 y 4. Muestras en carriles 1-12 con marcador de peso (MP) en el carril 13 y en el carril 14 el control negativo (CN)

452

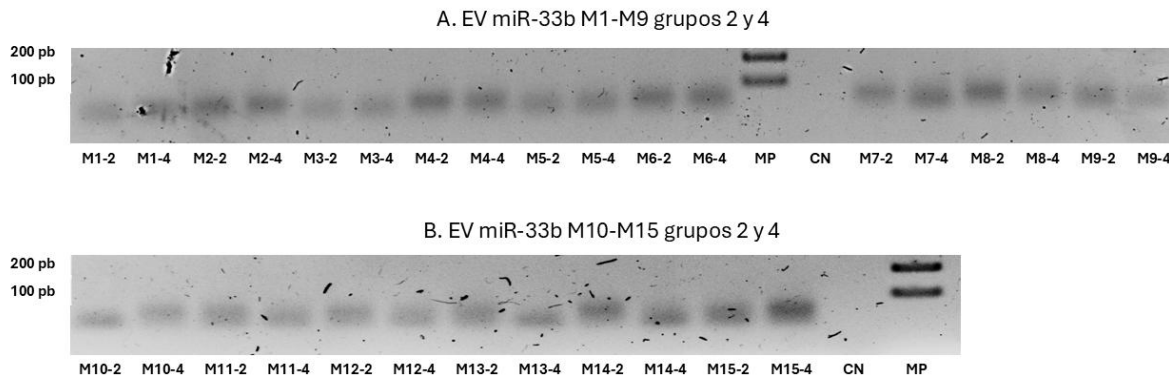


Figura Suplementaria 2. Geles de agarosa para miR-33b para grupo 2 y 4. Muestras en carriles 1-12 con marcador de peso (MP) en el carril 13 y en el carril 14 el control negativo (CN)

453

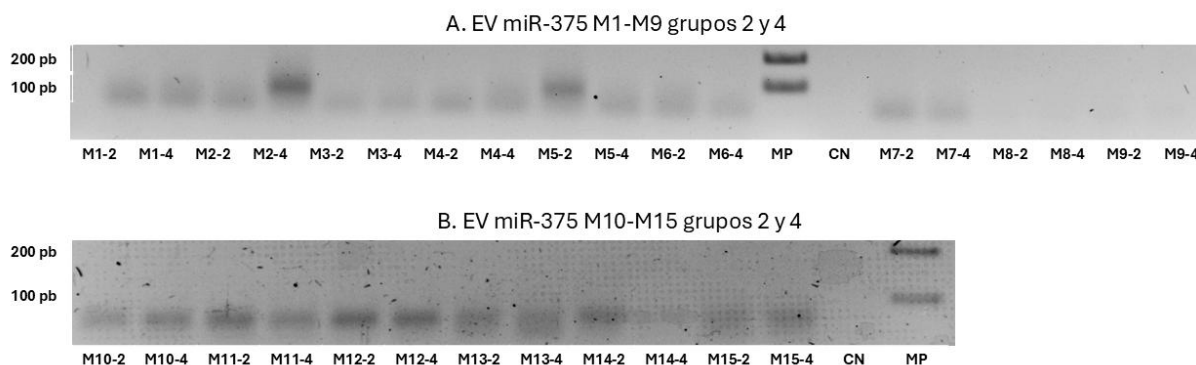


Figura Suplementaria 3. Geles de agarosa para miR-375 para grupo 2 y 4. Muestras en carriles 1-12 con marcador de peso (MP) en el carril 13 y en el carril 14 el control negativo (CN)

454