



**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 an 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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

6 ¹ División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y
7 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

1 **Introducción**

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

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

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

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

2 Materiales y métodos

2.1 Declaración de ética

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

2.2 Participantes

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

2.4.2 Procesamiento de las muestras de calostro

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

2.4.2.1 Crematocrito

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

2.4.2.2 Obtención de suero clarificado de leche

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

2.5 Obtención y análisis de exosomas de calostro

2.5.1 Aislamiento de exosomas

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

2.5.2 Identificación de exosomas mediante TEM

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

2.5.3 Evaluación de tamaño de los exosomas

Las determinaciones de tamaño de las partículas en las soluciones enriquecidas de exosomas se realizaron en diluciones 1:20 con agua miliQ 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 glycerol-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 (Reactivo
157 de lisis de proteínas, exosomas e inactivación de RNAsas) para liberar y
158 estabilizar el RNA. Posteriormente, se mezcló con amortiguador RPP (Reactivo 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

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

2.6.2 Síntesis de cDNA

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

2.6.3 PCR cuantitativa

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

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

2.7 Análisis de datos

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

3 Resultados

3.1 Características de las participantes del estudio

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

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

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

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

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

3.2 Identificación, evaluación del tamaño y cuantificación de exosomas

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

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

3.3 Evaluación de microRNAs exosomales

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

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

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

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

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

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

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

4 Discusión

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

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

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

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

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

En este estudio, se identificó una asociación entre la expresión relativa del miR-320a y la madurez de la leche, observándose correlaciones positivas en mujeres con trigliceridemia. Además, se encontró una correlación negativa con la edad gestacional, lo que sugiere una relación entre parámetros temporales y la 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 creatinocrito. En
362 este estudio el creatinocrito 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

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

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

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

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

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

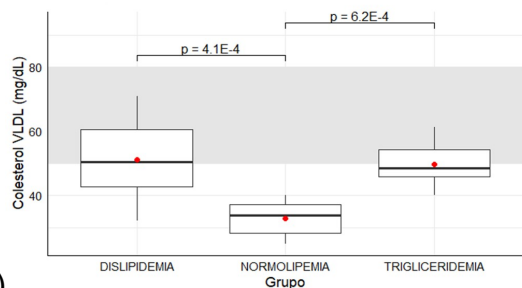
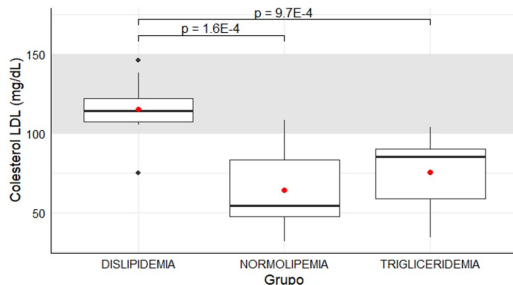
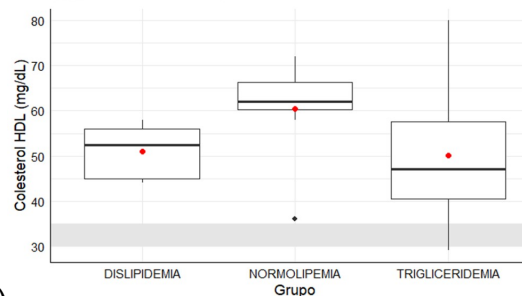
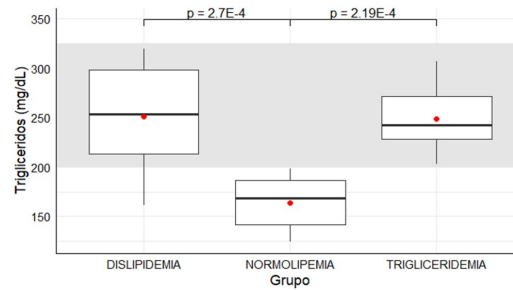
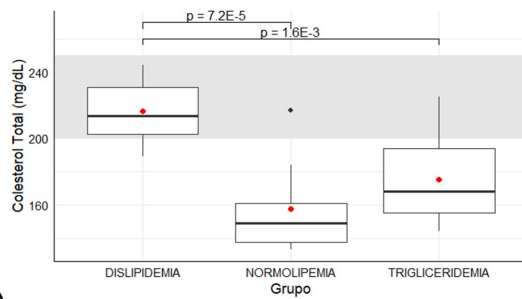
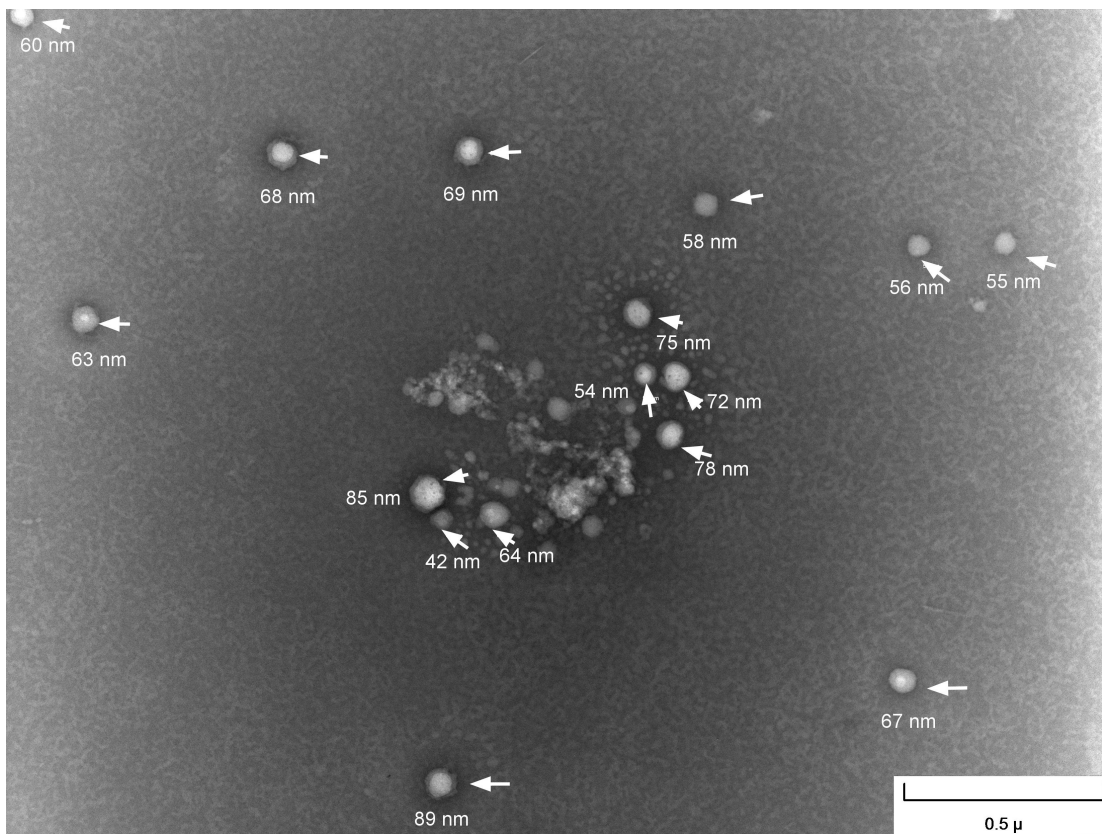
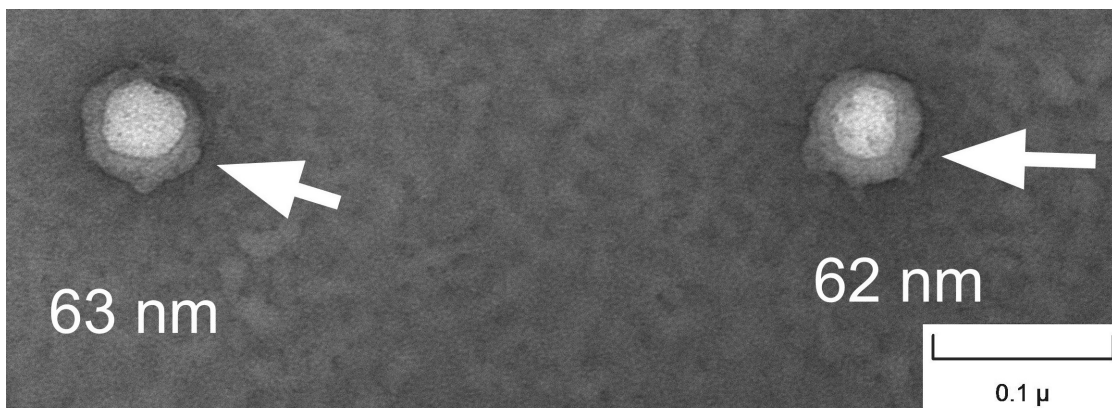


Figura 1 Comparación del perfil de lípidos por grupo.

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



413 (A)



414 (B)

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

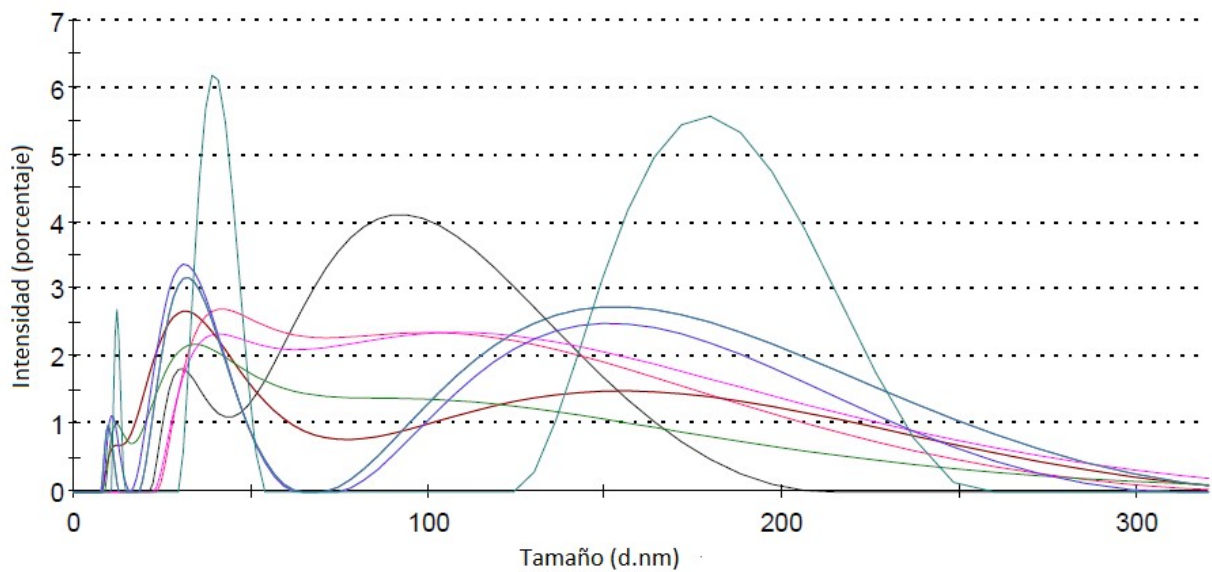
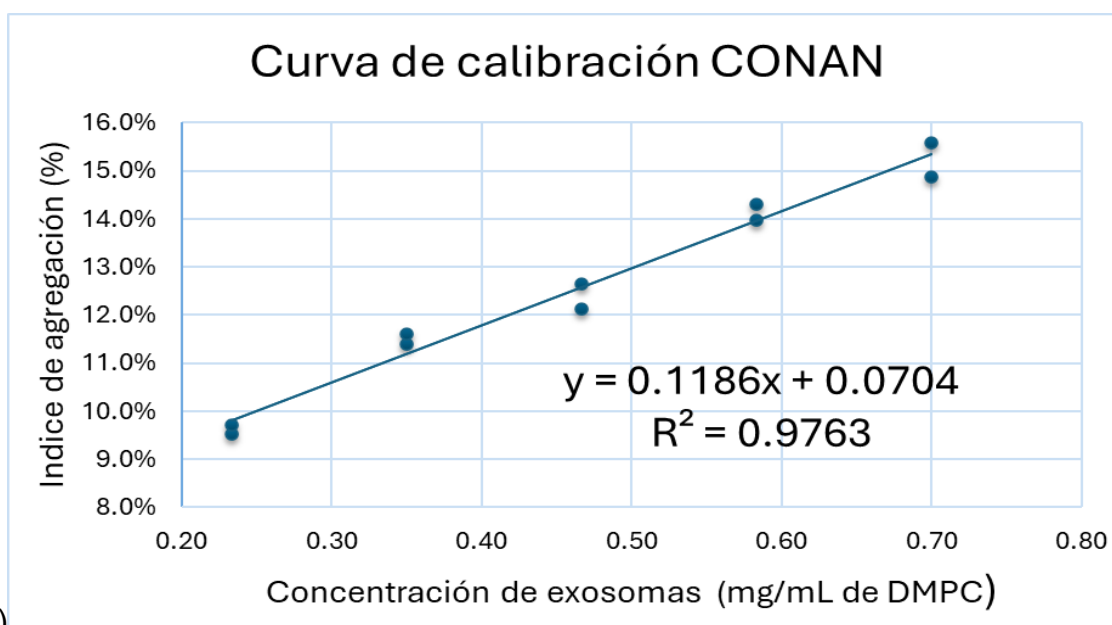


Figura 3 Distribución de tamaños de exosomas (DLS).

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



429 (A)



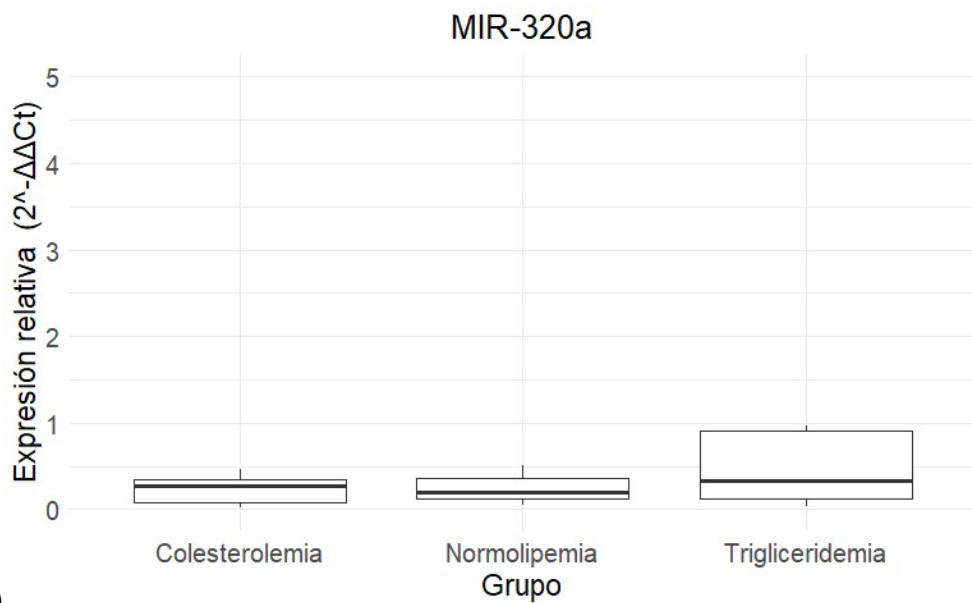
430 (B)

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

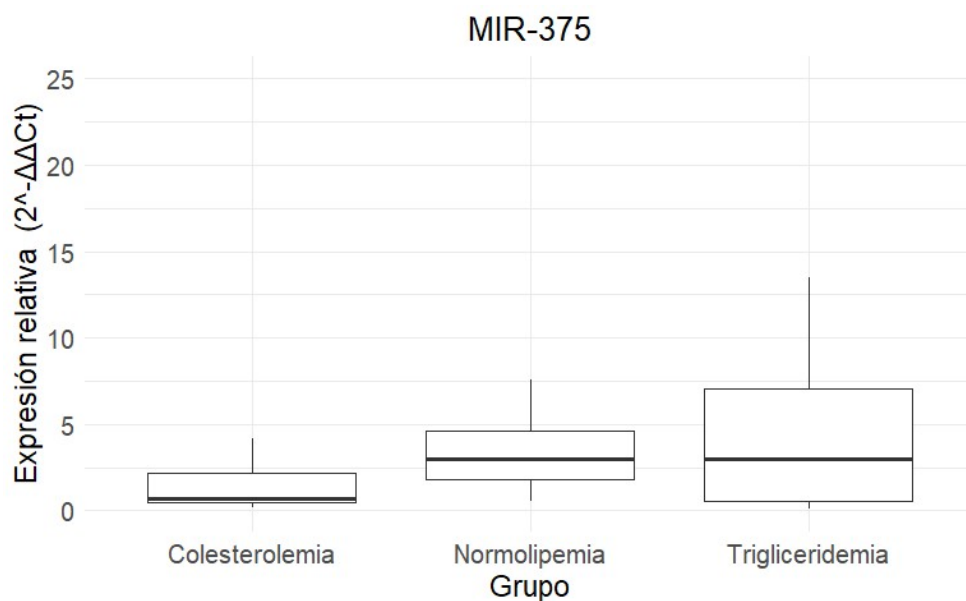
432 Curva de calibración elaborada con liposomas de DMPC modulados a 50
 433 nanómetros en concentraciones de 0.7 y 0.23 mg/mL, en el eje horizontal se
 434 presenta la concentración de exosomas y el eje vertical se presenta el porcentaje
 435 de agregación de las nanopartículas (A). En la imagen B se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



441 (A)

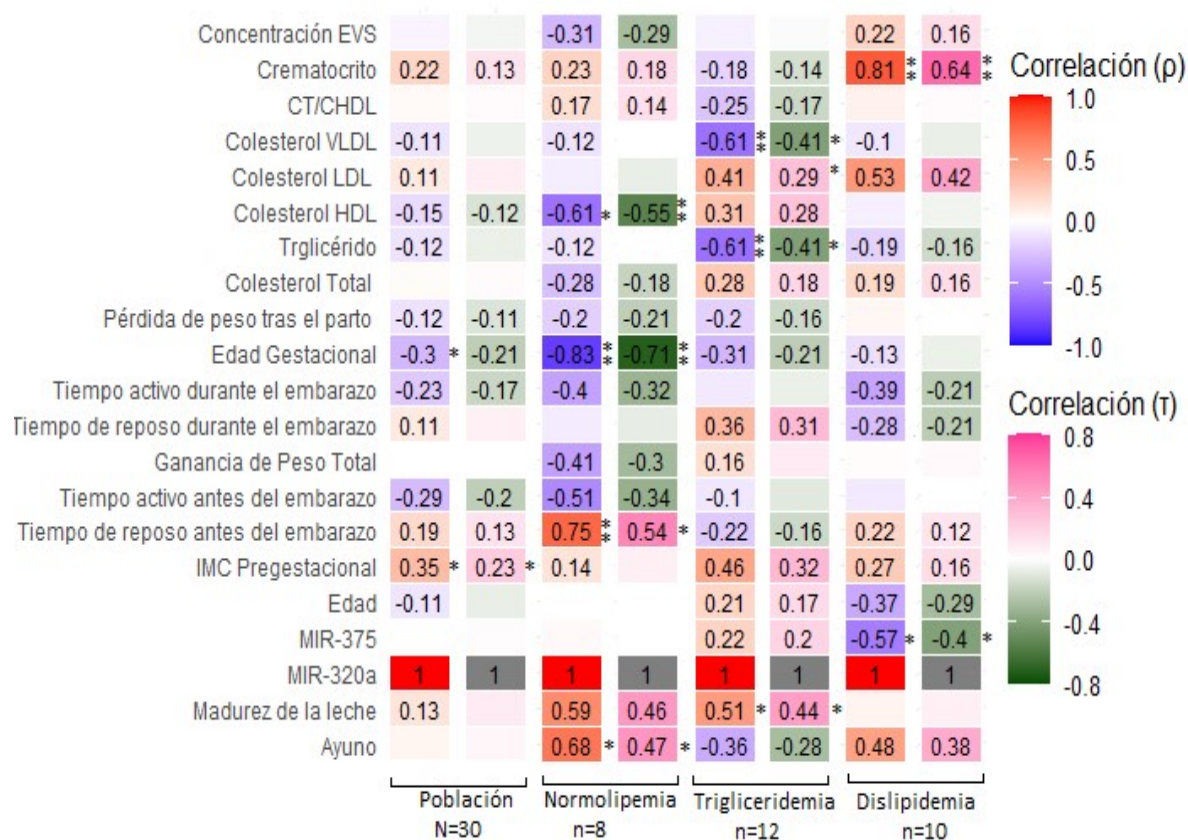


442 (B)

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



449

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*).

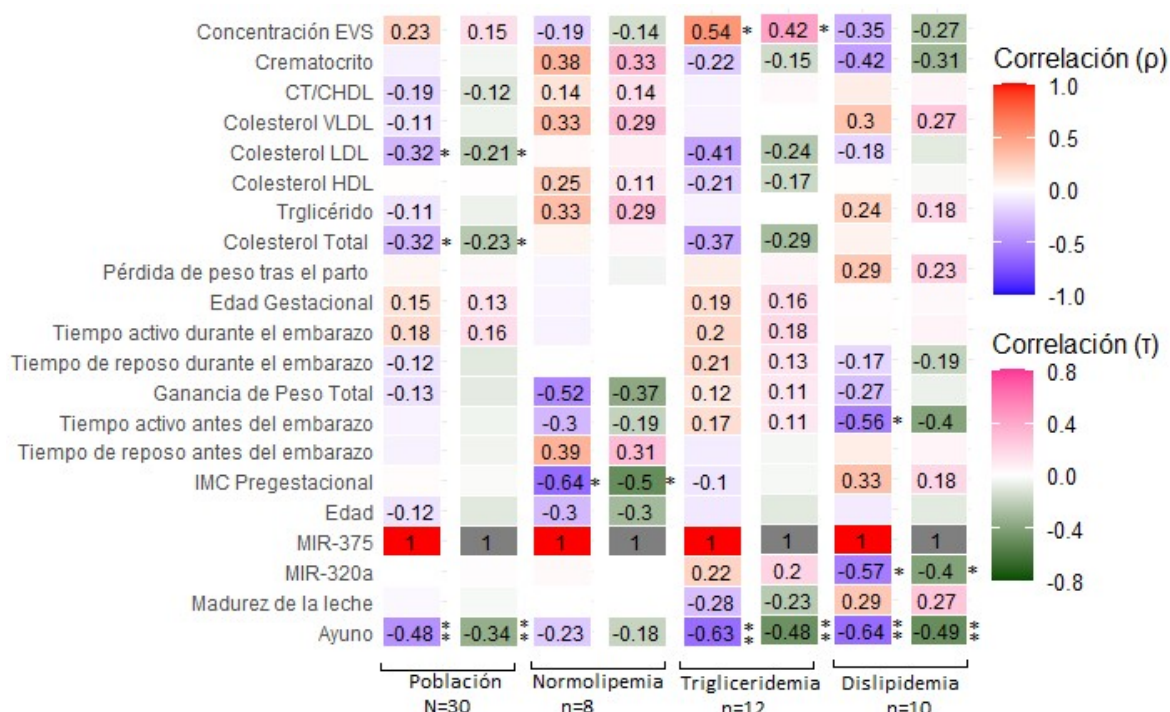


Figura 7 Asociaciones entre el miR-375 y las características maternas

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

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

Características de los grupos estudiados.				
	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 de 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)	Trigliceridemi a (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

Referencias

- Abd El-Jawad, A.M. *et al.* (2022) 'The potential role of miR-27a and miR-320a in metabolic syndrome in obese Egyptian females', *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), p. 75. Available at: <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00348-x>.
- Alcívar Mendoza, N.A. and Toledo Santana, N. (2022) 'Revisión bibliográfica sobre la lactancia materna exclusiva y su influencia en la salud de la población', *QhaliKay Revista de Ciencias de la Salud ISSN 2588-0608*, 6(3), pp. 41–51. Available at: <https://doi.org/10.33936/qkracs.v6i3.4968>.
- Alsaweed, M. *et al.* (2015) 'Human Milk MicroRNA and Total RNA Differ Depending on Milk Fractionation', *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(10), pp. 2397–2407. Available at: <https://doi.org/10.1002/JCB.25207>.
- Alsaweed, M. *et al.* (2016) 'Human Milk Cells and Lipids Conserve Numerous Known and Novel miRNAs, Some of Which Are Differentially Expressed during Lactation', *PLOS ONE*, 11(4), p. e0152610. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152610>.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L. and Ørntoft, T.F. (2004) 'Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets', *Cancer Research*, 64(15), pp. 5245–5250. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
- Ávila-Delgadillo, J. (2016) MicroRNAs circulantes asociados a diabetes mellitus 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) 'Creatocrit: 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/BIMEDICINES10061292/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>.