

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Matemáticas y Física
Tecnología y Sustentabilidad

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Programa de Apoyo a la Investigación en Nanotecnología



ITESO

Universidad Jesuita
de Guadalajara

4I03 Dispositivos Médicos Nanoestructurados

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURAL DE EXOSOMAS DE RIÑÓN POR MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y DE FUERZA ATÓMICA

PRESENTAN

Ingeniería en Nanotecnología. Carlos Alejandro Quiroz Solís

Profesor PAP:

Yenni Velázquez Galván
Elsie Evelyn Araujo Palomo

Tlaquepaque, Jalisco

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

Se realizó la caracterización estructural y morfológica de exosomas de riñón provenientes de muestra urinarias. Primeramente, se realizó la extracción de exosomas de riñón a partir de muestras de orina por medio de centrifugación diferencial. Posteriormente, se realizó la fijación química de la muestra para estabilizarla antes de seguirla procesando.

Luego, se depositó la muestra en sustratos de silicio y se metalizó con 5 nm de plata por medio de pulverización catódica. Después, se observó la muestra por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscopy*) y se obtuvo una distribución de tamaño a partir de mediciones en las micrografías, en donde se obtuvo que los exosomas del primer paciente tuvieron un diámetro de 98 ± 4 nm, y las del segundo paciente de 70 ± 8 nm.

Por otro lado, con la muestra fijada por método químico, se preparó la muestra para su observación por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscopy*). De donde se pudieron tomar mediciones tanto de la altura como del ancho. En donde los exosomas del paciente 1 presentaron una altura de 8.27 ± 2 nm y un ancho de 175.1 ± 39 nm. Por otro lado, los exosomas del paciente 2 presentaron una altura de 9.06 ± 3.5 nm.

1. Introducción

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es una enfermedad que se define como la disminución de la función del sistema urinario, o como un daño en los riñones extendido por más de tres meses por una patología renal y que se detecta indirectamente por la composición de la sangre u orina, o directamente con anomalías en los estudios de imagen renal por medio de una biopsia (Dehesa, 2008). La ERC es una enfermedad, que al ser crónica va evolucionando, y esta evolución se ha dividido en seis estadios, siendo el primero el más ligero y el sexto el más grave. Se estima que esta enfermedad la posee entre el 11-13% de la población mundial, principalmente derivada de la *diabetes mellitus* (Hill *et al*, 2016).

Por otro lado, la mayoría de las células eucariotas, incluyendo las de riñón excretan exosomas, los exosomas son vesículas extracelulares de tamaño nanométrico que sirven de comunicación intracelular en la mayoría de las células eucariotas. Los exosomas transportan ARN codificante, ARN no codificante, proteínas e incluso ADN

entre las células. (Heggmans, 2008). Dichos exosomas presentan tamaños de entre los 30 y los 150 nm (Zhou, 2020). En el caso de los riñones, estos excretan exosomas que son desechados vía urinaria, los cuales contienen dentro de su estructura proteínas que cambian su estructura en cada estadio de la ERC. Estas proteínas son las que son objeto de estudio, pues se busca que, por este método no invasivo, se pueda detectar rápidamente la ERC en su estadio más temprano. Asimismo, los exosomas se pueden visualizar como un valioso método no invasivo fuente de información de sucesos que ocurren en el riñón. La investigación de exosomas ha aumentado notablemente para identificar nuevos biomarcadores de la enfermedad (Vall *et al*, 2016).

Los exosomas están envueltos por una bicapa lipídica, es decir que una capa doble de fosfolípidos que precisamente por ese grupo fosfato es que la molécula lipídica tiene una cabeza hidrofóbica que permite a la molécula mantenerse estable en un medio líquido, además, este grupo fosfato confiere a la membrana una carga negativa. En las Imagen 1 se observa una vista transversal del exosoma, que permite visualizar la bicapa lipídica. En la Imagen 2 se puede apreciar la estructura del fosfolípido, en donde se observa a detalle la composición de la cabeza hidrofóbica. En la Imagen 3 se aprecia cómo estos exosomas surgen de la membrana celular, para enviar mensajes al medio exterior, y en la Imagen 4 se muestra cómo estos son recibidos por la célula receptora de la información (Karpman, 2017).

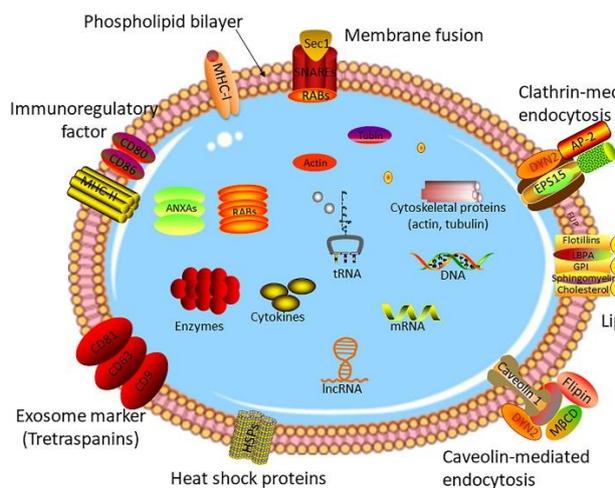
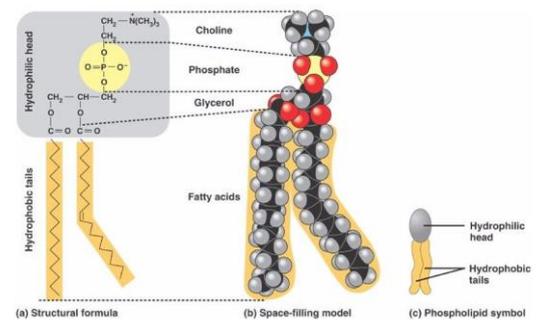


Imagen 1. Estructura del exosoma



Fosfolípido

Imagen 2. Molécula de fosfolípido que conforma la capa lipídica

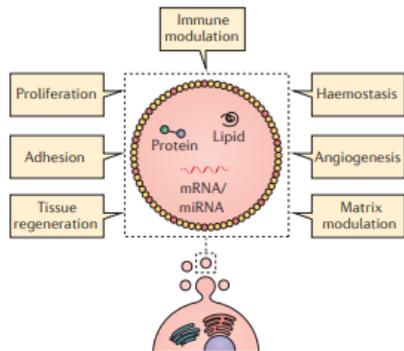


Imagen 3. Mensajes dentro del exosoma

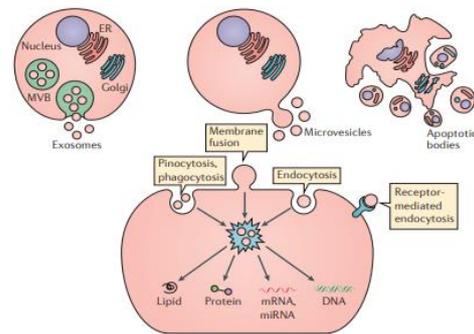


Imagen 4. Información aceptada por la célula receptora

1.1. Objetivos

- **General:**
Estudiar las propiedades estructurales y morfológicas de muestras biológicas blandas por medio de microscopía electrónica y fuerza atómica.
- **Específicos:**
 - Diseñar protocolos para la caracterización morfológica de exosomas por medio de Microscopía Electrónica de Barrido y de Fuerza Atómica
 - Realizar la fijación química por medio de aldehídos para ambos tipos de microscopía
 - Convertir una muestra biológica en conductora por medio de recubrimiento metálico nanométrico
 - Obtener la distribución de tamaño e información morfológica por cada técnica

1.2. Justificación

Los exosomas son importantes porque dentro de ellos hay información que utilizan las células para intercambiar información, ya que dentro de dichos exosomas las células son capaces de enviar mensajes, en la forma de ARN, ADN y proteínas, en los que se revela el estado general de la célula y por lo tanto del órgano que se está estudiando (Wu, 2015). A dichos tipos de moléculas que indican el estado biológico de un microorganismo (como lo son las células del riñón), se le llaman biomarcadores (Dear, 2013).

En este caso, es importante su estudio porque dentro de los exosomas de riñón están presentes proteínas que se ha demostrado que reducen su presencia al avanzar el paciente en la gravedad de la ERC (Karpman, 2017). Es importante caracterizarlos porque de esta manera se puede verificar una correcta extracción, así como su estabilidad fuera del medio estabilizante (PBS), que es necesaria para su posterior tratamiento de extracción de proteínas.

Las micrografías son importantes porque permiten ver de manera directa la muestra, así como determinar su tamaño y obtener datos adicionales para el estudio morfológico del exosoma en cada estadio de la ERC. Es importante, además, desarrollar métodos asequibles y eficaces de diagnóstico de la ERC ya que se trata de una enfermedad silenciosa que prevalece altamente en la población de todo el mundo (CDS, 2021). El estudio de las micrografías de exosomas es importante para el campo clínico ya que es el método más directo de observación de una muestra de tan pequeñas dimensiones (como lo son los exosomas que se encuentran en el rango

nanométrico) lo cual es el mejor indicador de que la muestra está presente y, por ende, que la extracción se está realizando correctamente. Se espera que al saber si la muestra se está extrayendo, se proceda a realizar el resto de la investigación con la seguridad de que los exosomas están presentes en las pruebas que se les realizan.

1.3 Antecedentes

En cuanto a las maneras actuales de realizar este tipo de estudios, se encuentran diversas maneras de extraer los exosomas, como la ultracentrifugación, la ultrafiltración, precipitación de polímeros e inmunoensayo. Asimismo, se realizan diferentes tipos de tratamientos para seguir estabilizando la muestra antes de llevarla a su observación por microscopía como la fijación y la criofijación, en los cuales se utilizan diferentes tipos de reactivos, como los aldehídos, lípidos y solventes. Una vez extraídos y tratados, se caracterizan por técnicas como la Microscopía Electrónica de Transmisión, el Análisis de Rastreo de Nanopartículas y Dispersión Dinámica de la Luz. A continuación, se entrará en detalle en cada uno de los aspectos mencionados.

Métodos de extracción de los exosomas:

- Ultracentrifugación diferencial:

El primer protocolo de extracción es la centrifugación diferencial, en el cual se utiliza la fuerza rotatoria para separar una muestra dentro de un contenedor al aprovechar las distintas densidades en cada muestra a centrifugar. En dicho proceso, hay ocasiones en lo que es importante rescatar de este proceso es el sobrenadante, es decir, la fase líquida que queda suspendida. Asimismo, existen los casos en los que es importante rescatar la pastilla o *pellet* que queda concentrada al fondo del tubo. Al hablar de centrifugación diferencial, se refiere a un proceso de varias etapas de centrifugación en las que en cada ciclo de centrifugado se varían los posibles parámetros como la fuerza rotatoria que suele darse en FCR (Fuerza Centrifugal Relativa) e incluso en RPM (Revoluciones Por Minuto), la temperatura y el tiempo. En cada etapa se obtiene una pastilla y un sobrenadante, que el experimentador manejará según su objetivo (Greening, 2015).

- Ultrafiltración:

El método de ultrafiltración aísla los exosomas al aprovechar las características de tamaño del exosoma, ya que es posible utilizar membranas que contienen tamaños de corte específico que permiten el paso solo de aquellas sustancias que por debajo del diámetro de su poro. De esta manera, todas las células u otro tipo de material biológico y químico que supere las dimensiones del exosoma, no logran atravesar la membrana y así se logra hacer un filtrado solo de los exosomas (Zeringer, 2015).

- Precipitación de polímeros:

El método de precipitación de polímeros separa los exosomas mediante la precipitación de los mismos debido a la interacción entre el polietilenglicol (PEG) y los exosomas. Este método utiliza la solubilidad diferencial de distintos solventes (Cusabio, 2022).

- Inmunoensayo

Por último, en el inmunoensayo (también conocido como purificación por afinidad de anticuerpos), los exosomas primero se unen a partículas magnéticas cubiertas con anticuerpos de proteína marcadora de exosomas. Estos anticuerpos reconocen

específicamente los biomarcadores externos de los exosomas, como CD9 y CD63. (Zeringer, 2015).

Métodos de preparación de los exosomas:

- Fijación Química:

En la fijación química se utilizan reactivos capaces de crear enlaces de entrecruzamiento (comúnmente mencionados como *cross-linking*), en los cuales los exosomas crean una red, unidos por moléculas fijadoras como los aldehídos que se enlazan covalentemente a las proteínas de membrana embebidas en los exosomas, lo que hacen que perduren su estabilidad y evite su degradación cuando la muestra se retire del medio estabilizante (sustancia tampón o búfer). Es la técnica más utilizada para fijar muestras biológicas ya que es la más asequible y no requiere equipo especializado (Hughes, 2022).

- Criofijación:

En este tipo de fijación, lo que se busca es solidificar la muestra en un proceso llamado vitrificación, en el cual pasa de un estado líquido (exosomas suspendidos en el búfer) a un estado sólido, sin haber pasado por la fase del hielo. De esta manera, se evita que los exosomas tengan humedad al estar en las condiciones de temperatura ambiente como lo son las cámaras de observación en los microscopios (Chaffey, 2000).

Reactivos para la preparación química:

- Glutaraldehído (Proteína): Protege la ultraestructura por medio de *cross-linking*
- Paraformaldehído (Proteína): Mismo mecanismo del Glutaraldehído
- Tetróxido de osmio (Lípidos): Aumenta la conductividad de la muestra y minimiza las distorsiones de imagen resultantes de la carga del SEM.
- Etanol (Solvente). Deshidrata la muestra al reemplazar el agua
- HMDS (Hexamethyldisilazane) Baja tensión superficial, se utiliza para evitar la creación de distorsiones en las micrografías
- Recubridora con *pellet* de oro (*Sputter-coater* en inglés)

Técnicas de caracterización:

- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*). En esta técnica, se utiliza un haz de electrones que son conducidos por lentes magnéticos hasta la muestra a observar, debajo de la muestra se encuentra un detector que colecta los electrones que lograron atravesar la muestra, y a partir de ellos crea una imagen. Cuando esta misma técnica se realiza en una cámara a -80 °C, esta toma el nombre de Crio-TEM (Rafal, 2017).
- Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA, *Nanoparticle Track Analysis*). Consiste que hacer pasar un laser a través de la muestra, y este haz de luz al interactuar con el material, se difracta, un sensor detecta esta difracción y confirma la presencia de partículas nanométricas en la muestra (SB, 2022).

- Dispersión Dinámica de la Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*). Con esta técnica es posible obtener el tamaño de partículas que van desde 1 nm, hasta los 10 μm de diámetro, el resultado final es una curva con la distribución de tamaño de las partículas, estos datos se obtienen a partir de la interacción de un láser con el movimiento browniano de las partículas en el medio (Lyu, 2021).

1.4. Contexto

Este estudio se realiza en Jalisco, que es la entidad mexicana con más índice de esta enfermedad a nivel nacional, asimismo esta enfermedad suele ser detectada en sus etapas tardías, en la que ya se presenta un deterioro en la fisiología del riñón que no tiene retorno y que simplemente se da un tratamiento para postergar la necesidad de un trasplante (Secretaría de Salud, 2022) Este estudio se hizo en colaboración con el Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente (CIBO), que actualmente busca desarrollar el proteoma de las proteínas encontradas dentro de los exosomas del riñón obtenidos a partir de la orina, para lograr detectar esta enfermedad en las etapas tempranas de la enfermedad, en las cuales un estudio de orina o sangre no revela información determinante y una biopsia no es aplicable a estos pacientes ya que este procedimiento puede generar daños en el riñón que probablemente el paciente aún no desarrollaba, en caso de resultar que no esté desarrollando la ERC.

El esfuerzo realizado por el CIBO de obtener los exosomas por medio de centrifugación diferencial ha llegado a un punto en el que se requiere verificar la presencia de los exosomas en las muestras resultantes, sin embargo, al tratarse de vesículas de tamaño nanométrico, entra la necesidad de aplicar el conocimiento de las nanociencias y la nanotecnología para caracterizarlos, para así verificar la presencia de la muestra, así como obtener características morfológicas y estructurales que permitirán el avance en el proteoma de la ERC tan necesario para diagnosticar esta enfermedad de manera no invasiva, asequible y accesible.

Aunado a lo anterior, existe un gran interés en estudiar los exosomas por su gran importancia en la comunicación intracelular, así como su gran potencial como biomarcadores del progreso de la ERC. Sin embargo, las nanovesículas al estar en el rango de los 30-150 nm, no es posible caracterizarlos por medio de microscopía óptica y es que se tiene que recurrir a los métodos de caracterización de materiales nanométricos, como lo son las microscopías electrónicas (Wu, 2015). El estudio de los exosomas como biomarcadores de las proteínas que, al modificar sus propiedades, dan indicio de que el paciente de donde se obtienen está desarrollando la Enfermedad Renal Crónica ha sido objeto de atención debido al alto impacto que tiene el poder detectar a tiempo el desarrollo de la enfermedad para tratarla antes de que el paciente la desarrolle por completo (Karpman, 2017). Sin embargo, fue hasta el presente estudio que se logró observar la muestra extraída.

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

El protocolo teórico que se suele encontrar en la literatura es el siguiente, el cual comienza por la extracción de los exosomas por centrifugación diferencial.

Posteriormente pasa por un proceso de fijación y preparación. Dicha preparación depende del tipo de microscopía a utilizar para la observación. En el caso del SEM, se utiliza un recubrimiento metálico que permitirá la interacción de la muestra con los electrones, y en el caso del AFM, se hace uso de las energías superficiales de la muestra y del sustrato.

El mecanismo de la ultracentrifugación simula la fuerza gravitatoria al hacer girar un rotor para que la muestra, suspendida en un contenedor, gire en una circunferencia a altas revoluciones por minuto que aplican fuerzas de hasta 1'000,000 de veces más grandes que las de la gravedad terrestre. De esta manera, al utilizar la fuerza de centrifugación correcta, con la temperatura adecuada para el tipo de muestra y con el tiempo requerido, se pueden separar partículas según su masa. Como se observa en la imagen 5, se aprecian dentro del tubo distintas partículas con masas y densidades diferentes, representadas con colores variados. Se ve como en el primer paso, se retiraron las partículas amarillas, al rescatar el sobrenadante. Luego se retiraron las partículas azules por el mismo mecanismo. Finalmente, se recuperan las partículas rojas en la pastilla de precipitado al desechar el sobrenadante (Momen, 2013).

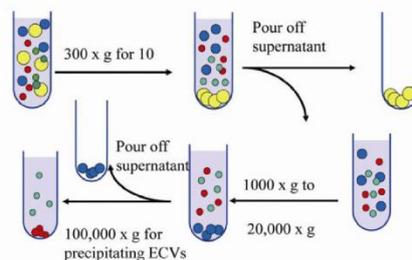


Imagen 5. Ultracentrifugación (Momen, 2013)

Por otro lado, el propósito de la fijación es preservar la estructura morfológica original de las células y tejidos. Los reactivos de fijación ayudan a evitar el rompimiento de las membranas bilipídicas que rodean tanto a las células como a los exosomas, asimismo tienen propiedades bactericidas y fungicidas que evitan el crecimiento de microorganismo en una muestra por observar. Además, interactúa con las moléculas que rodean la membrana lipídica de tal modo que mantienen la muestra fija para evitar su degradación y permitir su observación. La fijación química es el método de fijación más barato y el más utilizado, así como accesible, en el estudio de muestras biológicas por microscopía electrónica. Estos forman enlaces cruzados entre aminoácidos, proteínas y lípidos, por medio de enlaces covalentes (Abay, 2019). El reactivo más utilizado es el glutaraldehído, ya que este se enlaza a los a las proteínas de membrana que contienen grupos amino y sulfhidrilo, a las cuales tienen afinidad los aldehídos, como el glutaraldehído y el paraformaldehído. El resultado es un entrecruzamiento entre las proteínas membranales del exosoma (Hopwood, 1967).

Por otro lado, el SEM funciona al hacer pasar una corriente por un filamento que esparce un haz de electrones que son dirigidos por medio de lentes electromagnéticas hacia la muestra, para poder usar esta técnica, se necesita que la muestra sea conductora, ya que se necesita que la misma conduzca los electrones y también los disperse, para que estos logren ser capturados por un detector, que al calcular el ángulo desde donde provienen, es que se puede obtener una micrografía. Debido a que cada electrón que se obtiene llega al detector con una determinada energía, dada

por el elemento del material que lo dispersó, se puede realizar un análisis de composición por medio de Espectroscopía de rayos x Dispersivos de Energía (EDS, por sus siglas en inglés, *Energy Dispersive x-ray Spectroscopy*), lo cual también puede generar mapas para observar la presencia de cada elemento en la muestra (NSI, 2021).

Finalmente, el AFM funciona por medio de un láser que incide sobre una punta llamada cantiléver, la cual va tocando en un recorrido horizontal la muestra y al haber cambios en la topografía, la punta se ajusta a este cambio en movimiento vertical, lo que provoca un desvío de la luz reflejada que es detectada por un fotodetector. A partir de estos cambios vistos por el detector, se forman micrografías basadas en la topografía. Existen principalmente dos modos de operación, el modo contacto y el modo no contacto, también llamado modo *Tapping*. En el modo contacto la muestra toca de manera constante la muestra, mientras que en el modo *Tapping* el cantiléver oscila de arriba abajo mientras conduce sobre la muestra (Sharma, 2018).

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

- Descripción del proyecto

Se propone el estudio de micrografías de las muestras de exosomas para la comprobación de la correcta extracción de los mismos, para realizar con certeza los pasos consecuentes del estudio proteómico que permitirán identificar en qué estadio de la ERC se encuentra el paciente, especialmente en las etapas tempranas que son las más silenciosas y más difíciles de detectar a tiempo. Estas micrografías se realizarán por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscopy*) y por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscope*). Puesto que se cuentan con materiales diferentes a los encontrados en la bibliografía, se hizo una adaptación del protocolo, al utilizar como fijador solamente al glutraldehído y al metalizar (recubrir) la muestra con plata, en lugar el oro o paladio que se suele utilizar (Gothenberg, 2022).

- Plan de trabajo

- Recursos necesarios:

Para la extracción de los exosomas:

- Centrifugadora de tubos cónicos de 15 mL
- Centrifugadora de tubos de fondo curvo
- Centrifugadora de Microtubos
- Ultracentrifugadora
- Vórtex
- Baño celulógico
- Coctel Inhibidor de Proteasas
- Beta-mercaptoetanol
- Búfer Salino de Fosfatos
- RNAsa
- Baño de hielo
- Vaso clínico
- Muestra de orina

Para la fijación de las muestras:

- Glutaraldehído
- Agua miliQ
- Etanol

Para las muestras medidas por SEM:

- Microscopio Electrónico de Barrido
- Sputtering con *target* (pastilla u objetivo) de plata
- Oblea de silicio

Para las muestras medidas por AFM:

- Microscopio de Fuerza Atómica
- Portamuestras Disco de resina para AFM
- Poli-L-Lisina
- Mica
- Cinta para mica
- Cinta adhesiva
- Agua destilada

○ Métodos:

A continuación, se presentan los protocolos de extracción, preparación y caracterización estructural y morfológica de muestras biológicas blandas (exosomas de riñón) por microscopia electrónica de barrido y microscopia de fuerza atómica.

• Extracción de los exosomas:

Primeramente, se tomó la primera orina de la mañana en un vaso clínico. En cada centrifugación se debe mantener el equilibrio entre las masas, por lo que todos los tubos deben pesar lo mismo. En el caso de la ultracentrifugadora, se deben utilizar los cuatro tubos que tiene disponibles, para mantener el balance a tan altas revoluciones. Se vaciaron 15 mL en un tubo cónico de la misma capacidad y se centrifugó a 12,000 rpm por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo cónico, nuevamente de 15mL. Se añadió 1 μ L de coctel inhibidor de proteasas por cada 1 mL de sobrenadante recuperado, para evitar la degradación de las proteínas que dan estabilidad a los exosomas. Se vació la muestra en un tubo especial para la utilizada. Se centrifugó la muestra por 16 minutos a 12,339 rpm o 17,000 x g. Se rescató el sobrenadante (con el rótulo SN1) en un tubo cónico de 15 mL y se puso a congelación en un baño de hielo. En una campana de flujo laminar, se depositaron 200 μ L de β -mercaptoetanol a la pastilla y se resuspendió la misma en el líquido añadido, al intentar recuperar también la muestra de las paredes del tubo de centrifugación, dicha solución se recuperó en un tubo eppendorf. En dicho paso, se rompen los enlaces sulfúricos que mantienen atrapados a los exosomas en una red de proteínas, para obtener una muestra de exosomas sin moléculas adicionales.

Posteriormente, se sometió el microtubo en un baño celular a 36°C. Cada dos minutos se sacaba el tubo eppendorf para vortexear a potencia 87% por 20 segundos. Este paso se repitió cinco veces. Se centrifugó este microtubo por 20 minutos a 17,000 x g rpm a 4°C, y se recuperó el sobrenadante (con el rótulo SNa) Se depositaron 3 mL del SN1 y se añadieron 2 mL del SNa en un tubo especial para

ultracentrifugadora. Se ultracentrifugó a 100, 000 x g a 4°C por 2h. Se recuperó la pastilla. Se agregaron 1 µL de RNAsa a la pastilla precipitada y se dejó actuar por 15 minutos para eliminar los ácidos nucleicos. Se resuspendió la pastilla anterior en 3-4 mL de PBS a una concentración de 1X. Se ultracentrifugó la muestra anterior a 200, 000 x g por 1h a 4°C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se añadió la cantidad suficiente de Búfer Salino de Fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate Buffer Saline*) para resuspender la pastilla. En el anexo se muestran fotografías que ilustran ciertos pasos mencionados con antelación.

- 1.- Se tomó la primera orina de la mañana
- 2.- Se tomaron 15 mL y se centrifugó a 12,000 rpm por 20 minutos. Se rescató el sobrenadante
- 3.- Se añadió 1µL de CIP por cada mL de sobrenadante recuperado
- 4.- Se centrifugó la muestra por 16 minutos a 12,339 rpm o 17,000 x g.
- 5.- Se rescató el sobrenadante y se puso a congelación (SNO). Se depositaron 200 µL de β-mercaptoetanol a la pastilla
- 6.- se sometió el microtubo en un baño celulógico a 36°C. Cada dos minutos se sacaba el microtubo para vortexear
- 7.- Se centrifugó por 20 minutos a 17,000 x g rpm a 4°C (SNa). Se depositaron 3 mL del SNO y se añadieron 2 mL del SNa
- 8.- Se ultracentrifugó a 100, 000 x g a 4°C por 2h. Se recuperó la pastilla.
- 9.- Se agregaron 1 µL de RNAsa por cada 25 µL de pastilla suspendida y se dejó actuar por 15 min.
- 10.- Se resuspendió la pastilla anterior en 3-4 mL de PBS al 1X
- 11.- Se ultracentrifugó la muestra anterior a 200, 000 x g por 1h a 4°C.
12. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se añadió la cantidad suficiente de PBS para resuspender la pastilla

Protocolo 1. Extracción de los exosomas

- Datos biológicos de los pacientes de las muestras observadas en este estudio:

En la Tabla 1 se presentan los datos del primer paciente, etiquetado como 378, se destaca un nivel regulado del ácido úrico, asimismo, se encuentra que es un paciente potencial para desarrollar la ERC por padecer *Diabetes Mellitus* tipo 2. Entre paréntesis se muestran los niveles normales de cada parámetro para hombre y mujer, así como su respectiva edad.

Tabla 1. Paciente 1 (No. 378)

Parámetros	Medidas
Sexo	Masculino
Diagnóstico	Hipertensión Arterial y <i>Diabetes Mellitus</i> 2
Edad	69 años
Presión Arterial.	120/80 mmHg
Ácido Úrico	2.98 mg/dL (3.4 – 7 mg/dL)
Colesterol	166 mg/dL (Menor a 200 mg/dL)
HDL (Colesterol bueno)	33 mg/dL (40-60 mg/dL)
LDL (Colesterol malo)	83 mg/dL (50-130 mg/dL)
Triglicéridos	248 mg/dL (Menor a 150 mg/dL)
Gratinina	0.57 mg/dL (0.7 – 1.4 mg/dL)
Tasa de Filtración Glomerular	105 mL/min/1.73 m ² (90-120)
Estadío ERC	Insuficiencia Renal

Índice de Masa Corporal	29.7 kg/m ²
-------------------------	------------------------

Asimismo, se obtuvieron los datos del segundo paciente, con el folio 489, del cual se destaca un ácido úrico de poco más del doble que el paciente anterior, así como una edad ligeramente más avanzada. Además, se muestra que esta persona aún no desarrolla la ERC.

Tabla 2. Datos biológicos del paciente 2 (No. 489)

Parámetros	Medidas
Sexo	Femenino
Diagnóstico	Hipertensión Arterial y <i>Diabetes Mellitus 2</i>
Edad	75 años
Glucosa	80 mg/dL (70-110)
Ácido Úrico	6.13 mg/dL (2.4 – 6 mg/dL)
Colesterol	166 mg/dL (Menor a 200)
HDL (Colesterol bueno)	59 mg/dL (40-60 mg/dL)
LDL (Colesterol malo)	73 (<100)
Triglicéridos.	168 mg/dL (Menor a 150 mg/dL)
Creatinina	0.8 mg/dL (0.7 – 1.4 mg/dL)
Tasa de Filtración Glomerular	72 mL/min/1.73 m ² (75)
Estadío ERC	0

- Preparación para SEM:

Se tomaron 25 µL de la muestra de Exosomas del paciente y se colocaron en un microtubo. Posteriormente, se fijaron con 3 µL de glutaraldehído (GA) y se dejó actuando por 15 minutos. Se trasladaron 9 µL de la muestra fijada a otro microtubo, en donde se diluyó la muestra con 27 µL de agua miliQ. Lo mismo se realizó en otro microtubo, al diluir 9 µL de exosomas fijados con 27 µL de etanol. Se depositaron 10 µL de cada muestra en sustratos de silicio que se habían limpiado con acetona, etanol e isopropanol en un baño ultrasónico al 37 kHz al 80%, con 5 minutos en cada solvente. Finalmente se introdujeron las muestras al *Sputtering* para recubrir la muestra con 5 nm de plata. Al utilizar una tasa de deposición de 5 nm/min. El proceso se realizó para los exosomas de ambos pacientes (rotulados como 378 y 489). En el Protocolo 2 se puede ver enlistado dichos pasos.

- 1.- Se tomaron 25 μL de la muestra de exosomas y se depositaron en un tubo eppendorf
- 2.- En el tubo eppendorf se depositaron 3 μL de Glutaraldehído
- 3.- Se dejó la muestra fijando por 15 minutos
- 4.- Se trasladaron 9 μL de la muestra fijada a otro tubo eppendorf y se diluyeron en 27 μL de agua miliQ
- 5.- Se trasladaron 9 μL de la muestra fijada a otro tubo eppendorf y se diluyeron en 27 μL de etanol
- 6.- Se depositaron 10 μL en sustratos de silicio de cada preparación
- 7.- Todos los sustratos fueron recubiertos con 5 nm de plata por pulverización catódica

Protocolo 2. Preparación de muestras para su observación en el SEM

Se obtuvieron primeramente un total de seis muestras que fueron recubiertas con plata, las cuales se observan en la Figura 1. En el Anexo se da una breve explicación del proceso de recubrimiento.

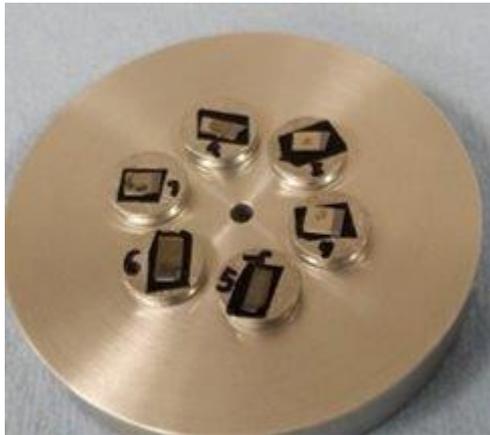


Figura 1. Muestras recubiertas con plata

Preparación para el AFM:

Para los exosomas del paciente 1 (etiquetado como 378), se fijaron previamente se fijaron 32.3 μL de exosomas con 1 μL de GA y se diluyeron en 96 μL de agua miliQ. Se clivó con cinta adhesiva un disco fijado a una mica. Se depositaron 15 μL de agua para corroborar que la superficie estuviera funcionalizada. Una vez verificado, se depositaron 20 μL de Poli-L-Lisina y se dejó por 5 min. Se enjugó el disco delicadamente con agua destilada y se secó con nitrógeno. Se depositaron 20 μL de la muestra de Exosomas 378 fijados con GA y diluidos con agua miliQ. Se incubó por 5 min., se enjugó delicadamente con agua destilada y se secó con nitrógeno. Para los exosomas del segundo paciente (etiquetado como 489), se realice el mismo procedimiento, y además se realice un sonicado de 20 segundos a 36 kHz a 50%. En el Protocolo 3 se enlistaron estos pasos. En la Imagen 6, se observa una ilustración de la muestra montada sobre el PLL y a su vez sobre un sustrato, que en este trabajo se utilizó un disco con resina. En el cual, al hacer clivados, se retiran capas superficiales, lo cual aumenta la energía superficial del sustrato y se logra funcionalizar con cargas positivas que provee el PLL (Imagen 7), lo cual permite al

exosoma quedar fijo en el sustrato por medio de fuerzas de Coulomb, en el que cargas de signo opuesto se atraen, ya que los exosomas, como se menciono anteriormente, tienen una carga negativa dada por los grupos fosfatos de su membrana (Mi *et al*, 2021). En el Anexo se ilustra tanto la PLL utilizada, como los discos de resina.

Previamente se fijaron 32.3 μL de exosomas con 1 μL de GA y se diluyeron en 96 μL de agua miliQ

1.- Se clivó con cinta adhesiva un disco fijado a una mica

2.- Se depositaron 15 μL de agua para corroborar que la superficie estuviera funcionalizada

3.- Una vez verificado, se depositaron 20 μL de Poli-L-Lisina y se dejó por 5 min.

4.- Se enjugó el disco delicadamente con agua destilada y se secó con nitrógeno

5.- Se depositaron 20 μL de la muestra de Exosomas fijados con GA y diluidos con agua miliQ

6.- Se incubó por 5 min., se enjugó delicadamente con agua destilada y se secó con nitrógeno

Protocolo 3. Preparación de muestras para el AFM

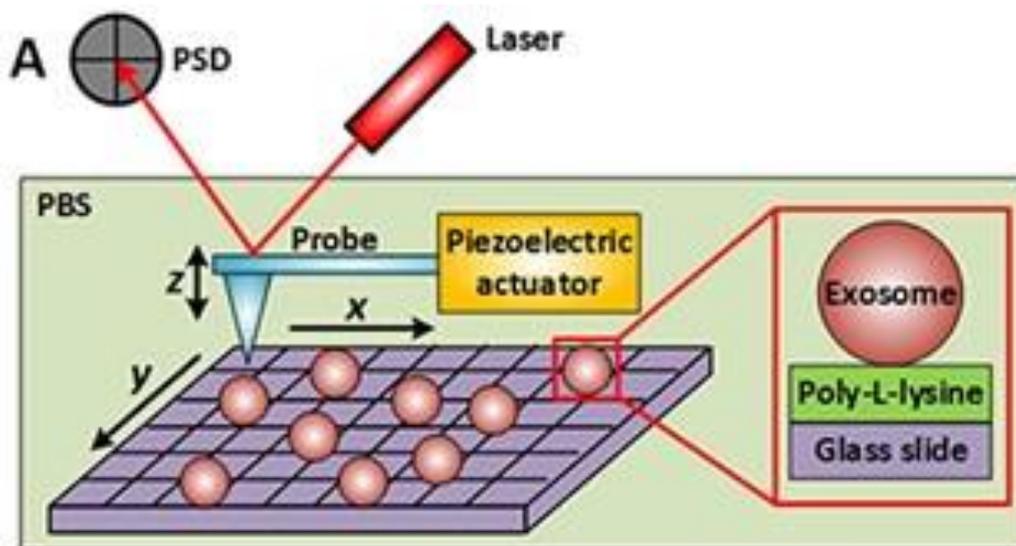


Imagen 6. Esquema de preparación de muestra para AFM (Mi *et al*, 2021)

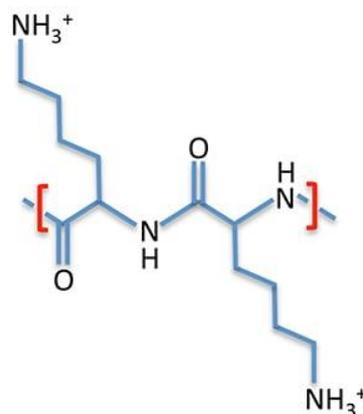


Imagen 7. Estructura química de la Poli-L-Lisina

3. Resultados del trabajo profesional

En primer lugar, se hicieron observaciones de la muestra de exosomas 378 a 8,500 magnificaciones, se puede observar la presencia de diversas esferas pequeñas que recubren en su totalidad al sustrato (Figura 2a), para analizar y medir el diámetro de dichas esferas, se procedió a aumentar la magnificación a 65,000, como se muestra en la Figura 2b.

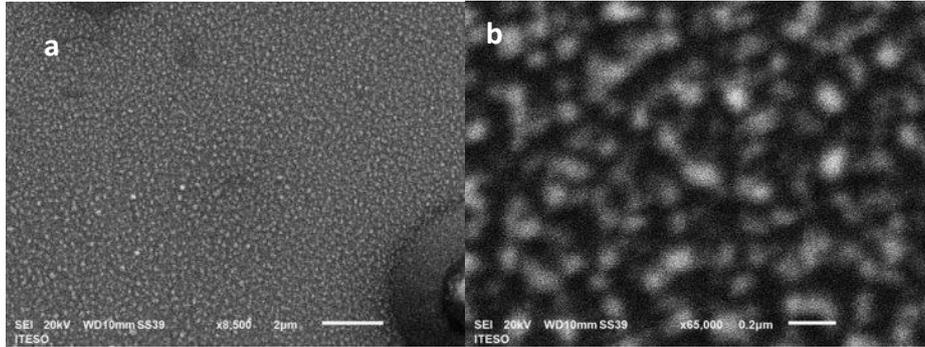


Figura 2. Micrografía SEM de exosomas 378 a una magnificación de a) x8,500 y b) x65,000

Posteriormente, se procedió a analizar la muestra de exosomas 378 realizando una dilución en agua miliQ. Se puede observar cómo esta muestra permite la visualización individual de los exosomas, puesto que, al realizar la dilución, se permitió verlos más dispersados (Figura 3a). Asimismo, en esta muestra se hizo un aumento de 50,000 magnificaciones para poder realizar mediciones individuales del diámetro (Figura 3b). Lo mismo se realizó a 75,000 magnificaciones (Figura 4). La muestra 6 se observó después de una semana, por lo que se puede ver la muestra incluso de manera más clara, ya que durante este periodo de tiempo la muestra se deshidrató de manera paulatina en condiciones de vacío a temperatura ambiente.

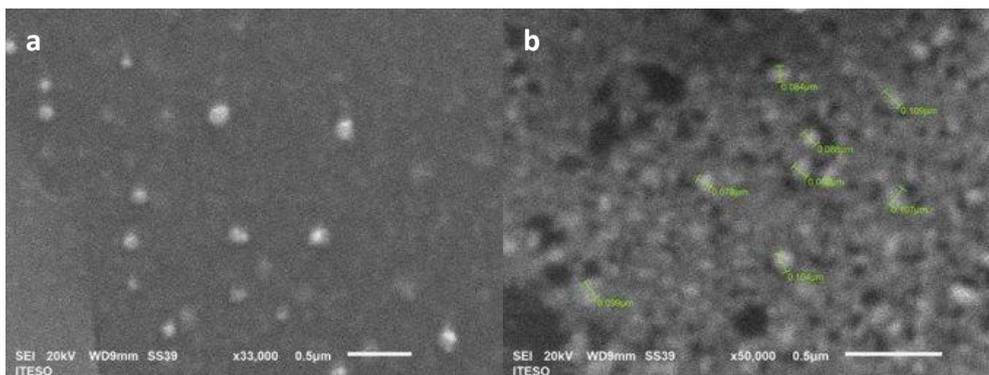


Figura 3. a) Magnificaciones x33,000 b) x50,000 magnificaciones

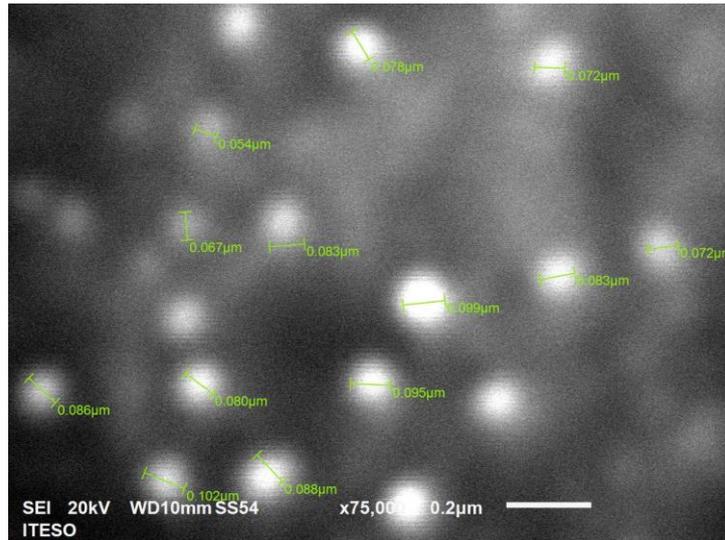


Figura 4. Exosomas a x75,000

Algo desconcertante fue que, en esta muestra, al realizar el EDS, no se observó la presencia del carbono, sin embargo, tampoco se observó el silicio, probablemente debido a que en esta zona el recubrimiento de plata acumuló un mayor espesor ya que al aplicar la gota de muestra sobre el sustrato en el paso 6 del protocolo 2, esta se dispersa de manera irregular sobre el sustrato, por lo que al realizar el recubrimiento del paso 7 del Protocolo 2, se tienen mayor concentración de plata en ciertas zonas, lo cual explica por qué tampoco aparece el silicio, que es el material del que está hecho el sustrato (Figura 5).

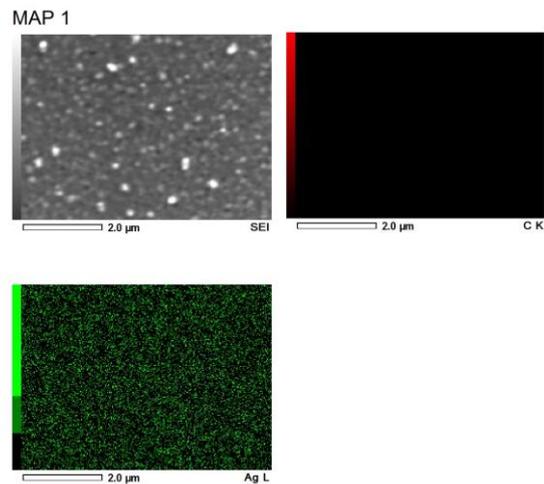


Figura 5. EDS de exosomas 378

Posteriormente, se hicieron mediciones sobre la muestra de exosomas 378 que además de estar fijados, fueron diluidos en etanol. Se puede observar en la Figura 6, cómo la morfología de los exosomas se muestra un poco distorsionada, esto puede ser debido a que el etanol ocasionó daños a la ultraestructura del exosoma, ya que como se menciona en la bibliografía y en los antecedentes, es necesario el uso de HMDS para reducir la tensión superficial que le ocasiona el etanol, el cual es utilizado para deshidratar la muestra. Sobre esta misma zona de la muestra, se procedió a

realizar un EDS para saber la composición de las estructuras más grandes que se aprecian en la micrografía (Figura 7). Se encontró que se trataba de Cloro y Sodio cristalizado, es decir cloruro de sodio, el cual proviene del PBS en donde estaba suspendida la muestra. Asimismo, se observa la presencia del carbono sobre todo el sustrato, lo cual apunta a la presencia de los exosomas, ya que, como se observa en las Figuras de la introducción, los exosomas están conformados por glicerol, ácidos grasos, proteínas, y otras moléculas conformadas a base del carbono.

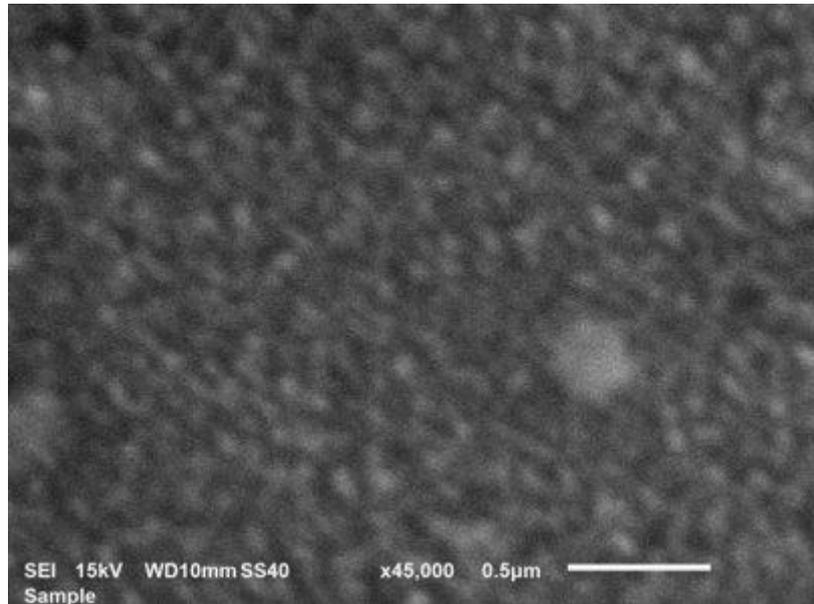


Figura 6. Exosomas diluidos en etanol

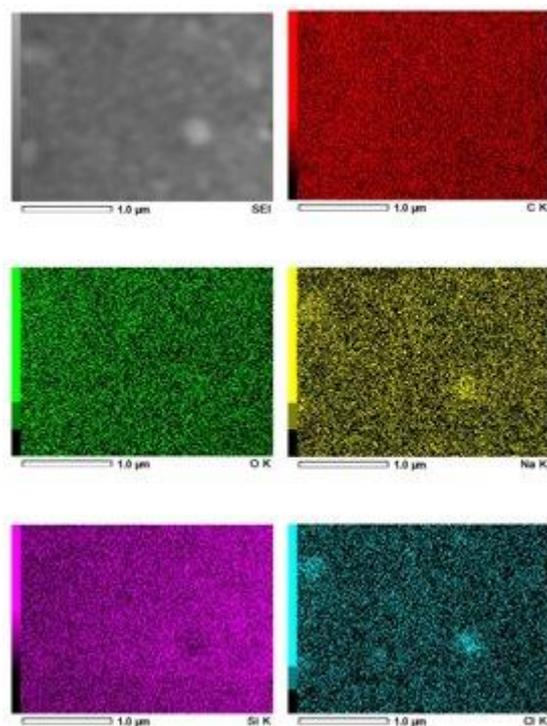
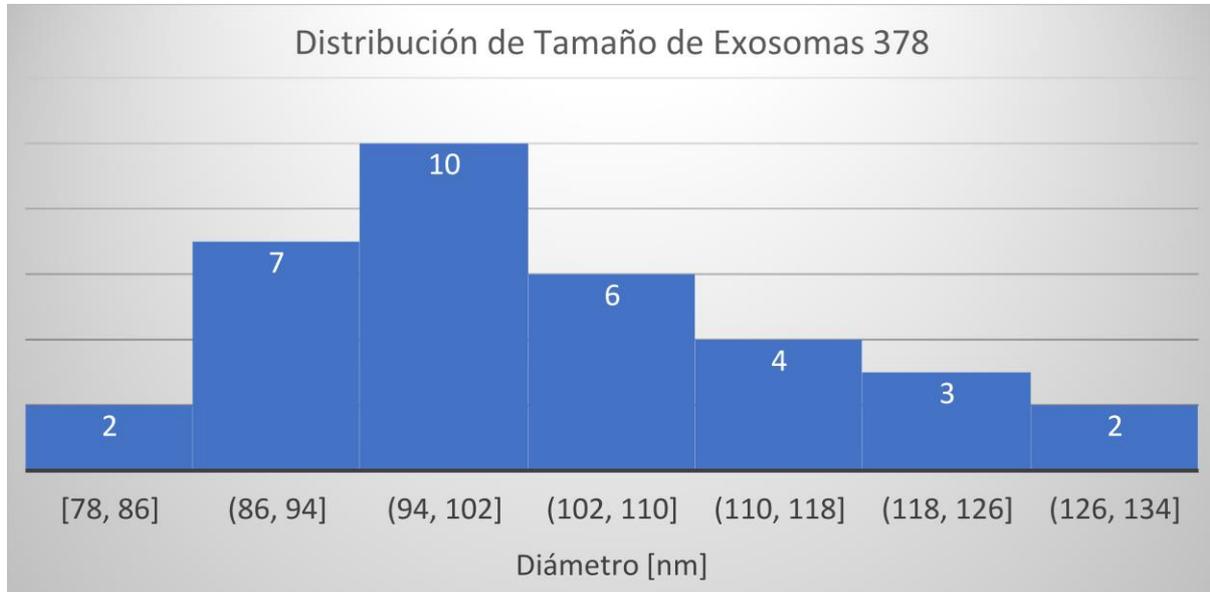


Figura 7. EDS de exosomas

Una vez analizados todos los diámetros obtenidos de los exosomas por microscopía SEM, se procedió a realizar un histograma con la distribución de tamaño obtenido. En el Histograma 1, se observa cómo la mayoría de los exosomas presentan un diámetro que oscila entre los 94 y los 102 nm, es decir 98 ± 4 nm. Lo cual están dentro de los rangos reportados en la bibliografía (Alzhrani *et al*, 2021).



Histograma 1. Distribución de Diámetros de Exosomas 378 por SEM

Posteriormente, se procedió a observar las muestras de los exosomas 489 fijados y sin diluir. En la Figura 8a, se observa una micrografía a 40,000 magnificaciones, en donde se alcanza a ver las morfologías esféricas, en esta ocasión se comienza a notar inmediatamente que esta muestra contiene exosomas de menor tamaño. Al reducir las magnificaciones (Figura 8b), se puede observar cómo la muestra comienza a agrietarse, debido a que el recubrimiento metálico necesita aumentar su espesor, ya que en la literatura se suelen encontrar recubrimientos de oro o paladio de 10 nm (Gothenburg, 2021).

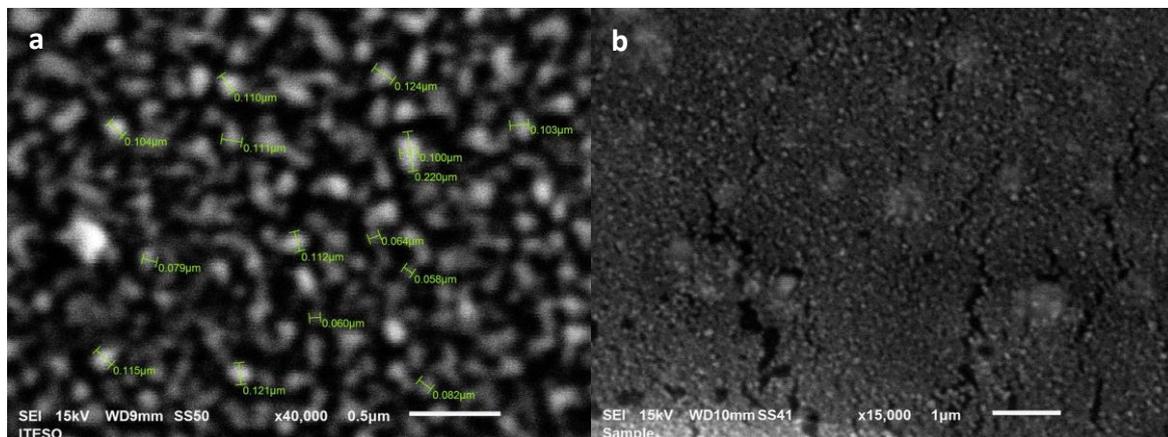


Figura 8. a) Exosomas 489 a x40,000 (Izquierda) b) Exosomas a x15,000 (Derecha)

Después, se observaron la muestra de exosomas 489 fijados, pero esta vez diluidos en agua miliQ, como se observa en la Figura 9. Nuevamente se aprecian las esperadas morfologías esféricas, al realizar 19,000 magnificaciones, se vuelve a observar una muestra mejor dispersada, al igual que con los exosomas 378, de los cuales se pudieron obtener más fácilmente los diámetros de dichas muestras.

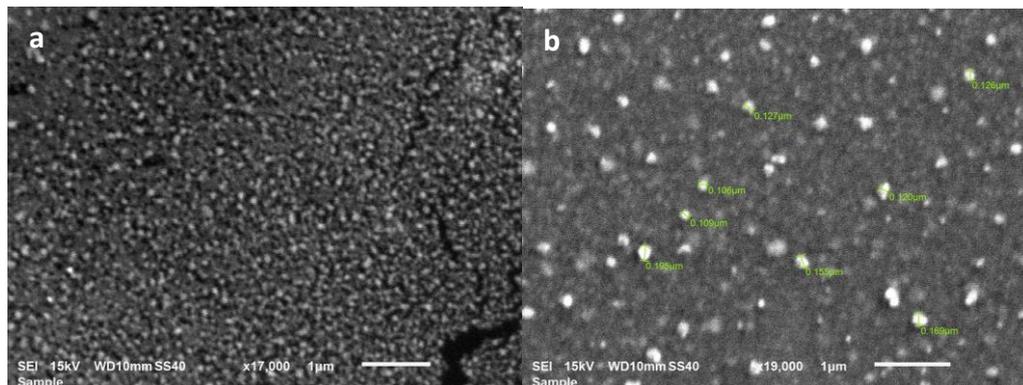


Figura 9. a) Exosomas a x17,000 (Izquierda) b) Exosomas a x19,000 (Derecha)

Luego, se hicieron mediciones en la muestra de exosomas 489 fijados y diluidos en etanol. Al igual que las muestra de exosomas 378, se observa que la muestra nuevamente se nota con una ultraestructura dañada que no permite ver tan claramente la morfología como en las preparaciones sin etanol (Figura 10).

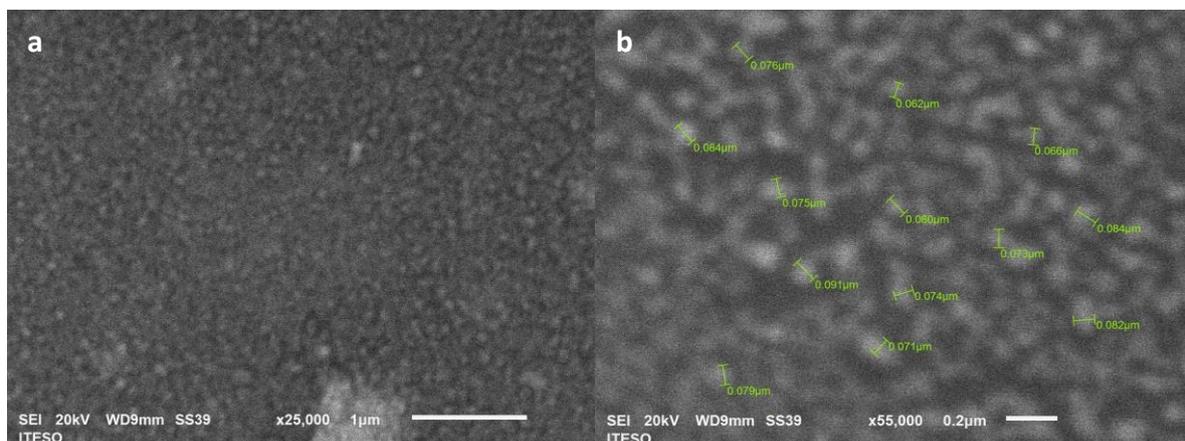
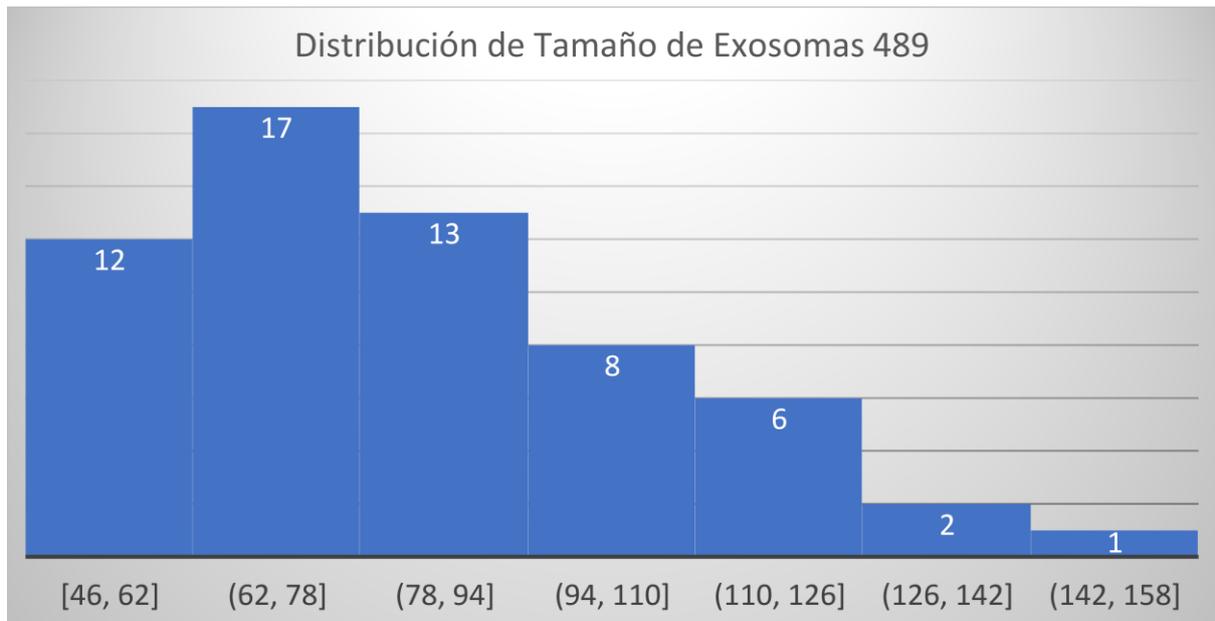


Figura 10. a) Exosomas diluidos en etanol (Izquierda) b) Mediciones sobre las micrografías (Derecha)

Una vez observados y medidos los diámetros sobre las micrografías, se procedió a graficar un histograma para obtener la distribución de tamaño de los exosomas 489. Como se observa en el Histograma 2, se observa que la mayoría de los exosomas 489 presenta un tamaño que oscila entre los 62 y 78 nm, es decir 70 ± 8 nm, que están ligeramente menores, pero dentro de los rangos reportados en la literatura (Maisano, 2022).



Histograma 2. Distribución de Diámetros de Exosomas 489 por SEM

Ya que se analizaron las micrografías de SEM, se procedió a realizar micrografías y el análisis de las micrografías de AFM para complementar este estudio, pues de esta manera se obtiene información topográfica de la muestra. Las muestras se prepararon de acuerdo con el Protocolo 2.

En primer lugar, se hicieron observaciones de la muestra 378 de exosomas, de las cuales se obtuvieron un total de cuatro micrografías, las cuales se muestran a continuación. Primeramente, se observa en la Figura 11a, un área de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, en la que se observan las morfologías esféricas esperadas de los exosomas, en la Figura 11b se muestra una versión tridimensional de esta imagen.

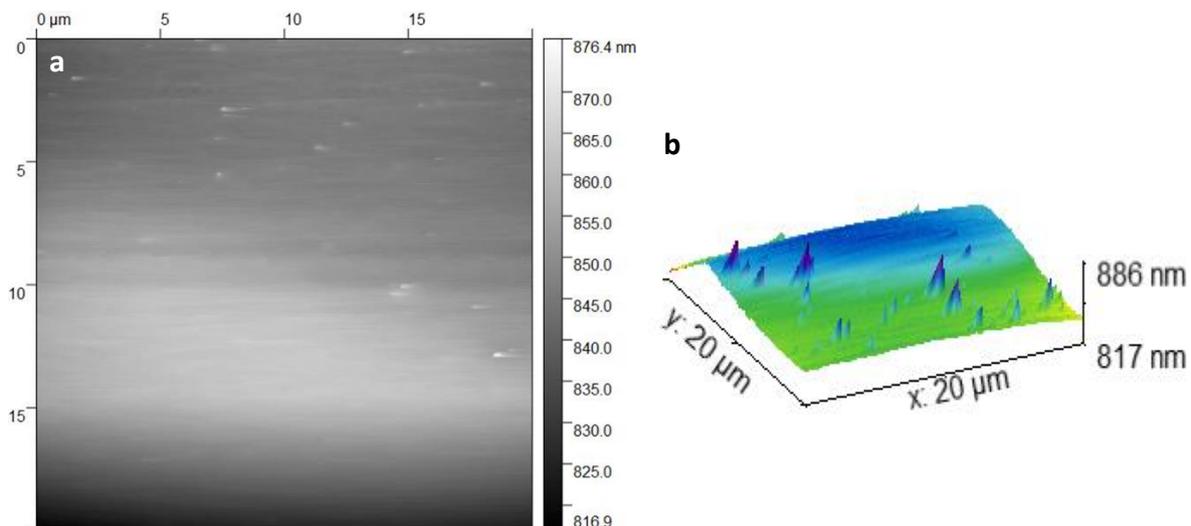


Figura 11. Topografía en AFM $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ a) En el plano x-y (izquierda) b) En tres dimensiones (derecha)

En la Figura 12a, se muestra otra área de también $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, en donde se siguen observando las morfologías esféricas. En la Figura 12a, se aprecia la topografía de esta micrografía en tres dimensiones.

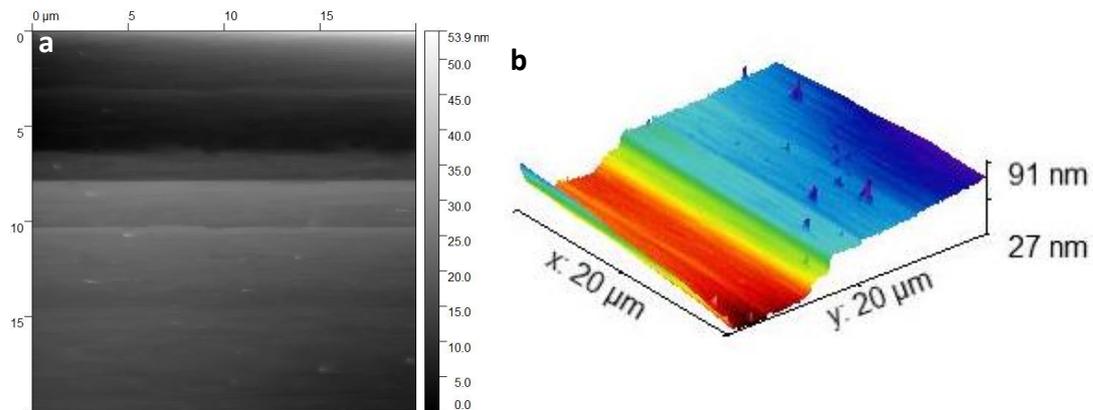


Figura 12. Topografía en AFM $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ a) En el plano x-y b) En tres dimensiones

En la Figura 13, se observa otra área de $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, en donde se observan más exosomas en una superficie más uniforme que las anteriores.

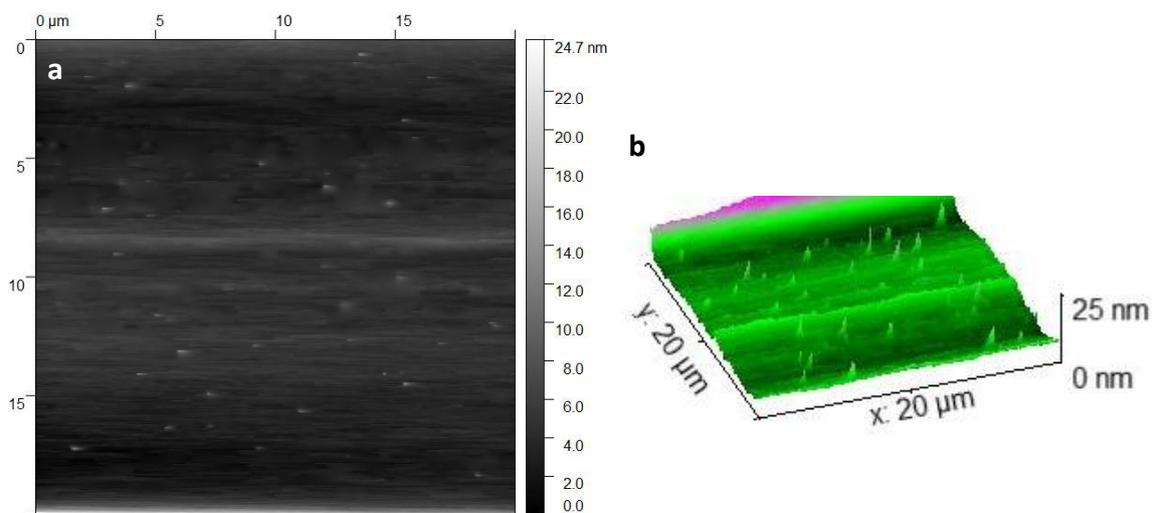


Figura 13. Topografía en AFM $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ a) En el plano x-y b) En tres dimensiones

Por último, se obtuvo una micrografía en un área de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, en la que se nota una mayor dispersión entre los exosomas y por lo tanto una menor cantidad de los mismos, sin embargo, se pueden observar las morfologías esféricas de manera más fácil y por lo tanto, realizar mediciones de perfilometría (Figura 14). En el Anexo 13-18 se da una explicación más detallada del proceso de perfilometría.

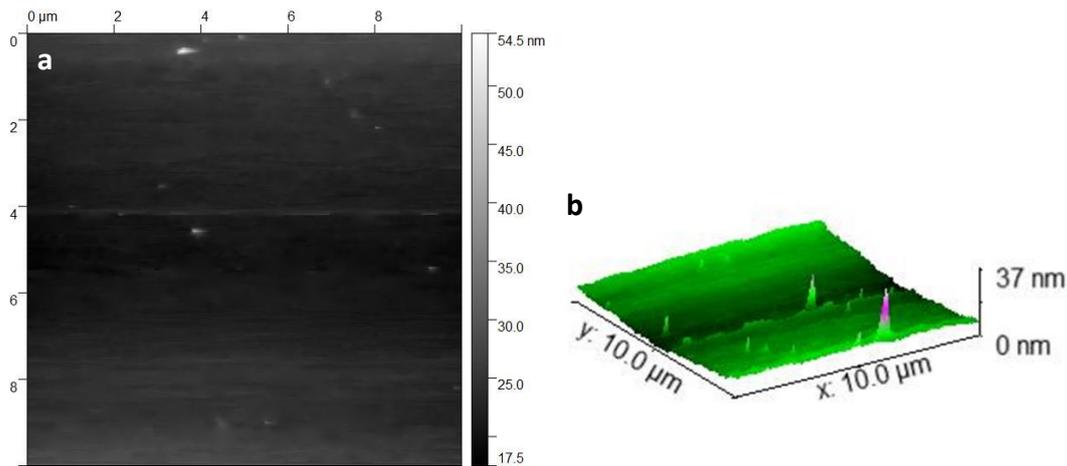
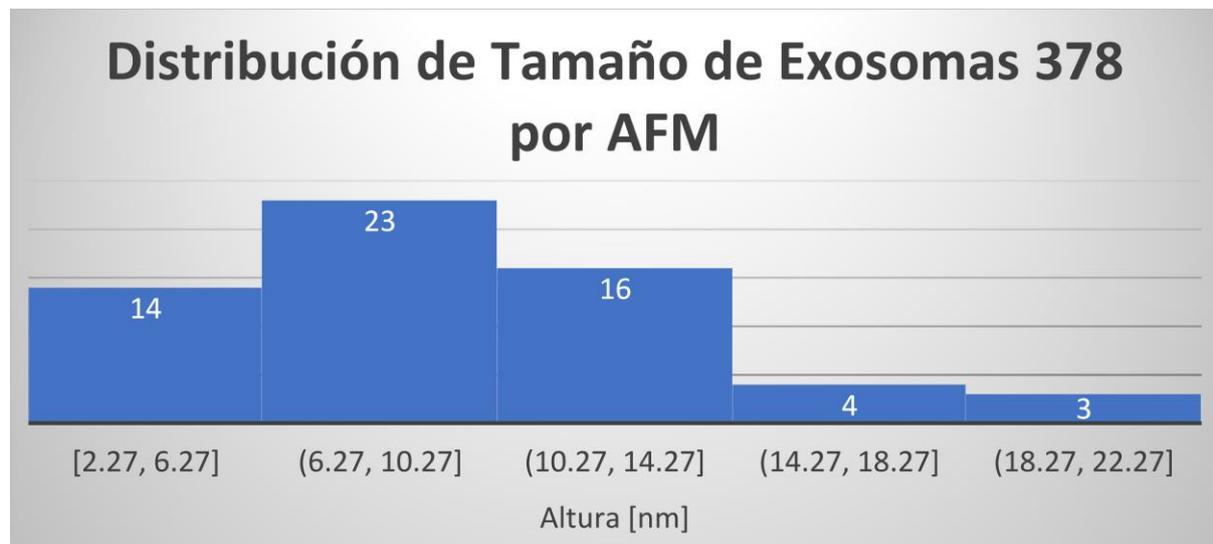


Figura 14. Topografía en AFM 10 µm x 10 µm a) En el plano x-y b) En tres dimensiones

Una vez obtenidos y medidos los perfiles de las cuatro micrografías observadas, se procedió a graficar los tamaños de altura que se muestran en el Histograma 3.



Histograma 3. Altura de Exosomas 378

Sin embargo, se nota una reducción sustancial del tamaño con respecto de las mediciones tomadas por microscopía electrónica, de 6.27 a 10.27 nm, que difiere de los 94 – 102 nm del SEM. De lo anterior se tienen tres hipótesis, de las cuales puede incluso ser resultado de una combinación de las mismas. Primeramente, se sabe que, con el equipo utilizado, recién se comenzaron a realizar pruebas en modo *Tapping*, y que se han hecho mediciones de calibración en la que la medición da un tamaño de hasta 10 veces menor que el tamaño real de la muestra. En segundo lugar, al haber una adherencia de los exosomas con carga negativa a la superficie cargada positivamente, los exosomas hayan sufrido una deformación que haya provocado una reducción en su altura, como se ilustra en la Figura 15a. En tercer lugar, puede ser que simplemente la muestra se haya desintegrado durante la preparación y solo se estén observando trazas, sin embargo, esta última es la menos probable pues en las micrografías se alcanzó a observar morfologías esféricas.

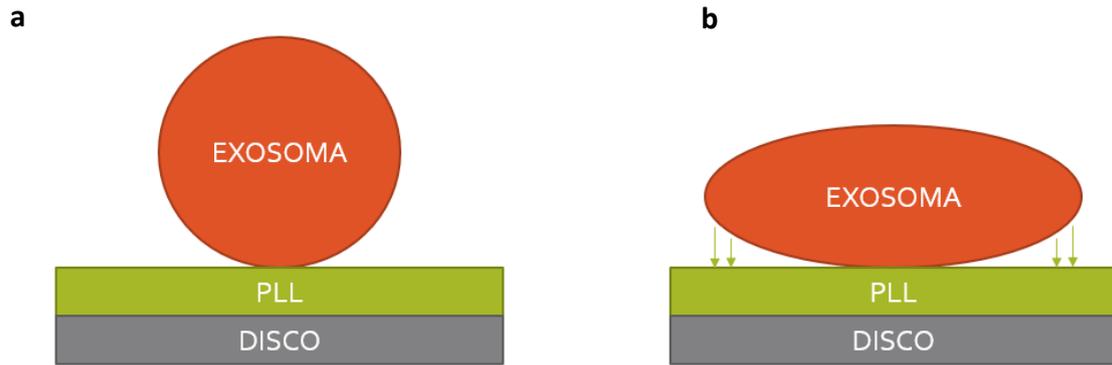
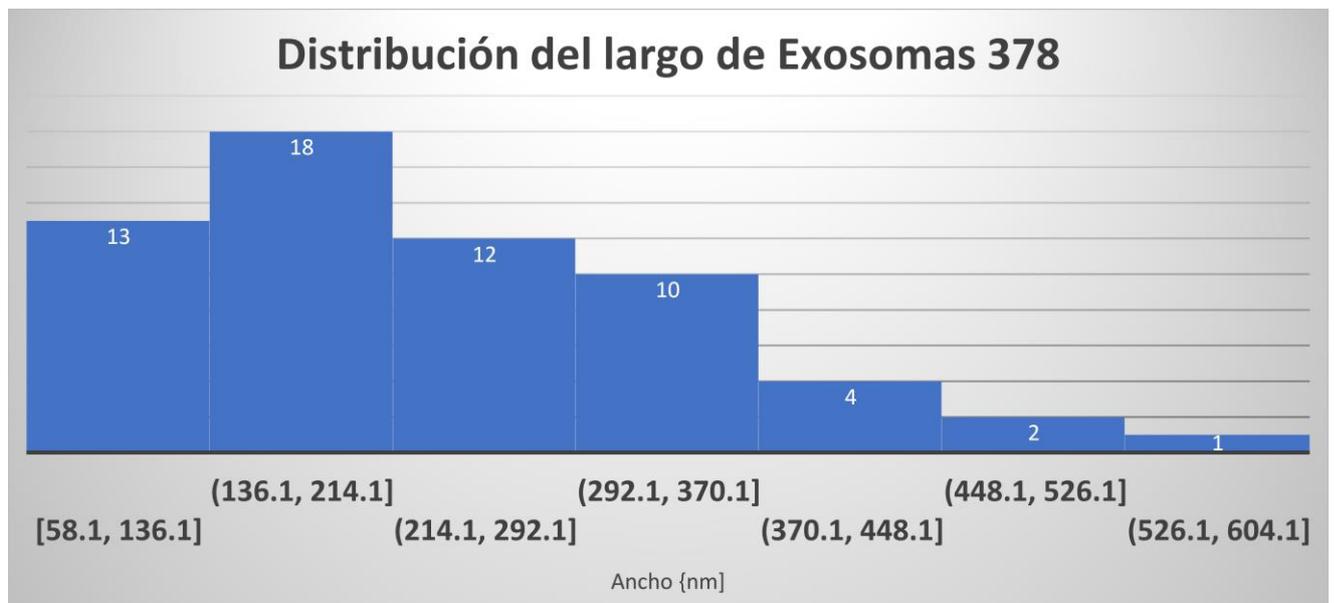


Figura 15. a) Exosoma normal b) Reducción en la altura de los exosomas

Debido a esto, se procedió a realizar mediciones del largo de los exosomas, para ver si daban resultados más coherentes, y efectivamente se obtuvieron tamaños más cercanos a los esperados. Los resultados se muestran en el Histograma 4. Se puede observar como la mayoría presentan un largo de entre 136.1 a 214.1 nm, lo cual indica que la segunda hipótesis puede ser correcta.



Histograma 4. Ancho de los exosomas del primer paciente por AFM

Para la muestra del segundo paciente (No. 489), se realizó el Protocolo 3, solamente se agregó un paso extra, que fue introducir el microtubo con la muestra en un baño ultrasónico por 20 segundos a 36 kHz al 50%. En la Figura 16 se aprecia que para esta observación se encontraron muy pocos exosomas, lo cual puede ser debido al cambio en la energía superficial de los exosomas debido a la presencia de un ácido urinario de poco más del doble que los del primer paciente, lo que pudo haber impedido que las fuerzas electrostáticas entre las cargas positivas del PLL y las negativas de los fosfolípidos no pudieran atraerse adecuadamente, y por lo tanto no se obtuvo una retención efectiva de los exosomas sobre la resina del disco.

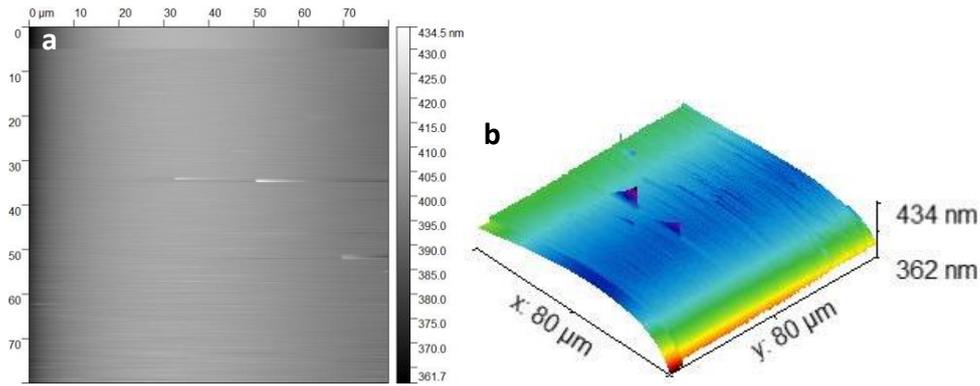


Figura 16. Topografía en AFM 80 μm x 80 μm a) En el plano x-y b) En tres dimensiones

En la figura 17, puede observarse el mismo fenómeno que se visualizó anteriormente, de lo cual se tiene la hipótesis de que además de que el ácido úrico cambió las propiedades superficiales, existe la posibilidad de que hayan sido afectadas por el ultrasonido, ya que es lo que se utiliza en la literatura para romper la membrana y poder obtener los biomarcadores dentro del exosoma.

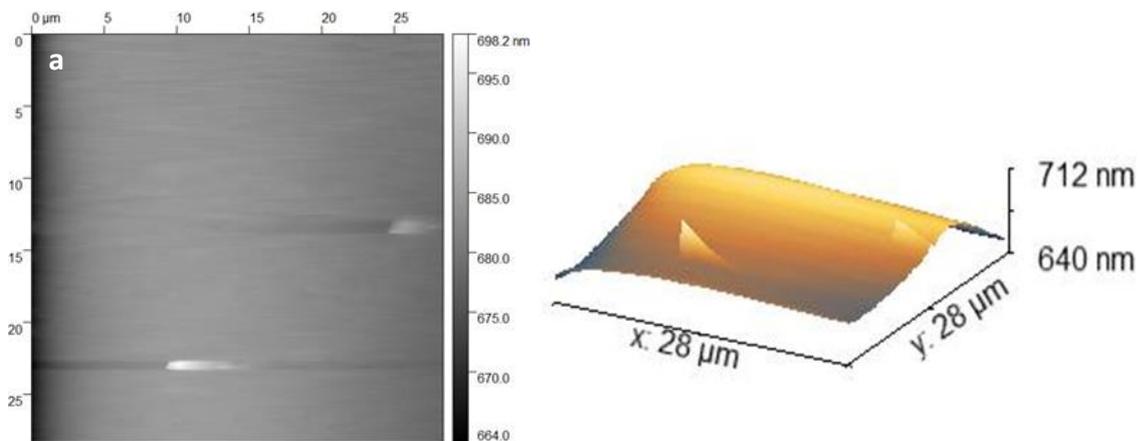
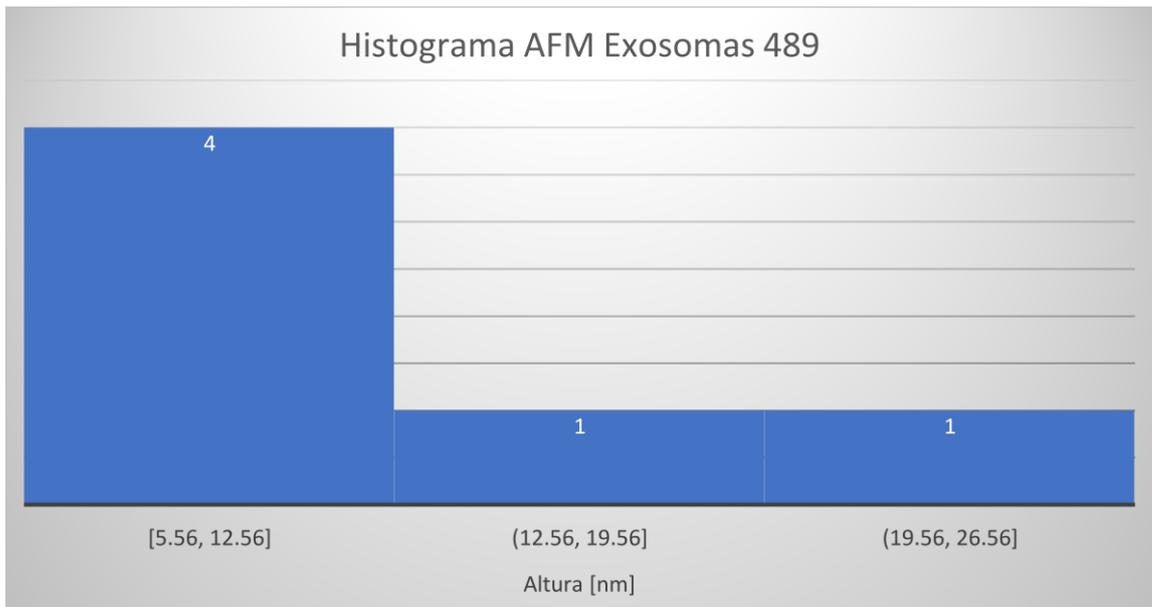


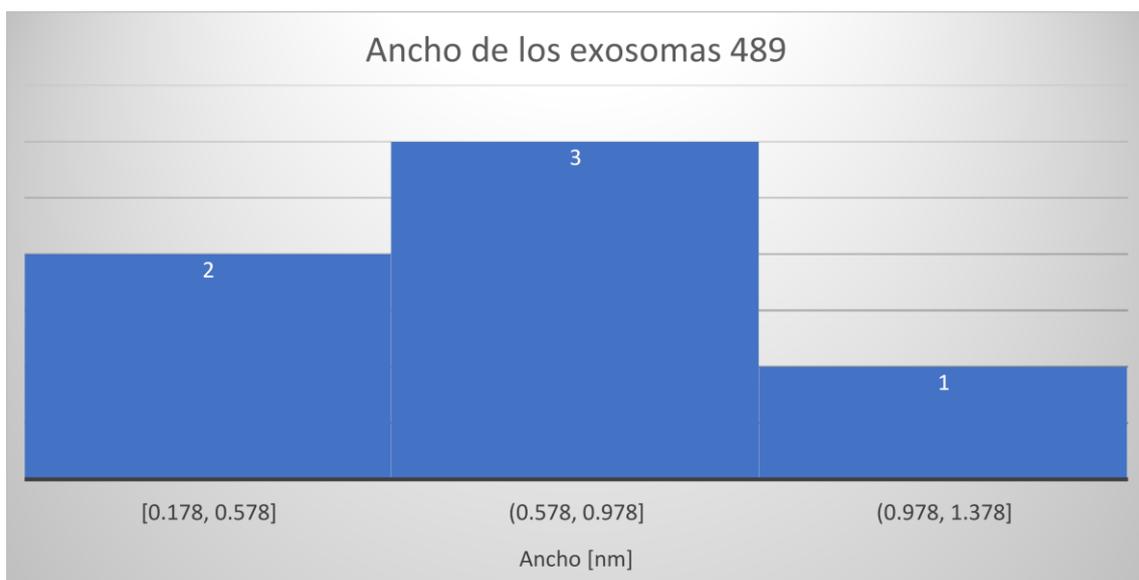
Figura 17. Topografía en AFM 28 μm x 28 μm a) En el plano x-y b) En tres dimensiones

Con las micrografías obtenidas anteriormente, se hicieron estudios de perfilometría para obtener las mediciones de la altura y del ancho de estos exosomas. Se obtuvo una altura de 9.06 ± 3.5 nm (Histograma 5), lo cual sigue siendo coherente con las hipótesis anteriores. Asimismo, Mi reporta que los exosomas tienen cambios estructurales al ser secados (Mi *et al*, 2021), lo que fortalece la hipótesis de la reducción del tamaño de los exosomas.



Histograma 5. Altura de los exosomas del segundo paciente por AFM

Sin embargo de obtuvo un ancho de 0.778 ± 0.2 nm (Histograma 6), lo cual se puede explicar con las gráfica de *Trace* (Ida) y *Retrace* (Vuelta), las cuales durante todo el experimento estuvieron desempalmadas, lo cual indica inconsistencia entre los datos tomados del cantiléver al tocar la muestra en un sentido y en el sentido opuesto, esto debido a que la muestra no estaba bien fijada al sustrato, lo que provocó que la muestra se desplazara, como se puede notar incluso en las Figuras 16 y 17, en donde la muestra se ve desplazada, al contrario de las micrográficas del primer paciente, en donde los exosomas se alcanzan a percibir esféricos y elevados sobre su propio eje.



Histograma 5. Ancho de los exosomas del segundo paciente por AFM

Por último, se puede apreciar que por medio de AFM se obtienen datos de topografía que no son tan consistentes, esto es debido a que cada tipo de muestra tiene su propio módulo de young, fuerza superficial, fuerza de adhesión y disipación de la energía, para lo cual se requiere una punta multiparamétrica que permita ajustarse a las propiedades de los exosomas para obtener micrografías consistentes y concluyentes (Mi *et al*, 2021)

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

- Aprendizajes profesionales

Aprendí a realizar el protocolo de extracción de los exosomas de riñón por medio de ultracentrifugación, gracias a la invitación que recibí a visitar el CIBO. Se aprendió a realizar la fijación de muestras biológicas por método químico, se aprendió que este proceso se utiliza para proteger la ultraestructura de los exosomas. Asimismo, se aprendió a metalizar muestras biológicas para volverlas conductoras y poderlas observar en el SEM. También, se aprendió el método de extracción de los exosomas y sobre su potencial uso para la detección temprana de la ERC.

- Aprendizajes sociales:

Se aprendió cómo los métodos y equipos utilizados en el estudio de materiales tienen una gran relevancia en el estudio de muestras biológicas y de su importancia para revelar tanto su presencia, como su tamaño y su morfología. Además, aprendí cómo se pueden realizar proyectos tan interesantes cuando se colabora entre distintos centros de investigación.

- Aprendizajes éticos:

Se aprendió la relevancia de aplicar los conocimientos usados en nanotecnología para atender las necesidades del campo clínico para realizar un análisis más profundo y completo en el tratamiento de una enfermedad tan prevalente en México y en mundo. Asimismo, se aprendió la importancia de cooperar entre instituciones para poder hacer investigaciones más completas y más interesantes.

- Aprendizajes en lo personal:

Aprendí la importancia de colaborar entre distintos centros de investigación, pues mientras un grupo estudiaba, extraía los exosomas y las proteínas, aquí pude realizar las mediciones micrográficas que en otros centros no se pueden llevar a cabo por la falta del equipo. De la misma manera que en nuestro instituto no es posible extraer este tipo de muestras. Aprendí también la necesidad de preparar con tiempo las muestras para agendar citas en las micrografías que permitan la continua obtención de datos.

5. Conclusiones

Se concluye que es posible diseñar protocolos para la caracterización de muestras biológicas blandas de tamaños nanométricos por medio de instrumentos de caracterización de nanomateriales, al tomar en cuenta las respectivas características estructurales, para ajustarlas al instrumento de medición. Se concluye que se logró realizar la fijación química de los exosomas, para observarse por ambas técnicas de microscopía. Para el SEM, puesto que se requiere una muestra conductora, se logró metalizar la muestra para poder obtener las micrografías por esta técnica. Además, se consiguió caracterizar la muestra de exosomas en cuanto a su diámetro y su morfología, se logró obtener un histograma en cada medición en el caso del SEM.

Se concluye que, para poder realizar un estudio completo desde la extracción, caracterización y análisis de datos, se requiere de la colaboración entre distintos centros de investigación, pues así se puede aprovechar el distinto equipo con el que cuenta cada instituto. Finalmente se tiene la perspectiva de realizar las microscopías en el SEM de una película delgada de solamente plata de 5 nm para contrastar con un control sin muestra, así como recubrir con plata un sustrato que solo tenga PBS, sin exosomas. Asimismo, se requiere obtener un cantiléver al cual se le puedan variar sus parámetros para obtener datos más consistentes por la técnica del AFM. Además, se concluye que es necesario hacer el resto de los pasos de limpieza para la obtención de mejores micrografías, pues estas presentaban contaminación por las sales del búfer, así como por los reactivos utilizados (Anexo 13-15). Además, se concluye la necesidad de aumentar el espesor del recubrimiento metálico, para evitar la degradación de la muestra como se mostró en las micrografías del SEM.

Finalmente, se concluye que con los conocimientos de nanotecnología y caracterización de materiales, se pueden aplicar al estudio de exosomas y demás muestras que no es posible visualizar en un microscopio óptico, pues estos se encuentran fuera del espectro electromagnético de la luz visible. Así como obtener micrografías que nos permitan visualizar la muestra y comprobar una correcta extracción de los exosomas, lo cual permitirá seguir avanzando en el desarrollo del proteoma de la ERC, para poder generar novedosos métodos de diagnóstico de esta enfermedad tan prevalente en nuestro estado y en el mundo.

6. Bibliografía

- Abay, A., Simionato, G., Chachanidze, R., Bogdanova, A., Hertz, L., Bianchi, P., van den Akker, E., von Lindern, M., Leonetti, M., Minetti, G., Wagner, C., & Kaestner, L. (2019). Glutaraldehyde - A subtle tool in the investigation of healthy and pathologic red blood cells. *Frontiers in Physiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00514>
- Alzhrani GN, Alanazi ST, Alsharif SY, Albalawi AM, Alsharif AA, Abdel-Maksoud MS, Elsherbiny N. Exosomes: Isolation, characterization, and biomedical applications. *Cell Biol Int*. 2021 Sep;45(9):1807-1831. doi: 10.1002/cbin.11620. Epub 2021 May 11. PMID: 33913604.
- CDS. (2021). *Chronic Kidney Disease in the United States, 2021*. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/kidneydisease/publications-resources/ckd-national-facts.html>
- Chaffey, N. (2001). Hayat MA. 2000. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. 4th edn. 543pp. Cambridge: Cambridge University Press. £65 (hardback). *Annals of Botany*, 87(4), 546–548. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1367>
- Cusabio (2022). *How Do You Get Exosomes?* - CUSABIO. Recuperado de: <https://www.cusabio.com/c-20965.html>
- Dear, J. W., Street, J. M., & Bailey, M. A. (2013). Urinary exosomes: A reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal

signalling. In *Proteomics* (Vol. 13, Issues 10–11, pp. 1572–1580).

<https://doi.org/10.1002/pmic.201200285>

- Gothenburg. (2021). *SEM sample preparation techniques*. University of Gothenburg. Recuperado de: <https://www.gu.se/en/core-facilities/sem-sample-preparation-techniques>
- Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. (2015) A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol Biol* 1295:179-209
- Hegmans JP, Gerber PJ, Lambrecht BN. Exosomes. *Methods Mol Biol*. 2008;484:97-109. doi: 10.1007/978-1-59745-398-1_7. PMID: 18592175.
- Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Jul 6;11(7):e0158765. doi: 10.1371/journal.pone.0158765. PMID: 27383068; PMCID: PMC4934905.
- Hopwood D. Some aspects of fixation with glutaraldehyde. A biochemical and histochemical comparison of the effects of formaldehyde and glutaraldehyde fixation on various enzymes and glycogen, with a note on penetration of glutaraldehyde into liver. *J Anat*. 1967 Jan;101(Pt 1):83-92. PMID: 6047703; PMCID: PMC1270860.
- Hughes, L. (2022, 18 abril). *Fixation for Electron Microscopy: Pros and Cons of 2 Methods*. Bitesize Bio. <https://bitesizebio.com/43315/cryofixation-and-chemical-fixation-for-electron-microscopy/>

- Karpman, D., Ståhl, A. L., & Arvidsson, I. (2017). Extracellular vesicles in renal disease. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 13, Issue 9, pp. 545–562). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.98>
- Maisano, D., Mimmi, S., Dattilo, V., Marino, F., Gentile, M., Vecchio, E., Fiume, G., Nisticò, N., Aloisio, A., de Santo, M. P., Desiderio, G., Musolino, V., Nucera, S., Sbrana, F., Andò, S., Ferrero, S., Morandi, A., Bertoni, F., Quinto, I., & Iaccino, E. (2022). A novel phage display based platform for exosome diversity characterization. *Nanoscale*, 14(8), 2998–3003. <https://doi.org/10.1039/d1nr06804k>
- Mi Li, Xinning Xu, Ning Xi, Wenxue Wang, Xiaojing Xing, Lianqing Liu, Multiparametric atomic force microscopy imaging of single native exosomes, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Volume 53, Issue 3, March 2021, Pages 385–388, <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa172>
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P. Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., Soria, C. E., Oquin, S., Bonebreak, C. M., Saracoglu, E., Skog, J., & Kuo, W. P. (2013). Current methods for the isolation of extracellular vesicles. In *Biological Chemistry* (Vol. 394, Issue 10, pp. 1253–1262). <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0141>
- NSI. Scanning Electron Microscopy. (2022, 1 marzo). Nanoscience Instruments. <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>
- Rafal S, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci*. 2017 May 29;18(6):1153. doi: 10.3390/ijms18061153. PMID: 28555055; PMCID: PMC5485977.

- Dehesa López, E. (2008). *Enfermedad renal crónica; definición y clasificación* (Vol. 3). www.medigraphic.com
- Sharma S, LeClaire M, Gimzewski JK. Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles. *Nanotechnology*. 2018 Apr 3;29(13):132001. doi: 10.1088/1361-6528/aaab06. PMID: 29376505.
- Secretaría de Salud. *Jóvenes con enfermedades renales son más susceptibles a COVID-19 | Secretaría de Salud*. (s. f.). <https://ssj.jalisco.gob.mx/prensa/noticia/9344>
- System Biosciences, LLC. (2022). *NTA-based Exosome Characterization | System Biosciences*. <https://www.systembio.com/services/exosome-services/nanosight-analysis>
- Vall-Palomar, M., Arévalo, J., Ariceta, G., & Meseguer, A. (2018). Establishment of urinary exosome-like vesicles isolation protocol for FHHNC patients and evaluation of different exosomal RNA extraction methods. *Journal of Translational Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1651-z>
- Wu, Y., Deng, W. & Klinke II, D. J. (2015). Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *The Analyst*, 140(19), 6631-6642. <https://doi.org/10.1039/c5an00688k>
- Zeringer, E., Barta, T., Li, M., & Vlassov, A. v. (2015). Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(4), 319–323. <https://doi.org/10.1101/pdb.top074476>

- Zhou, M., Weber, S. R., Zhao, Y., Chen, H. & Sundstrom, J. M. (2020). Methods for exosome isolation and characterization. *Exosomes*, 23-38. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816053-4.00002-x>

Anexos



Anexo 1. Centrifugadora del paso 4 en el Protocolo 1



Anexo 2. Baño celulógico y vórtex del paso 6, protocolo 1



Anexo 3. Ultracentrifugadora del CIBO. De los pasos pasos 8 y 11, protocolo 1



Anexo 4. Parámetros de la ultracentrifugadora del CIBO en el paso 8, protocolo 1

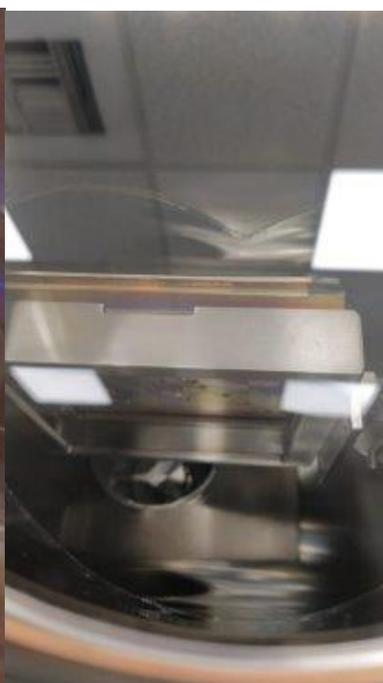
Para metalizar las muestras se utilizó el equipo *Sputtering* que se muestra en la Anexo 5, el cual realizó un depósito por pulverización catódica por medio de la creación de plasma que se visualiza en la Anexo 6. Posteriormente se observa cómo la muestra quedó recubierta dentro del equipo (Anexo 7). Finalmente, se puede apreciar en el Anexo 8 que las muestras ya están recubiertas.



Anexo 5. Sputtering



Anexo 6. Creación de plasma



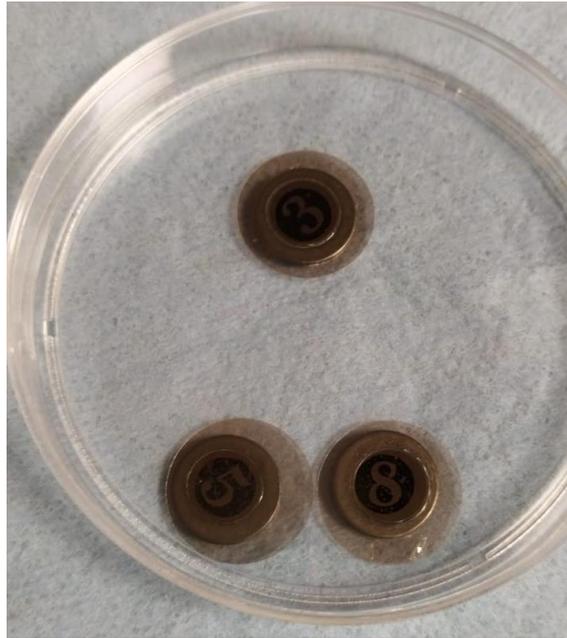
Anexo 7. Recubrimiento



Anexo 8. Recubrimiento de plata

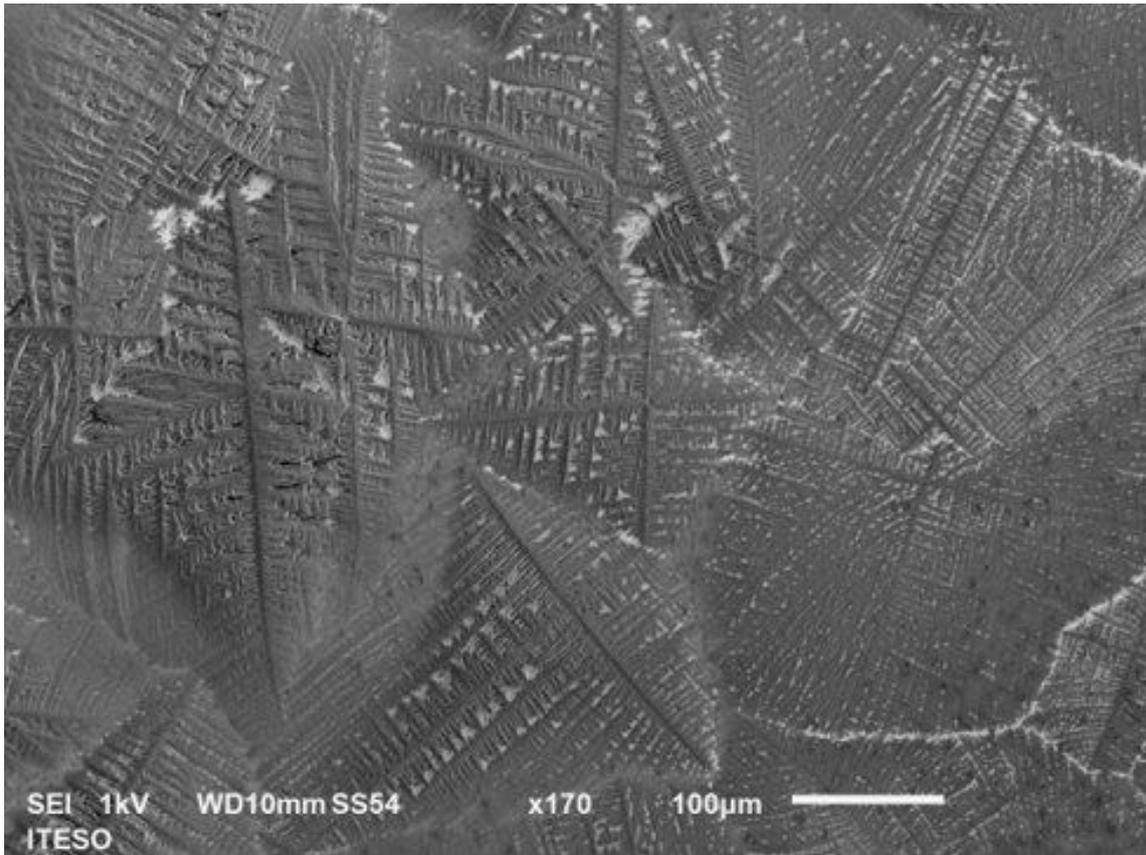


Anexo 9. Poli-L-Lisina

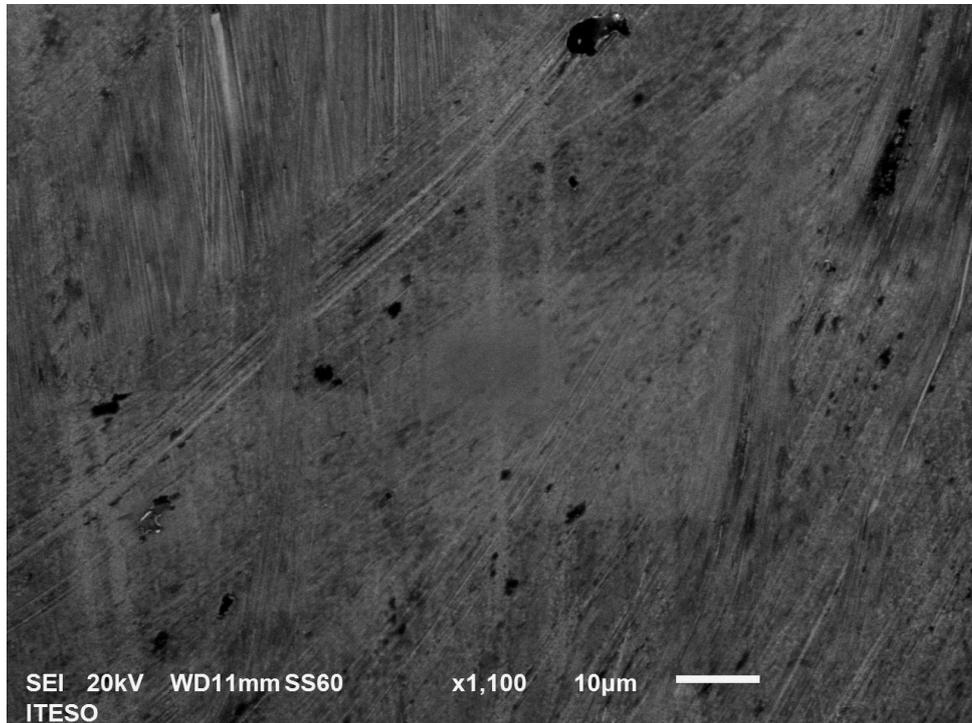


Anexo 10. Discos de resina montados sobre una mica

Puesto que se quiso demostrar de otra manera que las observaciones ciertamente correspondían a los exosomas, se hicieron mediciones sin recubrimiento para ver si se volvía a observar la muestra, como se observa en la Anexo 11, que corresponde a una muestra de exosomas 489 fijados y diluidos con agua miliQ. Se alcanzan a ver las morfologías de las sales, pero al hacer más magnificaciones, la muestra comenzaba a quemarse como se mencionó anteriormente, a pesar de los bajos voltajes de observación de 1kV. Asimismo, se observó una película delgada sin exosomas para tener un control, sin embargo, esta presentó rayaduras que no permitió ver correctamente la topografía (Anexo 12).



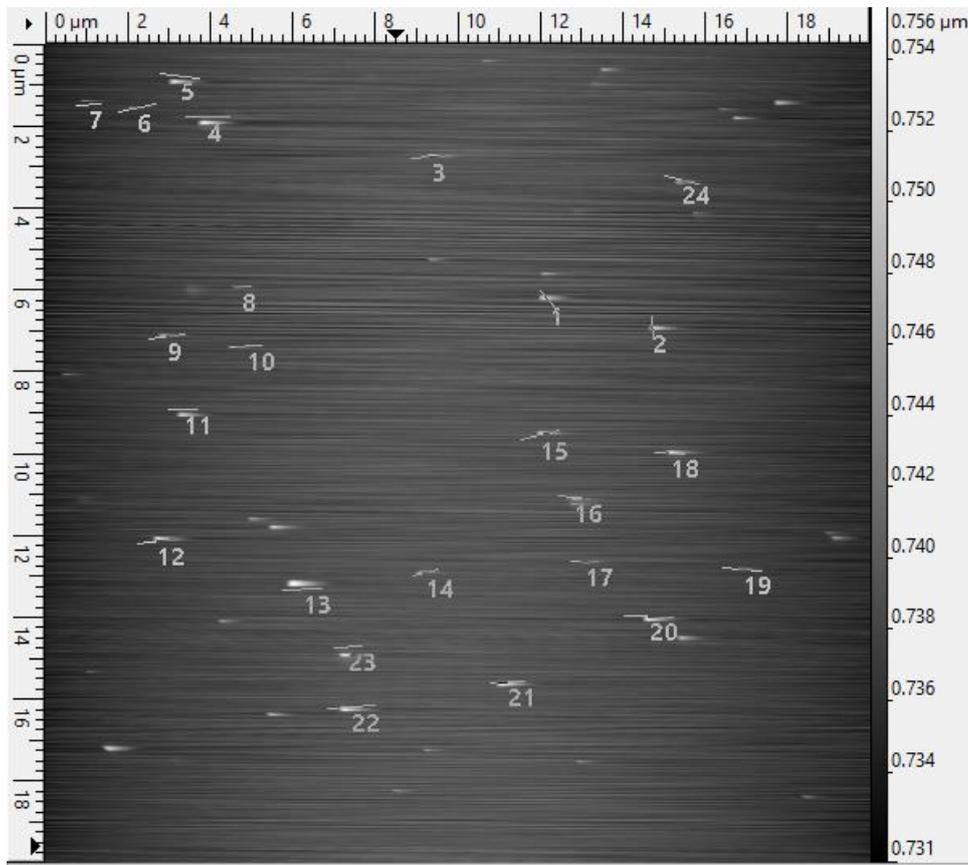
Anexo 11. Muestra sin recubrimiento



Anexo 12. Película Delgada de Plata

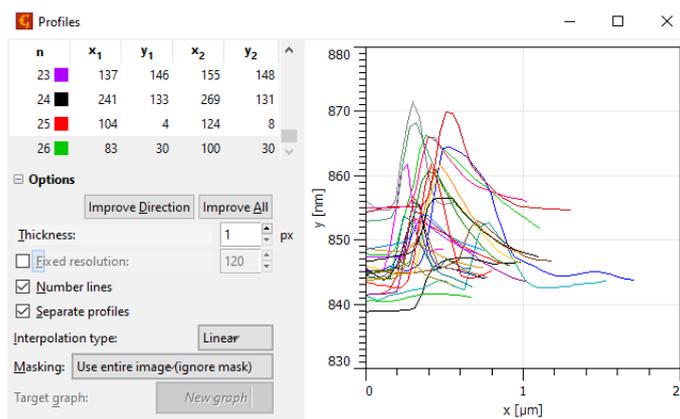
En cuanto a la metodología de perfilometría que se realizó para obtener las propiedades estructurales de los exosomas por medio de AFM, primeramente, se

trazaron líneas rectas sobre los puntos más altos que se observaron en cada micrografía. Estas líneas, llamadas perfiles pueden observarse en el Anexo 13.



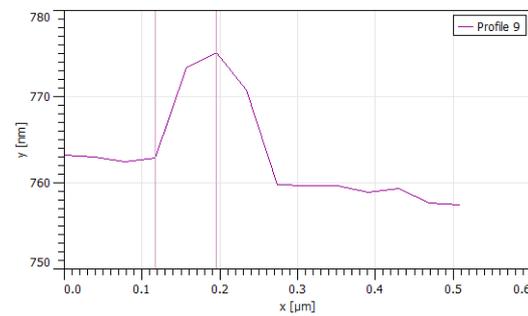
Anexo 13. Perfiles sobre la micrografía

Cada uno de estos perfiles se grafica en un plano en el que se puede observar cómo cada perfil registra la topografía del montículo sobre la línea en la que fue trazado, como se aprecia en el Anexo 14.



Anexo 14. Conjunto de perfiles obtenidos

Cada uno de estos perfiles se analizó individualmente, del cual se pueden dibujar líneas verticales que indican punto inicial y punto final en donde crucen al perfil, de esta manera se pueden obtener las alturas como se observo en los Anexos 15 y 16)

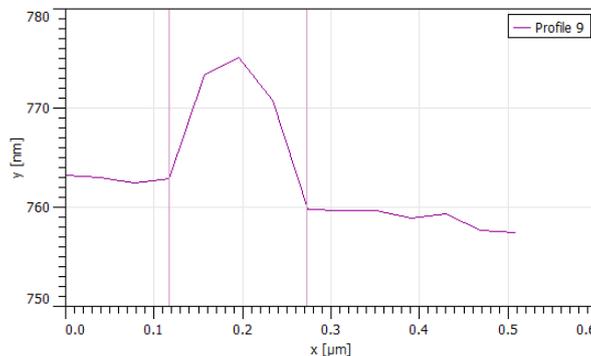


Anexo 15. Perfil individual

Points	X [nm]	Y [nm]	Length [nm]	Height [nm]	Angle [deg]
	117.0	762.93			
	195.4	775.05	78.4	12.12	8.78

Anexo 16. Datos con los puntos obtenidos en el perfil individual al marcar dos puntos para ver la diferencia en distancia entre ellos

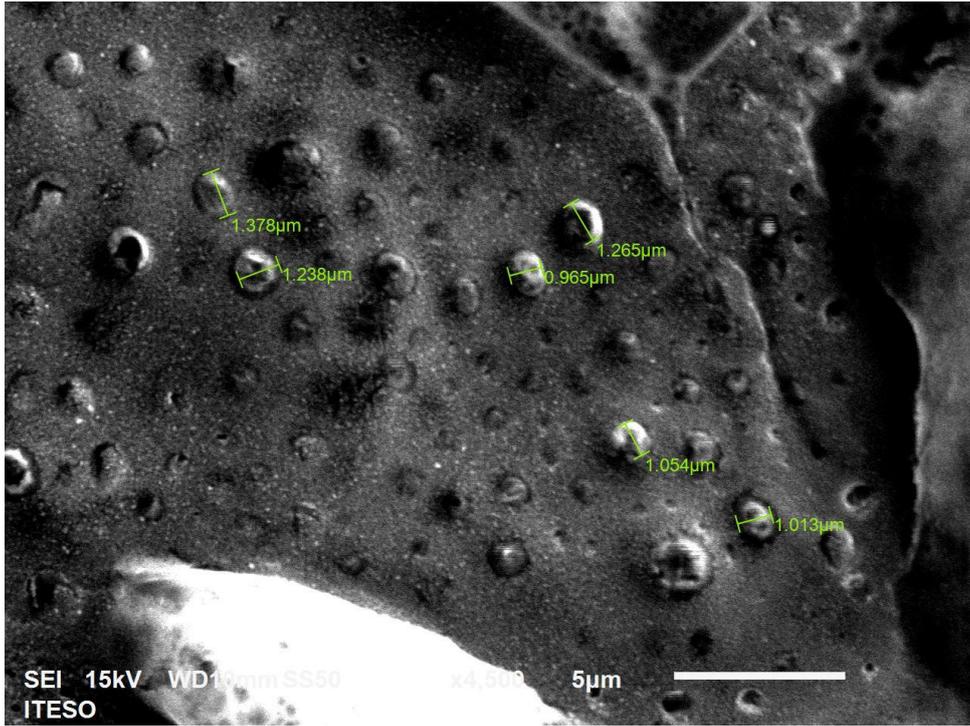
Lo mismo se realizó para obtener los tamaños del ancho, como se puede observar en los Anexos 17 y 18.



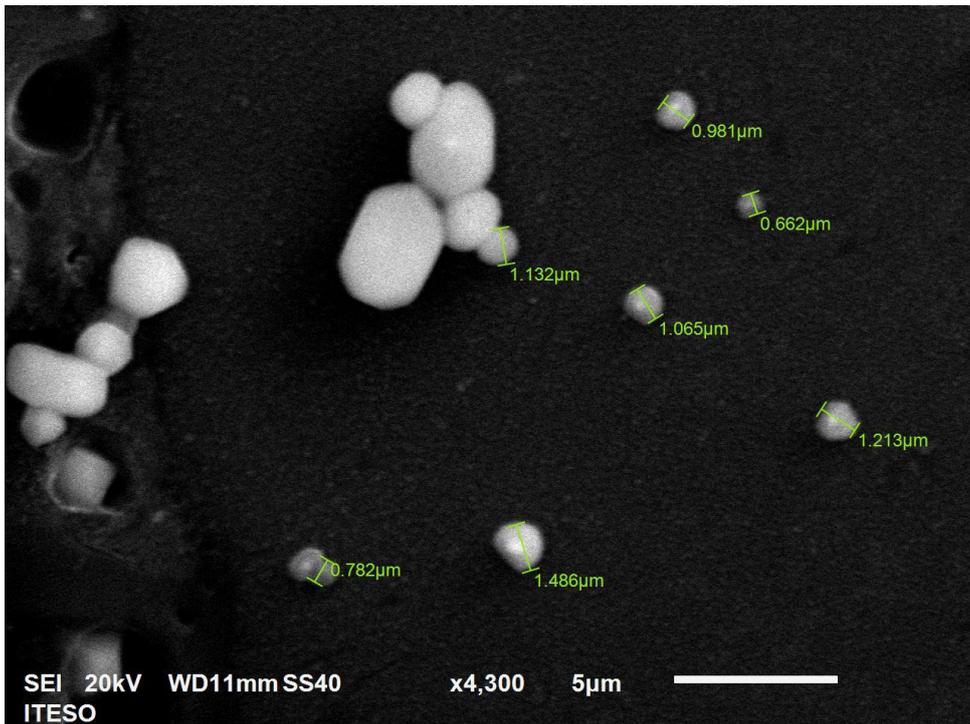
Anexo 17. Perfil individual

Points	X [nm]	Y [nm]	Length [nm]	Height [nm]	Angle [deg]
	117.0	762.93			
	272.6	760.04	155.6	-2.89	-1.06

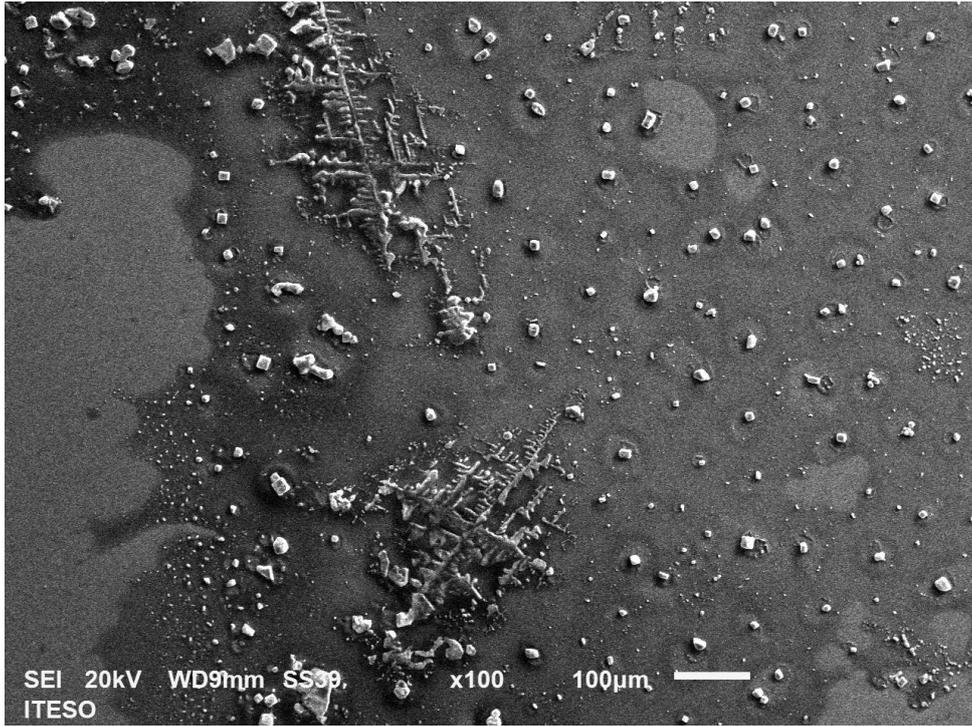
Anexo 18. Datos con los puntos obtenidos en el perfil individual al marcar dos puntos para ver la diferencia en distancia entre ellos



Anexo 19. Contaminación en la muestra (Muestra fijada de exosomas 378 sin diluir)



Anexo 20. Contaminación en la muestra (Muestra fijada de exosomas 378 sin diluir)



Anexo 21. Contaminación en la muestra (Muestra de exosomas No. 378 fijados y diluidos en etanol)