



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

Expresión de los microRNAs miR-375 y miR-320a exosomales en calostro y su asociación con el perfil de lípidos maternos

Tesis que presenta
María Isabel Martín del Campo Andrade

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre de 2024



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Expresión de los microRNAs miR-375 y miR-320a exosomales en calostro y su asociación con el perfil de lípidos maternos**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por María Isabel Martín del Campo Andrade y aprobada el 09 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 Antonio Salazar Olivo

Director de la tesis

Dra. Fabiola Jaimes Miranda

Miembro del Comité Tutorial

Dr. Rubén López Revilla

Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

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

Se agradece a el laboratorio de Laboratorio de Microscopía para Muestras Biológicas (LMMB) y al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Medica y Ambiental (LANBAMA), así como a sus técnicos, Dra. Dra. Olga Araceli Patrón Soberano y L.P. Verónica Zárate Chávez respectivamente por sus importantes aportaciones para el desarrollo de este proyecto.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 1151145) y apoyos especiales del Comité de Becas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., mismos que agradece.

A mis padres

Mariza y Toño

a mis hermanos

Lalo y Toto

al amor de mi vida

Jesús Zavala

a mi tribu

Karen Iglesias, Luz Islas y Marino Chávez

y a aquellos que me han enseñado tanto y con tanto amor

Diana Flores, Eduardo Alvizo†

Agradecimientos

Agradezco ampliamente al Dr. Luis Salazar por su motivación, paciencia y buen consejo.

Al Hospital del Niño y la Mujer “Dr. Alberto López Hermosa” por su aportación en conocimiento, apoyo técnico y confianza.

A las autoridades del hospital que apoyaron el proyecto: Méd. Genetista José de Jesús Vázquez Montant, Dr. Francisco Goldaracena Orozco, Dr. Jesús Antonio Briseño Sainz.

A Sandra Patricia Rodil García, Nataly Guzmán Herrera y Alonso Marino Chávez Valdezpino que contribuyeron ampliamente al proyecto.

A los estudiantes de medicina que apoyaron en la toma de muestras: José Samuel Espinoza Medina, José Antonio Moisés Rodríguez Acuña, Francisco de Jesús Guerrero Fiscal, Jonathan Iram Valenzuela Sánchez.

Al Dr. Rubén López Revilla, Mireya Guadalupe Sánchez Garza por su acompañamiento.

A el equipo técnico que nos apoyo para la realización de cada parte del proyecto: Dr. Nicolás Gómez Hernández, Dra. Olga Araceli Patrón Soberano, Dra. María Teresa Rosales Saavedra, Dr. Saúl Jijón Moreno, LAMBAMA y L.P. Verónica Zárate Chávez.

A los doctores investigadores que apoyaron el proyecto: Dr. Samuel Lara González y José Luis Rodríguez López.

Se reconoce el uso de inteligencia artificial generativa (ChatGPT,versión GPT-4, OpenAI) como apoyo en la edición de contenido.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	¡Error! Marcador no definido.
Dedicatorias	¡Error! Marcador no definido.
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi
1 Introducción	1
2 Materiales y métodos	3
2.1 Declaración de ética	3
2.2 Participantes	3
2.3 Recolección de datos y muestras de calostro	4
2.4 Procesamiento de muestras de calostro	4
2.5 Obtención y análisis de exosomas de calostro	6
2.6 Análisis de microRNAs	7
2.7 Análisis de datos	9
3 Resultados	10
3.1 Características de las participantes del estudio	10
3.2 Identificación, evaluación del tamaño y cuantificación de exosomas	11
3.3 Evaluación de microRNAs exosomales	12
4 Discusión	14
Referencias	31

Lista de tablas

Tabla 1 Cebadores utilizados en la RT-qPCR	27
Tabla 2: Características de los grupos estudiados.	28
Tabla 3 Perfil de lípidos de los grupos de estudio.	30

Lista de figuras

Figura 1 Comparación del perfil de lípidos por grupo.	19
Figura 2 Exosomas de leche materna humana.	20
Figura 3 Distribución de tamaños de exosomas (DLS).	21
Figura 4 Curva de calibración de exosomas evaluados por CONAN	22
Figura 5 Expresión relativa del miR- 320a y el miR-375.	24
Figura 6 Asociaciones entre el miR-320a y las características maternas	25
Figura 7 Asociaciones entre el miR-375 y las características maternas	26

Resumen

Introducción: Este estudio analizó la expresión de los microRNAs miR-375 y miR-320a en exosomas de leche materna y su relación con el perfil de lípidos sanguíneo de las madres. Estos microRNAs podrían desempeñar un papel crucial en la regulación epigenética, contribuyendo a la programación metabólica y en la prevención de enfermedades no transmisibles en el lactante. **Métodología:** Se realizó un estudio transversal con 30 madres clasificadas en tres grupos: normolipemia, dislipidemia y trigliceridemia. La expresión relativa de los miRNAs se analizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, mientras que las asociaciones se evaluaron con análisis de covarianza y correlaciones. **Resultados:** Este trabajo mostró asociaciones entre el miR-320a con la madurez del calostro, el contenido energético de la leche y con los valores de colesterol y triglicéridos en sangre. Por otra parte, la expresión del miR-375 estuvo influenciada por el estado de alimentación de la madre. Se identificaron además correlaciones entre ambos miRNAs y el estilo de vida materno, como la actividad física y el tiempo en reposo durante el embarazo. **Discusión:** Los hallazgos encontrados sugieren que características propias de la leche, como la madurez y el contenido graso, características maternas puntuales, como el tiempo de ayuno, y características sostenidas en el tiempo, como la lipemia y el estilo de vida, parecen tener influencia en la expresión de los microRNAs exosomales transferidos a través de la lactancia.

Palabras clave:

MicroRNAs. Leche materna. Calostro. Triglicéridos. Colesterol. Exosomas. Vesículas extracelulares.

Abstract

Introduction: This study investigates the expression of miR-375 and miR-320a in breast milk exosomes and their association with the maternal lipid profile. These microRNAs may play a essential role in the epigenetic regulation, contributing to metabolic programming and the prevention of noncommunicable diseases.

Methods: A cross-sectional study was conducted involving 30 mothers classified into three groups: normolipemia, dyslipidemia, and triglyceridemia. The relative expression of these microRNAs was measured using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, and associations were assessed using analysis of covariance and correlation analysis.

Results: Our findings revealed associations between miR-320a and colostrum maturity, milk energy content, and maternal blood cholesterol and triglyceride levels. Furthermore, the expression of miR-375 was influenced by the maternal fasting. We also identified correlations between both microRNAs and maternal lifestyle factors, including physical activity and rest time during pregnancy.

Discussion: The findings suggest that specific characteristics of milk, such as maturity and fat content, specific maternal characteristics, such as fasting time, and long-term characteristics, such as lipemia and lifestyle, appear to influence the expression of exosomal microRNAs transferred through breastfeeding.

KEYWORDS

MicroRNAs. Breast milk. Colostrum. Triglycerides. Cholesterol. Exosomes. Extracellular Vesicles.

Expresión de los microRNAs miR-375 y miR-320a exosomales en calostro y su asociación con el perfil de lípidos maternos

1

2 María Isabel Martín-del-Campo-Andrade¹, José de Jesús Vázquez-Montant ²,
3 Francisco Goldaracena ², Jesús Antonio Briseño-Sainz ², Luis A. Salazar-
4 Olivo^{1*}

5

¹ División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

8 ² Hospital del Niño y La Mujer “Dr. Alberto López Hermosa”, Subdirección de
9 Educación e Investigación en Salud, San Luis Potosí, México.

10

11 * Autor para correspondencia: Dr. Luis A. Salazar Olivo. olivo@ipicyt.edu.mx

12

13

14 Número de palabras: 5 070

15 Numero de figuras: 7

16 Número de tablas: 3

17 1 Introducción

18 La lactancia materna se asocia con efectos benéficos a la salud. Entre ellos
19 la lactancia materna parece tener un papel importante en la prevención de
20 enfermedades no transmisibles a largo plazo (Alcívar Mendoza y Toledo Santana,
21 2022). Si bien los factores que promueven estos beneficios sostenidos son aún
22 poco comprendidos, se postula que compuestos bioactivos presentes en la leche
23 materna participarían en la modulación de la expresión génica del neonato. Entre
24 estos componentes destacan los microRNAs (miRNAs) por su papel en la
25 modulación génica. En la leche materna, los miRNAs pueden encontrarse en
26 suero, glóbulos de grasa o, como se ha descrito recientemente, incluídos en
27 exosomas (Tingö *et al.*, 2021). Debido a su tamaño, los miRNAs exosomales (exo-
28 miRNAs) están protegidos de la degradación enzimática, lo que permite su
29 absorción por el infante tras su ingesta, entrando en circulación para ejercer
30 efectos en diversos tejidos (Manca *et al.*, 2018). Se ha postulado que los miRNAs
31 y exo-miRNAs consumidos durante la lactancia podrían influir en la programación
32 nutricional del infante.

33 El papel exacto de los miRNAs de la leche materna en el desarrollo del
34 infante aún no está completamente esclarecido. Diversos estudios asocian el perfil
35 de miRNAs en leche con características maternas como el tiempo de posparto, la
36 dieta, la exposición a sustancias, el índice de masa corporal (IMC) o la etnicidad,
37 entre otros. El estudio de la relación entre la obesidad materna y la abundancia de
38 miRNAs en la leche materna se ha centrado principalmente en el IMC de la madre.

39 El miR-375 se ha identificado con expresión diferencial en leche materna de
40 mujeres con obesidad mediante estudios de secuenciación (Kupsco *et al.*, 2021).
41 Además, nosotros identificamos este miRNA con baja expresión en infantes con
42 bajo peso al nacimiento (Rodil-Garcia *et al.*, 2017). Este miRNA está implicado en
43 el metabolismo glucolítico y tiene un papel en la regulación del metabolismo de
44 lípidos (Zhang *et al.*, 2023). Por otra parte, el miR-320a se ha reportado sobre
45 expresado en personas con obesidad, misma conclusión a la que llegó nuestro
46 grupo de investigación en un estudio realizado en adultos (Abd El-Jawad *et al.*,
47 2022; Ávila-Delgadillo, 2016).

48 Hasta la fecha no se han realizado estudios que evalúen la asociación entre
49 el perfil bioquímico de la madre y la abundancia de miRNAs en leche materna
50 humana (Zamanillo *et al.*, 2019; Bozack *et al.*, 2021; Shah *et al.*, 2021). En este
51 trabajo nos propusimos describir la expresión de los miRNAs miR-375 y miR-320a
52 en exosomas de leche de mujeres mexicanas. Además, se analizó el perfil de
53 lípidos como un parámetro adicional para conocer el estado bioquímico de las
54 participantes.

55

56 **2 Materiales y métodos**

57 **2.1 Declaración de ética**

58 Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes
59 en el momento de la inscripción. Todos los procedimientos y protocolos de
60 investigación fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital del Niño y la
61 Mujer “Dr. Alberto López Hermosa”.

62 **2.2 Participantes**

63 El reclutamiento de las madres se realizó durante los primeros seis días
64 postparto, en el Hospital del Niño y la Mujer “Dr. Alberto López Hermosa”. Los
65 criterios de inclusión fueron: madres de 18 a 36 años, que hubieran resuelto el
66 embarazo a término (35 a 42 semanas de gestación). Los criterios de exclusión
67 fueron: 1) índice de masa corporal (IMC) pregestacional auto informado menor a
68 21, 2) morbilidades maternas que contradigan u obstaculicen la lactancia (ej.,
69 cáncer, drogadicción, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana,
70 Hepatitis B y C, o el virus linfotrópico T Humano), 3) afecciones del neonato que
71 afecten significativamente la capacidad de amamantar (p. ej., labio/paladar
72 hendido, enfermedad metabólica o ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos >7
73 días), 4) mujeres que no deseen o no logren establecer la lactancia, 4) consumo
74 de drogas, tabaco o alcohol durante el embarazo, 5) presentar inflamación o dolor
75 patológico en los senos al momento de la toma de muestra, 6) no aceptar
76 proporcionar muestra o información para el estudio.

77 **2.3 Recolección de datos y muestras de calostro**

78 Se realizó una entrevista a la madre en la que se incluyeron preguntas
79 sobre su estilo de vida, características antropométricas y bioquímicas antes,
80 durante y después del embarazo. Las participantes realizaron la toma de muestra
81 de calostro mediante extracción manual de uno o ambos pechos tras recibir una
82 breve explicación del proceso de estimulación, limpieza y extracción. Se
83 recolectaron de 3 a 15 mL de leche en un tubo para centrífuga de 50 mL estéril.
84 Todas las muestras de leche se recolectaron entre las 7:00 y las 11:00 hrs.
85 Adicionalmente se tomó una muestra de sangre venosa a las madres con 12 h de
86 ayuno.

87 **2.4 Procesamiento de muestras de calostro**

88 **2.4.1 Análisis del perfil de lípidos en sangre materna**

89 Las muestras de sangre materna se analizaron en el Hospital del Niño y la
90 Mujer “Dr. Alberto López Hermosa” para determinación de triglicéridos (TG),
91 colesterol total (CT), colesterol de alta densidad (HDL-C), colesterol de baja
92 densidad (LDL-C) y colesterol de muy baja densidad (VLDL-C) con métodos
93 internos del hospital.

94 **2.4.2 Procesamiento de las muestras de calostro**

95 Las muestras de calostro se almacenaron a -21°C antes de su traslado al
96 laboratorio. El mismo día de su obtención se tomó una alícuota para el análisis de
97 proporción grasa (crematocrito) y el resto fue descremada para el aislamiento de
98 exosomas. Todas las porciones de la leche obtenidas se almacenaron a -21°C
99 hasta su análisis.

100 **2.4.2.1 Crematocrito**

101 La cuantificación de la proporción grasa de las muestras de leche materna
102 humana se determinó por la técnica de crematocrito de Lucas (Lucas *et al.*, 1978).
103 Brevemente, las muestras se descongelaron en baño seco a 40°C, durante 30
104 minutos, se homogenizaron y se colocaron 75 mL en tubos capilares sin
105 anticoagulante (75 x 1.5 mm de diámetro externo). Posteriormente, los capilares
106 sellados se centrifugaron a 15,000xg por 15 min. La proporción grasa se
107 determinó mediante el software ImageJ en ensayos por triplicado. El contenido
108 energético de las muestras se estimó partir del contenido de grasa (Lucas *et al.*,
109 1978).

110 **2.4.2.2 Obtención de suero clarificado de leche**

111 Las muestras de leche se centrifugaron dos veces (1,200xg) por 10 min a
112 4°C para eliminar las porciones grasa y celular. El suero separado de la porción
113 grasa se centrifugó (20,500xg) por 50 min a 4°C para eliminar la grasa y caseína
114 residuales. El suero clarificado se filtró por membranas de 0.22 µm (Durapore®,
115 Merck) para eliminar los desechos celulares residuales.

116 **2.5 Obtención y análisis de exosomas de calostro**

117 **2.5.1 Aislamiento de exosomas**

118 Los exosomas presentes en muestras de calostro se aislaron mediante un
119 sistema acuoso de dos fases (ATPS; *Aqueous Two-Phase System*) (Kırbaş *et al.*,
120 2019). Brevemente, el suero clarificado de leche se mezcló (1:1) con la solución
121 ATPS (1.65 % (w/v) de dextrán de *Leuconostoc spp.* y 3.35% (w/v) de
122 polietilenglicol), y se centrifugó (10,000xg) por 10 min a 4°C. El 80% del
123 sobrenadante se eliminó y el volumen se sustituyó con solución de lavado
124 (solución ATPS 50% v/v). La muestra se centrifugó nuevamente (10,000xg) por 10
125 min a 4°C y se repitieron los pasos de lavado. La solución remanente está
126 enriquecida con exosomas (Kırbaş *et al.*, 2019).

127 **2.5.2 Identificación de exosomas mediante TEM**

128 Los exosomas se identificaron mediante microscopía electrónica de
129 transmisión (TEM) usando soportes Formvar/Carbon de cobre de malla 200
130 tratados con azul de Alciano al 1% con ácido acético al 1% para conferirles
131 hidrofobicidad. Luego de ello la muestra se colocó en el soporte y se dejó
132 sedimentar durante 30 minutos en cámara húmeda. Se realizó una tinción
133 negativa con molibdato de amonio al 2% ajustado a pH 7 (Théry *et al.*, 2018).

134 **2.5.3 Evaluación de tamaño de los exosomas**

135 Las determinaciones de tamaño de las partículas en las soluciones
136 enriquecidas de exosomas se realizaron en diluciones 1:20 con agua miliQ
137 mediante dinámicas de dispersión de luz y potencial Z; se realizaron con el

138 instrumento de nanoserie Zetasizer (Malvern Nano-Zetasizer, λ = longitud de onda
139 láser de 532 nm).

140 **2.5.4 Cuantificación de exosomas mediante CONAN**

141 Los exosomas presentes en las muestras se cuantificaron por el método
142 colorimétrico nanoplasmodico (CONAN) descrito por Zendrini et al (2020).
143 Brevemente, se hicieron interaccionar durante 30 minutos una solución coloidal de
144 nanopartículas de oro desnudo de 8 nanómetros a una concentración de 6 nM con
145 la solución enriquecida en exosomas. El cambio de color se evaluó mediante
146 espectrofotometría UV-VIS cuantificando el índice de agregación (IA) de las
147 partículas (IA = $\text{absLSPR} / (\text{ABS} 650 + \text{ABS} 810)$). La concentración de EVs en la
148 solución enriquecida en exosomas se estimó mediante una curva de calibración
149 con liposomas modulados a un tamaño de 60 nm de DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-
150 glycero-3-phosphocholine) (Zendrini et al., 2020).

151 **2.6 Análisis de microRNAs**

152 **2.6.1 Extracción de RNAs pequeños**

153 Los RNAs pequeños se aislaron de la solución enriquecida en exosomas
154 utilizando el kit de aislamiento de RNAs pequeños miRNeasy Serum/Plasma
155 Advanced Kit® siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 200 ml de
156 la solución enriquecida en exosomas se mezcló con amortiguador RPL (Reactivos
157 de lisis de proteínas, exosomas e inactivación de RNAsas) para liberar y
158 estabilizar el RNA. Posteriormente, se mezcló con amortiguador RPP (Reactivos de
159 precipitación de proteínas y otros contaminantes) y se centrifugó para precipitar
160 las proteínas, se añadió isopropanol para propiciar la unión de los RNAs pequeños

161 a la membrana de sílice que contiene la columna de centrifugación RNeasy UCP
162 (Columnas de producción ultra limpias) MinElute, se eliminaron otros componentes
163 en lavados posteriores y finalmente se obtuvieron los RNAs pequeños
164 efluyéndolos con agua libre de nucleasas.

165 **2.6.2 Síntesis de cDNA**

166 El cDNA se sintetizó mediante una retrotranscripción stem-loop (stemloop-
167 RT) (Chen, 2005). Se realizó la stemloop-RT de cada muestra agregando 2 µL de
168 muestra, (200 U/µL) (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 4 µL de amortiguador de
169 reacción M-MLV RT 5X, 0.032 µL de inhibidor de RNasin (2500 U/µL), cebador
170 stemloop específico para el miRNA (200 nM de concentración final) y agua libre de
171 nucleasas hasta un volumen final de 20 µL. Las secuencias de los cebadores
172 utilizados se presentan en la tabla 1. El programa de temperaturas de la
173 retrotranscripción incluye un paso de incubación en el termociclador Touchgene
174 Gradient (Techne, Staffordshire, UK) a 16°C por 30 minutos, 60 ciclos de
175 amplificación de 30°C durante 30 segundos, 42°C durante 30 segundos y 50°C
176 durante 1 segundo, y finalmente se incubó a 85°C durante 5 minutos. El 10% de
177 las reacciones incluyeron una reacción enzimática sin transcriptasa reversa como
178 control negativo. El cDNA se almacenó a -20°C hasta la realización de la qPCR.

179 **2.6.3 PCR cuantitativa**

180 Para la realización de la qPCR se agregó 1 µL de la muestra, 5 µL de
181 SyberGreen máster mix, el cebador reverso universal a una concentración final de
182 150 nM y un cebador forward específico a una concentración final de 300 nM, se
183 completó el volumen de reacción a 10 µL con agua libre de nucleasas. El

184 programa de amplificación de la qPCR incluye un paso de desnaturación inicial
185 de 95°C por 15 minutos seguido de 40 ciclos de amplificación de 95°C por 15
186 segundos, y 60° C (55°C para el miR-320a) por 60 segundos, y 60°C por 2
187 minutos, al final de cada ensayo se realizó una curva de desnaturación. En la
188 tabla 1 se presentan las secuencias de los cebadores utilizados.

189 **2.7 Análisis de datos**

190 La abundancia relativa de los miR-375 y miR-320a de exosomas de leche
191 materna se normalizó con el mir-486 como miRNA de referencia. Se seleccionó el
192 normalizador aquel miRNA con mayor estabilidad calculada mediante el algoritmo
193 NormFinder (Andersen, Jensen and Ørntoft, 2004). Se cuantificó la expresión
194 relativa por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para
195 evaluar diferencias en la expresión por grupos ($p < 0.1$). Se realizó un análisis de
196 covarianza, ANOCVA, para comparar el nivel de expresión ajustado por
197 covariables ($p < 0.1$). Para el análisis de correlación entre la expresión de los
198 miRNAs y las variables clínicas, antropométricas y de estilo de vida se utilizaron
199 los coeficientes de correlación de Spearman y Kendal; el análisis se realizó en la
200 población y por grupo. El análisis se realizó con el Software estadístico RStudio.

201

202 3 **Resultados**

203

204 **3.1 Características de las participantes del estudio**

205 El estudio incluyó un total de 30 madres lactantes, las cuales otorgaron su
206 consentimiento informado para participar en el estudio. La cohorte de voluntarias
207 se estratificó en tres grupos según su perfil lipídico: mujeres con valores de
208 triglicéridos y colesterol saludables (Normolipemia) (n=8), mujeres con valores de
209 triglicéridos elevados (TG >200 mg/dL) (Trigliceridemia) (n=12) y mujeres con
210 valores de triglicéridos y/o colesterol no-HDL elevados (CHOL no-HDL >150
211 mg/dL) (Dislipidemia) (n=10). La tabla 2 muestra los valores demográficos,
212 antropométricos y de estilo de vida de las madres antes y durante el
213 embarazo. También se incluyen parámetros demográficos y antropométricos del
214 infante y las características de la muestra de leche materna.

215 El análisis de varianza (ANOVA) no mostró diferencia estadísticamente
216 significativa en cuanto a parámetros antropométricos y demográficos de la madre
217 ni del infante. En cuanto a las características de la muestra de leche solo se
218 observaron diferencias significativas en la madurez de la leche, un análisis
219 posterior mediante la prueba de Tukey mostró que la diferencia se da entre los
220 grupos de mujeres con trigliceridemia y mujeres con dislipidemia (valor P: 0.033)

221 Se encontraron diferencias significativas en cuanto al estilo de vida de la
222 madre; tiempo activo y tiempo en sedentario antes del embarazo y tiempo en
223 reposo durante el embarazo. Un análisis mediante la prueba de Tukey solo mostró
224 diferencia significativa entre madres con trigliceridemia y madres con
225 normolipemia en cuanto al tiempo activo antes del embarazo (valor-P= 0.009), y

226 entre madres con normolipemia y con dislipidemia durante el embarazo (valor-P=0.013).

228 La tabla 3 presenta los valores del perfil de lípidos de la población de
229 estudio. El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas en los
230 valores de triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y colesterol VLDL. No se
231 encontraron diferencias significativas en los valores de colesterol HDL. En la figura
232 1 se observan las diferencias de estos parámetros entre los grupos de estudio.

233 **3.2 Identificación, evaluación del tamaño y cuantificación de exosomas**

234 Mediante el método de ATPS se obtuvo una solución enriquecida en
235 exosomas, estos se identificaron mediante TEM, en la figura 2 se observa un
236 campo con exosomas con distribución de entre 40 y 90 nm, en la figura 2 se
237 aprecian dos exosomas con la morfología típica. El diámetro promedio de los
238 exosomas se evaluó mediante DLS, en la figura 3 se observa la distribución de
239 tamaños e intensidad de cada tamaño en 8 muestras distintas, se obtuvo un valor
240 Z promedio de 62.95 d.nm, se observan dos picos promedio de máxima intensidad
241 de 56 y 161 d.nm correspondientes al rango de tamaño de los exosomas.

242 Finalmente, se cuantificó la cantidad de exosomas mediante titulación con
243 el método CONAN (figura 4), se obtuvieron concentraciones de entre 1.8 y 39.34
244 mM, en la tabla 2 se muestran la concentración de exosomas por grupo, un
245 análisis por ANOVA muestra diferencias significativas entre al menos dos grupos,
246 un análisis posterior mediante la prueba de Tukey muestra que la diferencia existe
247 entre mujeres con normolipemia y dislipidemia.

248 **3.3 Evaluación de microRNAs exosomales**

249 Se cuantificó la expresión de los miRNAs miR-320a, miR-375 y miR-486, al
250 determinar los valores de estabilidad se seleccionó el miR-486 como normalizador
251 endógeno para posteriormente calcular la expresión relativa por el método de
252 $2^{E-\Delta\Delta Ct}$ (Valores de estabilidad: miR-320a = 0.044, miR-375 = 0.041 y miR-486
253 =0.018). La evaluación preliminar de los datos mostró que no tienen una
254 distribución normal, por lo que se seleccionó la prueba estadística de Kruskall para
255 identificar diferencias entre grupos. La expresión relativa de los miR-375 y miR-
256 320a no mostró diferencia entre grupos (figura 5).

257 El análisis de covarianza (ANOCVA) no mostró diferencias significativas en
258 ninguno de los dos miRNAs entre grupos controlando las variables estudiadas, sin
259 embargo, se encontraron diferencias significativas en la expresión del miR-320a
260 en relación con la madurez de la leche y una tendencia a la significancia en
261 relación con el valor de triglicéridos y el colesterol VLDL, por otra parte se
262 encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión relativa del miR-375
263 asociadas al tiempo de ayuno al momento de la toma de muestra de leche.

264 Se analizó la correlación entre la expresión relativa de los miRNAs seleccionados
265 y las variables maternas; dada la naturaleza de los datos se utilizaron los
266 coeficientes de correlación de Spearman (ρ) y Kendall (τ). Se encontraron
267 correlaciones estadísticamente significativas ($*p \geq 0.1$, $**p \geq 0.05$) entre la
268 expresión del miR-320a y el IMC pregestacional ($\rho = 0.35^*$, $\tau = 0.23^*$), así como la
269 edad gestacional ($\rho = -0.3^*$). Para el miR-375, se observaron correlaciones
270 negativas significativas con los niveles de colesterol LDL ($\rho = -0.32^*$, $\tau = -0.21^*$),

271 colesterol total ($\rho = -0.32^*$, $\tau = -0.23^*$) y con el tiempo de ayuno ($\rho = -0.48^{**}$, $\tau = -$
272 0.34^{**}) como se muestra en las figuras 6 y 7.

273 Posteriormente, se repitió el análisis de correlación de variables
274 estratificando por grupos, en mujeres con normolipemia la expresión del miR-320a
275 se correlacionó negativamente con los niveles de HDL ($\rho = -0.61^*$, $\tau = -0.55^*$) y
276 con la edad gestacional ($\rho = -0.83^{**}$, $\tau = -0.71^{**}$), y mostró correlaciones positivas
277 con el tiempo de reposo antes del embarazo ($\rho = 0.75^{**}$, $\tau = 0.54^{**}$) y el tiempo de
278 ayuno ($\rho = 0.68^*$, $\tau = 0.47^*$). Por otro lado, el miR-375 en este grupo mostró una
279 correlación negativa significativa con el IMC pregestacional ($\rho = -0.64^*$, $\tau = -0.5^*$).

280 En mujeres con trigliceridemia se observaron correlaciones significativas del
281 miR-320a con los niveles de VLDL y el valor de triglicérido ($\rho = -0.61^{**}$, $\tau = -0.41^*$)
282 ($\rho = -0.61^{**}$, $\tau = -0.41^*$), así como una correlación positiva con la madurez de la
283 leche ($\rho = 0.51^*$, $\tau = 0.44^*$). Para el miR-375, se encontró una correlación positiva
284 con la concentración de EVS ($\rho = 0.54^*$, $\tau = 0.42^*$) y una correlación negativa con
285 el tiempo de ayuno ($\rho = -0.63^{**}$, $\tau = -0.48^{**}$).

286 Finalmente, en mujeres con colesterolemia, la expresión del miR-320a
287 mostró una correlación positiva con el crematocrito ($\rho = 0.81^{**}$, $\tau = 0.64^{**}$) y una
288 correlación negativa con el tiempo de reposo durante el embarazo ($\rho = -0.28^{**}$, $\tau =$
289 -0.25^{**}), mientras que el miR-375 se correlacionó negativamente con el tiempo
290 activo antes de quedar embarazada ($\rho = -0.57^*$, $\tau = -0.4^*$) y con el tiempo de
291 ayuno ($\rho = -0.64^{**}$, $\tau = -0.49^{**}$).

292

293 4 Discusión

294 En este estudio se propusieron las metodologías para el aislamiento,
295 identificación, caracterización de tamaño y cuantificación de exosomas de leche
296 materna humana, de igual manera se logró extraer e identificar los miR-375, miR-
297 486 y miR-320a a partir de una solución enriquecida en exosomas provenientes de
298 suero clarificado de calostro y finalmente se caracterizó la expresión de los miR-
299 375 y miR-320a en relación con diferentes parámetros maternos.

300 Los exosomas generan especial interés debido a su participación en
301 procesos de comunicación intercelular y su resistencia, diversos estudios han
302 demostrado que exosomas de leche parecen sobrevivir a la digestión, ser
303 absorbidos por el organismo y llegar a tejidos diana (Liao *et al.*, 2017).
304 Actualmente es complicado obtener una fracción de EV completamente pura y
305 libre de componentes no vesiculares, por lo que la sociedad internacional de
306 vesículas extracelulares propone incluir un conjunto de pruebas junto con las
307 conclusiones presentadas (Théry *et al.*, 2018). En este estudio se utiliza un
308 protocolo de aislamiento basado en un sistema acuoso de dos fases (ATPS:
309 Aqueous Two-Phase System) que previamente ha sido reportado como un método
310 eficaz y que proporciona una muestra libre de una serie de contaminantes como
311 proteína y ácidos grasos (Kırbaş *et al.*, 2019).

312 Para caracterizar los exosomas obtenidos, se realizaron varios análisis
313 complementarios para reunir evidencia que asegurara la presencia de exosomas
314 en las muestras. En primer lugar, el ensayo de CONAN permitió evaluar la pureza
315 de las soluciones enriquecidas en exosomas y determinar su concentración
316 molar. Además, las micrografías electrónicas obtenidas mediante TEM (figura 2)

317 confirmaron la presencia de una población de VE de tamaño nanométrico,
318 oscilando entre 40 y 90 nm, lo que proporciona evidencia visual de la morfología
319 de los exosomas. Finalmente, el análisis por DLS mostró la distribución de
320 tamaños de las partículas en las soluciones, apoyando los resultados de TEM y
321 proporcionando datos cuantitativos sobre el tamaño de los exosomas. En
322 conjunto, estos métodos permiten verificar la presencia de exosomas en la
323 muestra para realizar análisis posteriores.

324 En cuanto al análisis de la expresión de miRNAs exosomales de leche
325 materna humana se exploraron las correlaciones entre los miRNAs miR-375 y
326 miR-320a y diversas características maternas, como el perfil lipídico, el índice de
327 masa corporal pregestacional, la madurez de la leche materna, entre otras.
328 Aunque no se encontró una diferencia significativa entre la expresión de estos
329 miRNAs por grupos, los análisis de covarianza si mostró asociaciones de la
330 expresión de estos miRNAs con otras características maternas. Estudios previos
331 han sugerido que factores maternos como el IMC pregestacional, la diabetes
332 mellitus gestacional (DMG), etnicidad y otras características maternas pueden
333 tener un impacto en los niveles de expresión de ciertos miRNAs (Bozack *et al.*,
334 2021; Shah *et al.*, 2021). No obstante, las diferencias entre estudios y el tamaño
335 limitado de las muestras impiden establecer conclusiones definitivas.

336 En este estudio, se identificó una asociación entre la expresión relativa del
337 miR-320a y la madurez de la leche, observándose correlaciones positivas en
338 mujeres con trigliceridemia. Además, se encontró una correlación negativa con la
339 edad gestacional, lo que sugiere una relación entre parámetros temporales y la
340 expresión de este miRNA. Estudios longitudinales anteriores han indicado que

341 cada miRNA parece seguir un patrón temporal de expresión único, aunque este
342 comportamiento no ha sido descrito previamente para el miR-320a (Raymond *et*
343 *al.*, 2022). En concordancia con un estudio previo, se encontró que este miRNA
344 estaba más expresado en el calostro de madres a término que en el de madres
345 con partos prematuros; esta correlación entre la edad gestacional y la expresión
346 del miR-320a se mantuvo en este estudio a pesar de que solo incluyeron mujeres
347 con partos a término (Shiff *et al.*, 2019).

348 En cuanto a parámetros bioquímicos, únicamente se observan
349 correlaciones significativas del miR-320a al hacer el análisis por grupos; en
350 mujeres con normolipemia este miRNA está correlacionado de forma negativa con
351 la concentración de colesterol HDL, también presenta una correlación negativa en
352 mujeres con trigliceridemia y los valores de colesterol VLDL y triglicéridos,
353 finalmente en mujeres con dislipidemia tiene una correlación positiva con los
354 niveles de colesterol LDL. Hasta la fecha, este es el único estudio que ha
355 explorado el perfil lipídico materno y la expresión de miRNAs en leche materna,
356 pero estudios en suero de pacientes con síndrome metabólico reportaron una
357 disminución del miR-320a y además una correlación negativa con los niveles
358 séricos de colesterol LDL contrario a los hallazgos encontrados en mujeres con
359 dislipidemia de este estudio (Abd El-Jawad *et al.*, 2022).

360 Finalmente, únicamente en mujeres con colesterolemia, se observó una
361 fuerte correlación entre la expresión relativa del miR-320a y el crematocrito. En
362 este estudio el crematocrito se utilizó como un indicador aproximado del contenido
363 energético de la leche, estos resultados sugieren que, en este grupo, a medida
364 que el infante consume más miR-320a, también consume más energía. Aunque no

365 existen estudios previos que asocien directamente el valor nutricional de la leche
366 con este miRNA, la literatura sugiere que los miRNAs en la leche humana pueden
367 estar asociados con el contenido lipídico de la leche y además estar relacionados
368 con la identidad de los ácidos grasos presentes (Alsaweed *et al.*, 2015, 2016;
369 Zamanillo *et al.*, 2019).

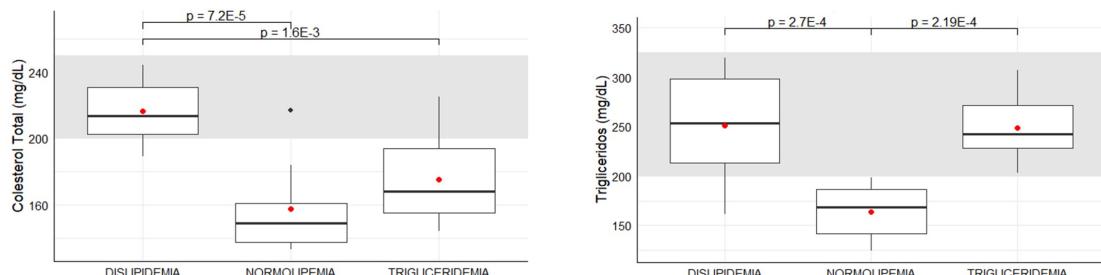
370 En cuanto al miR-375, se encontró una diferencia significativa su expresión
371 en relación con el tiempo de ayuno al momento de la toma de muestra, además
372 tanto en mujeres con trigliceridemia y dislipidemia existe una correlación negativa
373 entre estos parámetros. Si bien no existen antecedentes directos que vinculen la
374 expresión de este miRNA en leche con el tiempo de ayuno, ha sido ampliamente
375 reportado que la dieta materna es un factor clave que afecta la expresión de
376 algunos miRNAs en leche materna (Yeruva *et al.*, 2023). Es importante señalar
377 que el miR-375 está relacionado con la homeostasis de la glucosa en sangre e
378 induce la diferenciación adipogénica, además que la sobreexpresión de miR-375
379 atenúa la liberación de insulina (Iacomino *et al.*, 2021). Al disminuir la expresión de
380 miR-375 en la leche materna con el aumento del tiempo de ayuno, podría estar
381 favoreciendo una mayor utilización de las grasas como fuente de energía en el
382 lactante.

383 En este estudio existen indicios de que el estilo de vida de las madres tanto
384 antes como durante el embarazo parecen tener un efecto en la secreción de
385 algunos miRNAs; en mujeres con dislipidemia existe una disminución en la
386 expresión del este miR-375 asociada a una mayor actividad física antes del
387 embarazo, en este mismo grupo de mujeres el miR-320a está asociado de forma
388 negativa con el tiempo en reposo de la madre durante el embarazo. Finalmente,

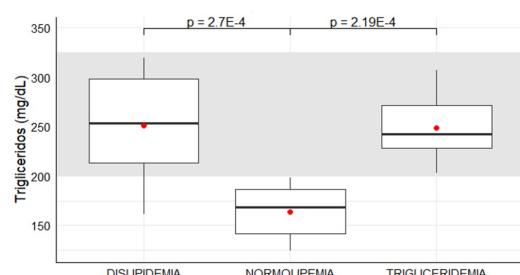
389 diversos estudios han correlacionado la expresión de algunos miRNAs con el IMC
390 pregestacional (Mirza *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2021; Pomar *et al.*, 2022), en este
391 trabajo el miR-320a se correlacionó de forma negativa con este parámetro,
392 mientras que el miR-375 se correlacionó de forma positiva únicamente en mujeres
393 con normolipemia.

394 Los resultados de este trabajo revelan que la expresión de los miR-320a y
395 miR-375 en la leche materna está influenciada por factores maternos como la
396 madurez de la leche, el perfil lipídico y el tiempo de ayuno previo a la toma de
397 muestra, ademas ambos miRNAs parecen mostrar indicios de tener correlación con
398 el estilo de vida materno antes y durante el embarazo. En particular, el miR-320a
399 mostró una asociación significativa con la madurez de la leche y una tendencia a
400 correlacionarse con los triglicéridos y el VLDL, mientras que el miR-375 presentó
401 una relación con el ayuno. Esta es la primera aproximación que correlaciona el
402 estado de alimentación materno con la expresión de algún miRNA.

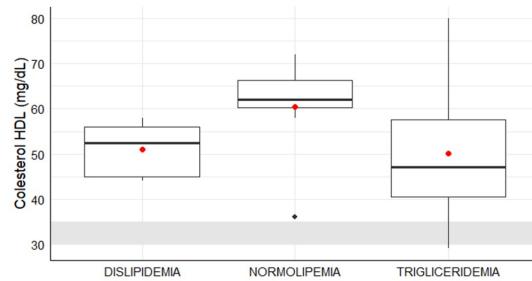
403



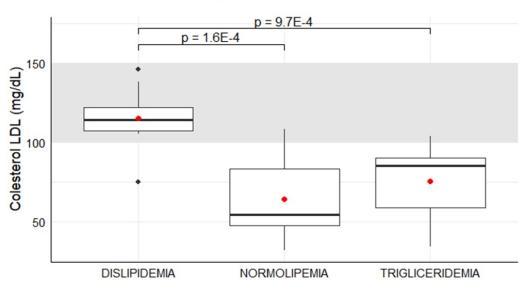
404 (A) (B)



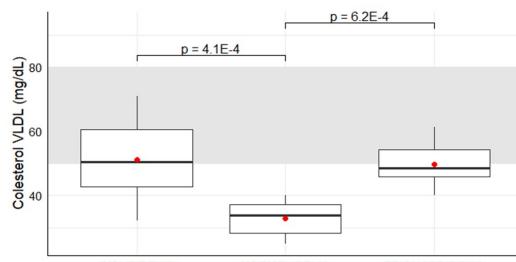
404 (A) (B)



405 (C) (D)



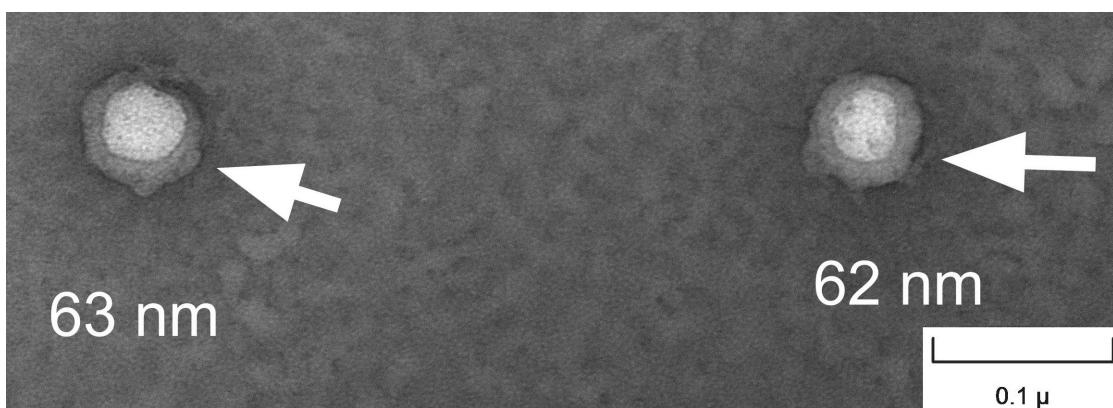
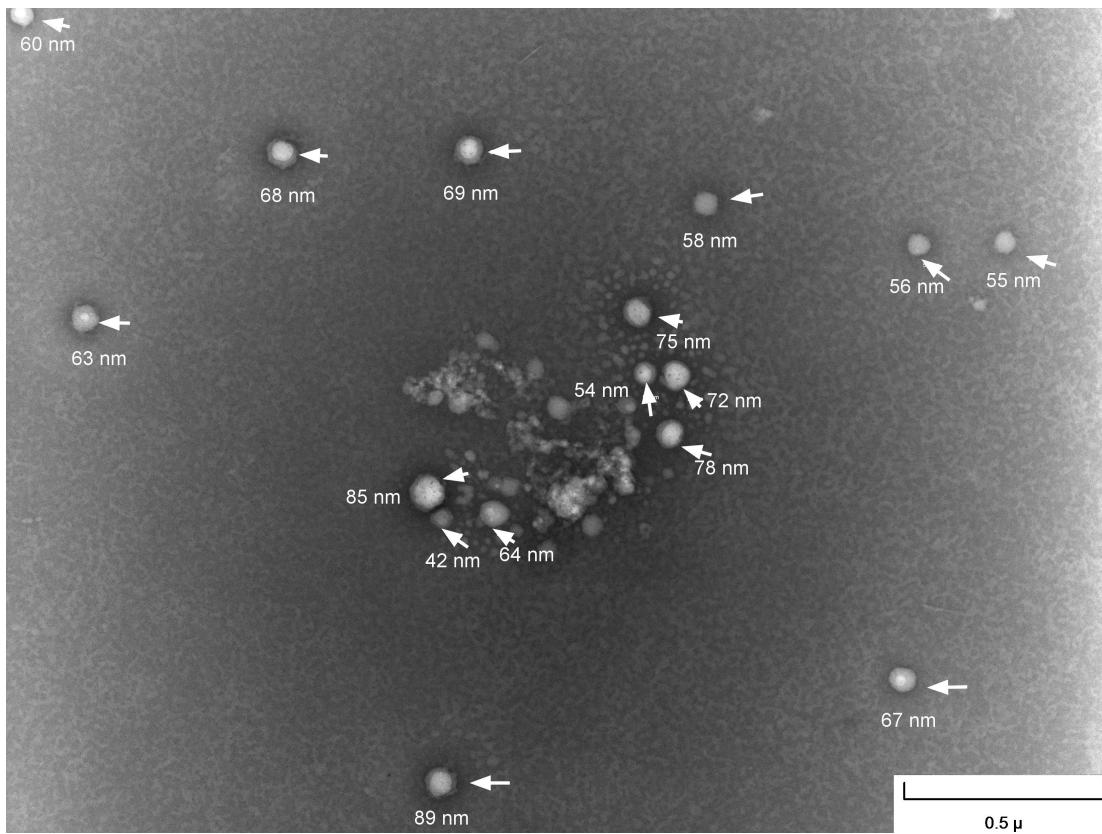
405 (C) (D)



406 (E)

407 **Figura 1 Comparación del perfil de lípidos por grupo.**

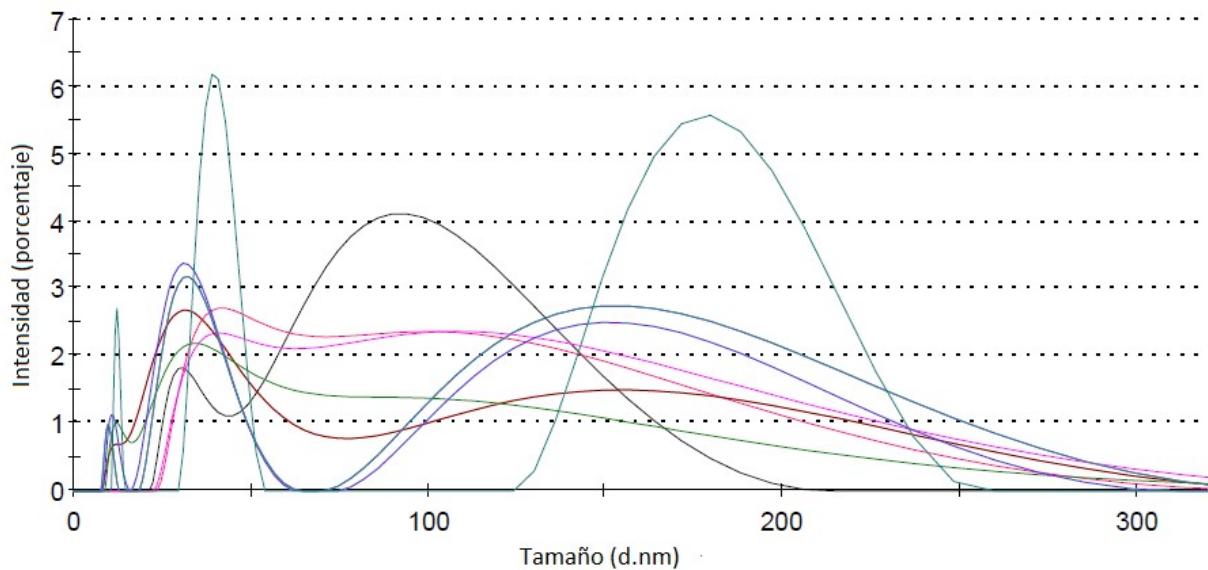
408 Comparación de los valores de colesterol (A), triglicéridos (B), colesterol HDL (C),
 409 colesterol LDL (D) y colesterol VLDL (E) en los diferentes grupos de estudio. La
 410 zona sombreada de cada gráfico corresponde a los valores fuera del intervalo
 411 saludable.
 412



415 **Figura 2 Exosomas de leche materna humana.**

416 En la imagen A se muestra un campo de exosomas, se aprecian cuerpos esféricos
417 con dos zonas de diferentes densidades electrónicas con distribuciones de tamaño
418 de entre 30 y 90 nanómetros, en la imagen B se observan dos exosomas con la
419 misma morfología.

420



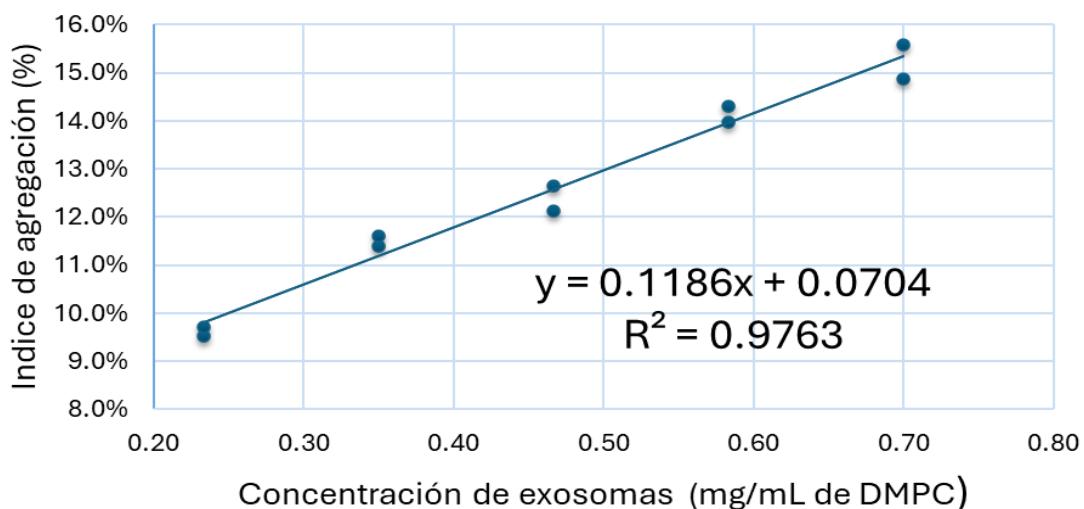
421

422 **Figura 3 Distribución de tamaños de exosomas (DLS).**

423 Análisis de tamaño de exosomas obtenidos de 8 muestras de suero clarificado de
424 leche materna humana por el método de ATPS, en el eje horizontal se presenta el
425 tamaño de las partículas y el eje vertical corresponde a la intensidad (en
426 porcentaje) correspondiente. Se observa la distribución de tamaños de las
427 diferentes poblaciones de exosomas obtenidas.

428

Curva de calibración CONAN



429 (A)



430 (B)

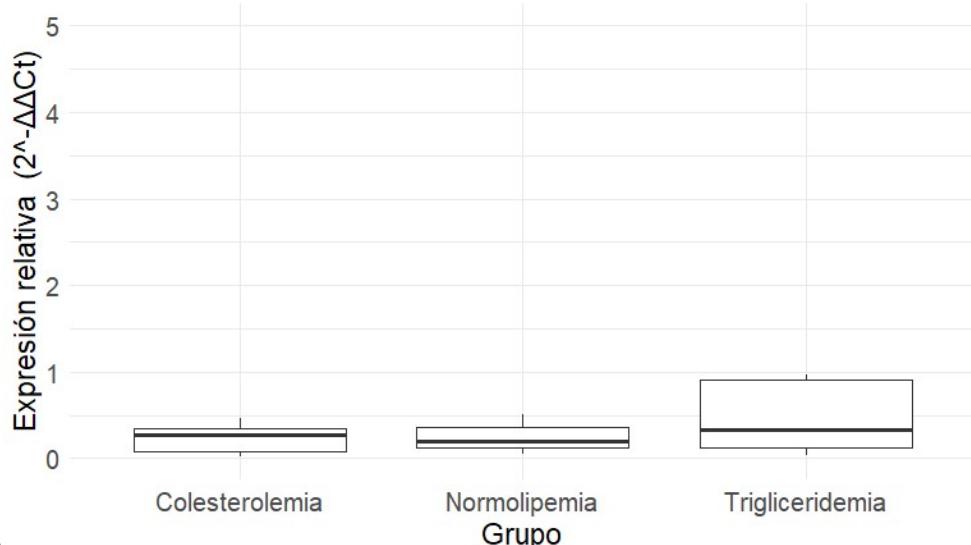
431 **Figura 4 Curva de calibración de exosomas evaluados por CONAN**

432 Curva de calibración elaborada con liposomas de DMPC modulados a 50
433 nanómetros en concentraciones de 0.7 y 0.23 mg/mL, en el eje horizontal se
434 presenta la concentración de exosomas y el eje vertical se presenta el porcentaje
435 de agregación de las nanopartículas (A). En la imagen B se presenta la curva de
436 microdilución de CONAN por triplicadp (filas 2, 3 y 4). Se observa el cambio de

- 437 coloración de nanopartículas esféricas de oro, el cambio es gradual de rojo a azul
- 438 a medida que disminuye la concentración de exosomas.
- 439

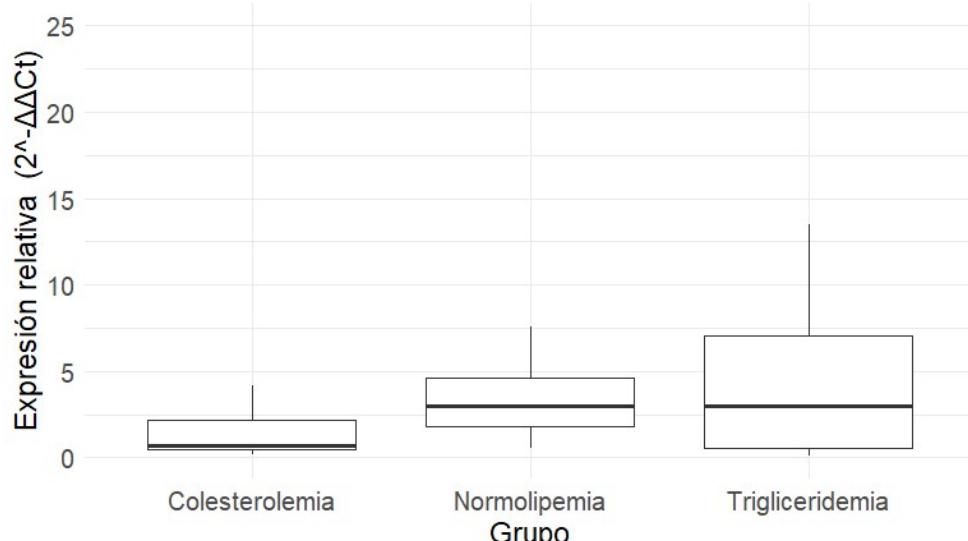
440

MIR-320a



441 (A)

MIR-375

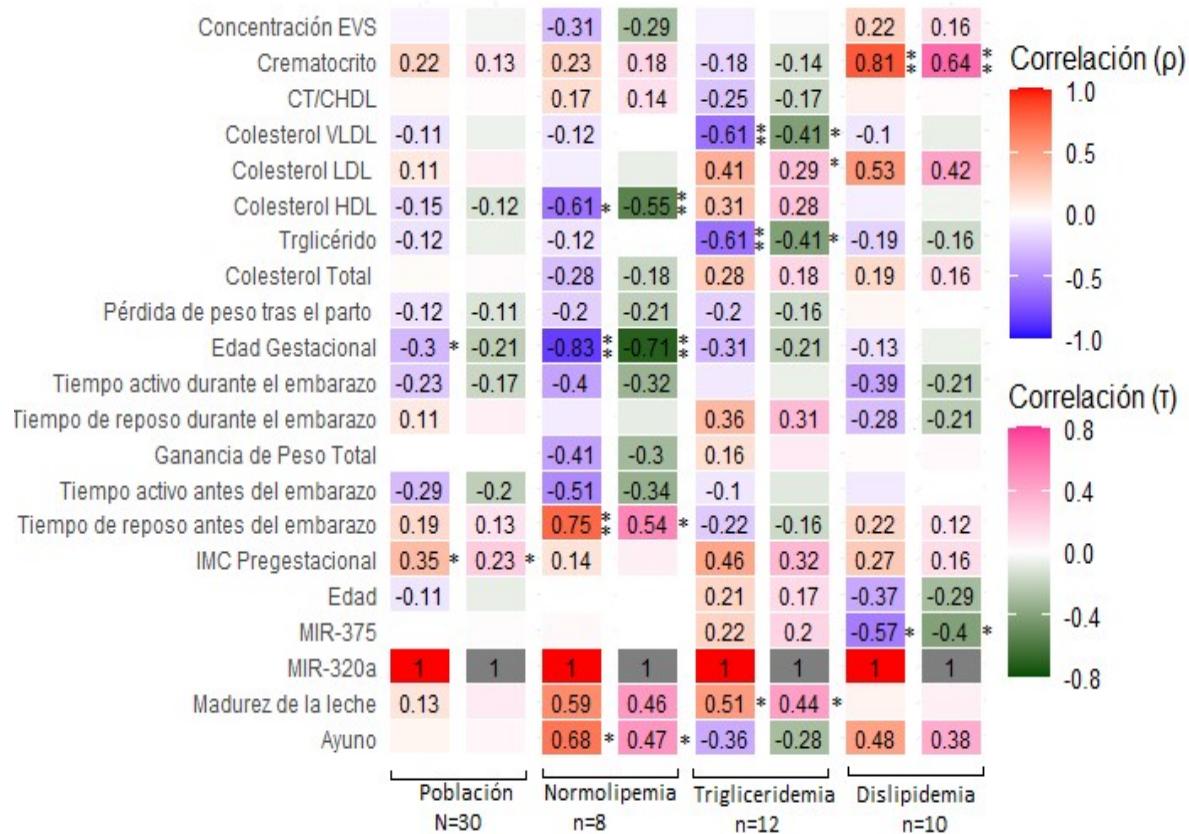


442 (B)

443 **Figura 5 Expresión relativa del miR- 320a y el miR-375.**

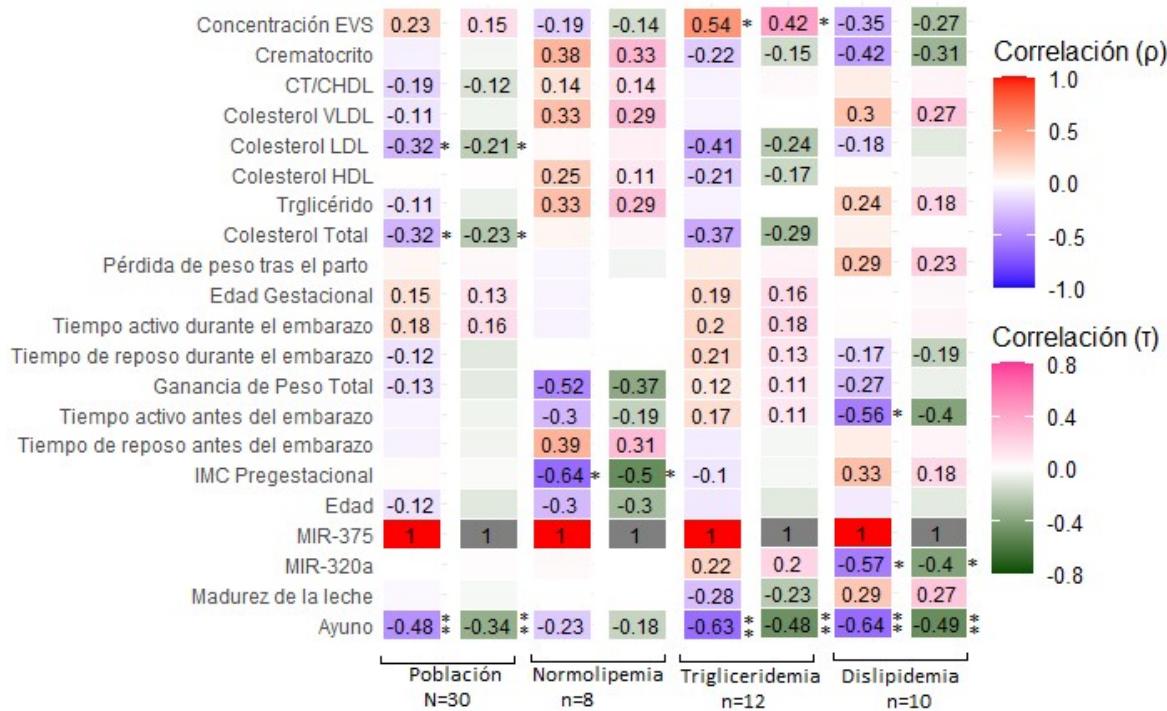
444 Expresión normalizada de los miR-320a (A) y miR-375 (B) de exosomas de
445 calostro en los diferentes grupos de estudio. No se encontraron diferencias
446 significativas entre grupos por la prueba estadística de Kruskall.

447



450 Figura 6 Asociaciones entre el miR-320a y las características maternas

451 Se presentan los coeficientes de correlación de Spearman (ρ) (series en color azul
 452 y rojo) y Kendall (τ) (series en color rosa y verde) entre la expresión relativa del
 453 miR-320a y los parámetros evaluados en este estudio. (Valor-P < 0.05**, Valor-P <
 454 0.1*).



455

456 **Figura 7 Asociaciones entre el miR-375 y las características maternas**

457 Se presentan los coeficientes de correlación de Spearman (ρ) (series en color azul
 458 y rojo) y Kendall (τ) (series en color rosa y verde) entre la expresión relativa del
 459 miR-375 y los parámetros evaluados en este estudio. (Valor-P < 0.05**, Valor-P <
 460 0.1*).

461

462 **Tabla 1 Cebadores utilizados en la RT-qPCR**

463

miRNA	Iniciador Stem Loop	Iniciador sentido específico
miR-486-5p	5' GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACA CTC GGG 3'	5' TGT TTT TTT TTT TCC TGT ACT GAG CTG 3'
miR-375-3p	5' GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACT CAC GC 3'	5' TGG TTT TTG TTC GTT CGG CT 3'
miR-320a-3p	5' GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACA TCG CCC 3'	5' ATG TTT TTT TTT TAA AAG CTG GGT TGA GA 3'
Iniciador antisentido universal.	5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'	

464

465

466 **Tabla 2: Características de los grupos estudiados.**

467

	Dislipidemia (n=10)	Normolipemia (n=8)	Trigliceridemia (n=12)	ANOVA Valor-P
Datos previos al embarazo (autoinformado)				
Edad (años)	24.1 ± 3.9	25.8 ± 4.2	22.4 ± 4.7	ns
IMC pregestacional (kg/m ²)	25.5 ± 4.0	25.9 ± 5.4	27.0 ± 5.2	ns
Paridad	2.1 ± 1.2	3.3 ± 1.5	2.2 ± 1.0	Ns
Tiempo en reposo (h)	9.3 ± 1.8	8.0 ± 1.9	9.0 ± 1.0	Ns
Tiempo activo (h)	9.9 ± 3.6	13.3 ± 2.3	7.5 ± 4.9	0.0125
Tiempo en sedentario (h)	4.9 ± 3.6	2.8 ± 1.3	7.5 ± 4.9	0.0332
Datos durante el embarazo (autoinformado)				
Ganancia de peso 1er trimestre (kg)	2.9 ± 2.0	0.5 ± 1.2	0.0 ± 3.9	Ns
Ganancia de peso 2do trimestre (kg)	3.0 ± 2.4	1.7 ± 2.5	3.6 ± 1.7	Ns
Ganancia de peso 3er trimestre (kg)	4.0 ± 1.8	3.4 ± 3.6	4.1 ± 4.0	Ns
Ganancia total de peso (kg)	9.9 ± 5.5	5.6 ± 5.9	7.7 ± 6.9	Ns
Tiempo en reposo (h)	11.8 ± 2.0	9.1 ± 1.9	10.6 ± 1.6	0.0177
Tiempo activo (h)	7.4 ± 2.7	10.8 ± 3.7	7.5 ± 3.5	Ns
Tiempo en sedentario (h)	4.9 ± 3.1	4.1 ± 3.3	5.9 ± 3.9	Ns
Perdida de peso tras el embarazo	4.5 ± 0.6	4.1 ± 0.8	4.1 ± 0.7	Ns
Datos del infante				
Tipo de parto (% Vaginal)	100.0	63.0	67.0	Ns

Edad gestacional (semanas)	38.9 ± 1.1	38.5 ± 2.3	39.7 ± 1.2	ns
Sexo (% femenino)	50.0	88.0	92.0	ns
Peso al nacer (kg)	3.2 ± 0.5	3.0 ± 0.6	2.9 ± 0.4	ns
Talla al nacer (cm)	50.5 ± 3.9	50.1 ± 1.6	49.7 ± 2.4	ns
Datos de la muestra de leche				
Madurez de la leche (días)	2.9 ± 1.6	2.75 ± 1.6	1.41 ± 0.6	0.023
Tiempo tras el último vaciado (min).	148.8 ± 269.4	50.1 ± 49.1	138.7 ± 188.9	ns
Ayuno al momento de la toma (hrs)	3.6 ± 4.05	6.6 ± 5.8	6.1 ± 6.1	ns
Crematocrito	5.3 ± 2.4	7 ± 3	5.36 ± 2.19	ns
Concentración de exosomas (μmolar)	15.61 ± 11.6	5 ± 2.6	13.6 ± 6.4	0.0245
Tipo me extracción (% manual)	100	88	100	ns
Mama de procedencia (% ambas)	30	75	75	ns
ns: No significativo. Valor-P >= 0.05				

468

469

470 **Tabla 3 Perfil de lípidos de los grupos de estudio.**

471

Perfil de lípidos de la población de estudio.				
	Dislipidemia (n=10)	Normolipemia (n=8)	Trigliceridemias (n=12)	ANOVA Valor-P
Trigliceridos (mg/dl)	250.7 ± 54.4	163.8 ± 28.9	248.9 ± 31.3	8.55E-5
Colesterol HDL (mg/dl)	51 ± 5.9	60.5 ± 10.8	50.2 ± 15.7	Ns
Colesterol LDL (mg/dl)	114.9 ± 19.4	64.3 ± 27.2	75.5 ± 21.5	9.39E-5
Colesterol VLDL(mg/dl)	51.1 ± 12.3	32.8 ± 5.9	49.8 ± 6.3	1.9E-4
Colesterol total (mg/dl)	216.2 ± 19.1	157.3 ± 28.9	175.4 ± 25.2	6.27E-5
ns: No significativo. Valor-P >= 0.05				

472

473

474 **Referencias**

- 475 Abd El-Jawad, A.M. *et al.* (2022) 'The potential role of miR-27a and miR-320a in
476 metabolic syndrome in obese Egyptian females', *Journal of Genetic Engineering
477 and Biotechnology*, 20(1), p. 75. Available at: <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00348-x>.
- 479 Alcívar Mendoza, N.A. and Toledo Santana, N. (2022) 'Revisión bibliográfica sobre
480 la lactancia materna exclusiva y su influencia en la salud de la población',
481 *Qhalikay Revista de Ciencias de la Salud ISSN 2588-0608*, 6(3), pp. 41–51.
482 Available at: <https://doi.org/10.33936/qkrcs.v6i3.4968>.
- 483 Alsaweed, M. *et al.* (2015) 'Human Milk MicroRNA and Total RNA Differ
484 Depending on Milk Fractionation', *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(10), pp.
485 2397–2407. Available at: <https://doi.org/10.1002/JCB.25207>.
- 486 Alsaweed, M. *et al.* (2016) 'Human Milk Cells and Lipids Conserve Numerous
487 Known and Novel miRNAs, Some of Which Are Differentially Expressed during
488 Lactation', *PLOS ONE*, 11(4), p. e0152610. Available at:
489 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152610>.
- 490 Andersen, C.L., Jensen, J.L. and Ørntoft, T.F. (2004) 'Normalization of Real-Time
491 Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation
492 Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon
493 Cancer Data Sets', *Cancer Research*, 64(15), pp. 5245–5250. Available at:
494 <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
- 495 Ávila-Delgadillo, J. (2016) MicroRNAs circulantes asociados a diabetes mellitus
496 tipo 2 con expresión alterada en mexicanos adultos con sobrepeso y obesidad.

- 497 [tesis de maestría]. [San Luis Potosí]: IPICYT. Disponible en:
498 <http://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1010/1510>
- 499 Bozack, A.K. *et al.* (2021) 'Associations between maternal lifetime stressors and
500 negative events in pregnancy and breast milk-derived extracellular vesicle
501 microRNAs in the programming of intergenerational stress mechanisms (PRISM)
502 pregnancy cohort', *Epigenetics*, 16(4), pp. 389–404. Available at:
503 <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1805677>.
- 504 Chen, C. (2005) 'Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR',
505 *Nucleic Acids Research*, 33(20), pp. e179–e179. Available at:
506 <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>.
- 507 Iacomino, G. *et al.* (2021) 'The association of circulating miR-191 and miR-375
508 expression levels with markers of insulin resistance in overweight children: an
509 exploratory analysis of the I.Family Study', *Genes & Nutrition*, 16(1), p. 10.
510 Available at: <https://doi.org/10.1186/s12263-021-00689-1>.
- 511 Kırbaş, O.K. *et al.* (2019) 'Optimized Isolation of Extracellular Vesicles From
512 Various Organic Sources Using Aqueous Two-Phase System', *Scientific Reports*,
513 9(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55477-0>.
- 514 Kupsco, A. *et al.* (2021) 'Human milk extracellular vesicle miRNA expression and
515 associations with maternal characteristics in a population-based cohort from the
516 Faroe Islands', *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), pp. 1–17. Available at:
517 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84809-2>.
- 518 Liao, Y. *et al.* (2017) 'Human milk exosomes and their microRNAs survive
519 digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells', *Molecular Nutrition &*

- 520 *Food Research*, 61(11), p. 1700082. Available at:
521 <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700082>.
- 522 Lucas, A. *et al.* (1978) 'Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat
523 concentration and energy value of human milk.', *BMJ*, 1(6119), pp. 1018–1020.
524 Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.1.6119.1018>.
- 525 Manca, S. *et al.* (2018) 'Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA
526 cargos have unique tissue distribution patterns', *Scientific Reports*, 8(1), p. 11321.
527 Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29780-1>.
- 528 Mirza, A.H. *et al.* (2019) 'Breast milk-derived extracellular vesicles enriched in
529 exosomes from mothers with type 1 diabetes contain aberrant levels of micrornas',
530 *Frontiers in Immunology*, 10(OCT), p. 2543. Available at:
531 <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02543/FULL>.
- 532 Pomar, C.A. *et al.* (2022) 'Dietary Improvement during Lactation Normalizes miR-
533 26a, miR-222 and miR-484 Levels in the Mammary Gland, but Not in Milk, of Diet-
534 Induced Obese Rats', *Biomedicines*, 10(6), p. 1292. Available at:
535 <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10061292/S1>.
- 536 Raymond, F. *et al.* (2022) 'Longitudinal Human Milk miRNA Composition over the
537 First 3 mo of Lactation in a Cohort of Healthy Mothers Delivering Term Infants',
538 *The Journal of Nutrition*, 152(1), pp. 94–106. Available at:
539 <https://doi.org/10.1093/JN/NXAB282>.
- 540 Rodil-Garcia, P. *et al.* (2017) 'Analysis of MicroRNA Expression in Newborns with
541 Differential Birth Weight Using Newborn Screening Cards', *International Journal of
542 Molecular Sciences*, 18(12), p. 2552. Available at:
543 <https://doi.org/10.3390/ijms18122552>.

- 544 Shah, K.B. *et al.* (2021) 'Human milk exosomal microrna: Associations with
545 maternal overweight/obesity and infant body composition at 1 month of life',
546 *Nutrients*, 13(4), p. 1091. Available at: <https://doi.org/10.3390/NU13041091/S1>.
- 547 Shiff, Y.E. *et al.* (2019) 'MiRNA-320a is less expressed and miRNA-148a more
548 expressed in preterm human milk compared to term human milk', *Journal of
549 Functional Foods*, 57, pp. 68–74. Available at:
550 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.047>.
- 551 Théry, C. *et al.* (2018) 'Minimal information for studies of extracellular vesicles
552 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for
553 Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines', *Journal of
554 Extracellular Vesicles*, 7(1), p. 1535750. Available at:
555 <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- 556 Tingö, L. *et al.* (2021) 'Non-Coding RNAs in Human Breast Milk: A Systematic
557 Review', *Frontiers in Immunology*, 12. Available at:
558 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.725323>.
- 559 Yeruva, L. *et al.* (2023) 'Human milk miRNAs associate to maternal dietary
560 nutrients, milk microbiota, infant gut microbiota and growth', *Clinical Nutrition*,
561 42(12), pp. 2528–2539. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.10.011>.
- 562 Zamanillo, R. *et al.* (2019) 'Breast Milk Supply of MicroRNA Associated with Leptin
563 and Adiponectin Is Affected by Maternal Overweight/Obesity and Influences
564 Infancy BMI', *Nutrients*, 11(11), p. 2589. Available at:
565 <https://doi.org/10.3390/nu11112589>.
- 566 Zendrini, A. *et al.* (2020) 'Augmented COlorimetric NANoplasmonic (CONAN)
567 Method for Grading Purity and Determine Concentration of EV Microliter Volume

568 Solutions', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. Available at:
569 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00452>.

570 Zhang, Y.H. *et al.* (2023) 'miR-375 upregulates lipid metabolism and inhibits cell
571 proliferation involved in chicken fatty liver formation and inheritance via targeting
572 recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region (RBPJ)',
573 *Poultry Science*, 102(1), p. 102218. Available at:
574 <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2022.102218>.