

LOS EXOSOMAS. NUEVAS HERRAMIENTAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES EN BIOPSIAS LÍQUIDAS

Rosanna Rossi, Arnau Pallarès-Rusiñol, Mercé Martí, María Isabel Pividori

Institute of Biotechnology and Biomedicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain
Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain
isabel.pividori@uab.cat

1. Los exosomas. Definición, biogénesis y nomenclatura

Los exosomas son partículas biológicas encapsuladas en membrana de tamaño nanométrico que van desde 30–200 nm de diámetro y de origen endocítico, que son liberadas por todo tipo de células [1] (Fig. 1). Aunque inicialmente se creía que eran desechos celulares o productos de la homeostasis celular sin función alguna, evidencias recientes indican que los exosomas tienen funciones específicas, incluida la comunicación intercelular [2] y el transporte de moléculas biológicamente activas. Una de las características más notables de los exosomas es que pueden encontrarse en todos los fluidos biológicos, incluidos sangre, orina, saliva, leche, líquido cefalorraquídeo, entre otros [3]. Su fácil accesibilidad es una de las razones más relevantes para utilizar exosomas como biomarcadores clínicos en biopsias líquidas. Otra característica llamativa es que su carga molecular refleja el estado de la célula que le dio origen y, por tanto, su estudio racional puede ser útil para el diagnóstico y pronóstico de varias condiciones y enfermedades.

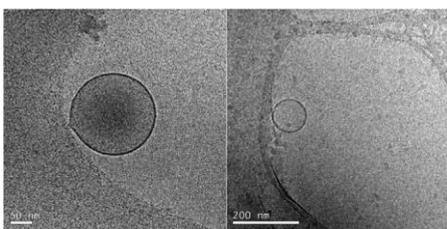


Fig 1. Microscopía electrónica de transmisión (cryo-TEM) de exosomas derivados del suero humano (panel izquierdo) y del líquido cefalorraquídeo (panel derecho). Las imágenes fueron obtenidas a -182°C y a 200 kV por los autores del Servicio de Microscopía de la Universitat Autònoma de Barcelona.

2. Exosomas como biomarcadores en el diagnóstico clínico

Como se ha comentado en la anterior sección, los exosomas son considerados en la actualidad objeto de estudio como biomarcadores prometedores para la detección sensible, no invasiva y temprana de enfermedades no transmisibles, tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y

neurodegenerativas, inflamación crónica, enfermedades metabólicas, renales, entre otras muchas. Sin embargo, su potencial como biomarcador se ve limitado debido a que, por su tamaño nanométrico, requiere nuevos avances técnicos para su caracterización, ya que su detección se encuentra por debajo de la sensibilidad de la mayoría de las plataformas de clasificación o análisis celulares, como los citómetros clásicos. El método más común para el análisis de exosomas implica típicamente la purificación, seguida de la caracterización específica de su carga biomolecular [4]. La purificación de exosomas puede realizarse mediante una variedad de métodos, incluida la ultracentrifugación diferencial, la precipitación, la cromatografía de exclusión por tamaño y la ultrafiltración. La identificación también requiere el análisis morfológico de su integridad. Dado su pequeño tamaño, los exosomas solo pueden visualizarse con un microscopio electrónico (Fig. 1). El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) es un método comúnmente utilizado para el recuento de exosomas, seguido de la posterior caracterización de su firma proteica única mediante LC-MS/MS y Western blot, y de material genético mediante métodos moleculares, tales como qPCR, RT-qPCR, RNA-seq. El procedimiento es laborioso y requiere instalaciones e instrumentación avanzadas. Por esto, las metodologías actuales presentan serias limitaciones en el aislamiento, detección y caracterización de exosomas con alta especificidad, sensibilidad y simplicidad en entornos de escasos recursos técnicos.

3. La separación magnética en la purificación y preconcentración de exosomas desde muestras complejas

Como se ha comentado en la sección anterior, debido a su baja concentración, los procedimientos convencionales para la caracterización y detección de exosomas suelen requerir volúmenes de muestra relativamente grandes e implicar un paso preliminar de purificación y preconcentración. El aislamiento de los exosomas se realiza de forma óptima mediante ultracentrifugación diferencial, pero es un procedimiento notablemente laborioso y de bajo rendimiento, e incompatible con plataformas emergentes de diagnóstico dedicadas a

entornos con recursos limitados. La centrifugación diferencial fue la primera técnica descrita y posteriormente optimizada para llegar a valores de 100000 g (ultracentrifugación) en la separación de exosomas. Mediante esta estrategia se eliminan las interferencias de células muertas, residuos celulares y proteínas solubles. Además de los altos requerimientos técnicos, la principal desventaja es la falta de especificidad, ya que separa toda la población de exosomas, independientemente de su origen celular, sin aprovechar la rica información contenida en las subpoblaciones de exosomas. Por lo tanto, existe una demanda global de métodos simples, robustos y específicos de aislamiento de exosomas a partir de fluidos biológicos complejos, y que puedan integrarse fácilmente en tecnologías emergentes adecuadas para el diagnóstico en el punto de atención. Idealmente, los exosomas deberían preconcentrarse específicamente mientras se elimina la matriz interferente al mismo tiempo, aumentando también la sensibilidad de la detección. Desde los primeros reportes sobre la tecnología de separación magnética en biosensores [5] e inmunosensores [6] electroquímicos, se han utilizado de forma extensiva las partículas magnéticas (PM) en tecnologías emergentes que incluyen dispositivos microfluídicos y biosensores para vesículas extracelulares. También, se ha demostrado que las PM pueden ser fácilmente funcionalizadas con diferentes grupos moleculares para ser conjugadas con una amplia gama de biomoléculas para la interacción específica con el analito en una muestra compleja. Si el elemento de bioreconocimiento es un anticuerpo que reacciona con el analito, este procedimiento se denomina separación inmunomagnética (IMS). Para separar un exosoma de forma íntegra mediante esta estrategia, es muy importante comprender su estructura, especialmente sus receptores en la membrana. Por ejemplo, una característica importante de los exosomas es la presencia de tetraspaninas (CD81, CD63, CD9) en su membrana externa. Otra característica importante de la IMS es la inmovilización orientada de anticuerpos específicos hacia los exosomas. Se ha descrito la inmovilización covalente de anticuerpos comerciales específicos de exosomas en PM [7]. Las microPM activadas con tosilo reaccionan con los grupos amino presentes en la estructura del anticuerpo. Para cuantificar la cantidad total de anticuerpo inmovilizado en las PM, se puede realizar ELISA o eventualmente un método de cuantificación de proteínas como el de Bradford [7]. Otro enfoque que se presenta es la inmovilización covalente directa de exosomas en PM tosiladas [7]. Esta estrategia es relevante para la caracterización de la carga biomolecular de los exosomas mediante citometría de flujo con equipo convencional, ya que al inmovilizar los exosomas en PM micrométricas, se

sortea el problema del escaso tamaño de estos para la sensibilidad de este método. Otras aplicaciones para exosomas unidos a PM implican inmunoensayo magnético o microscopía confocal, entre otros. En el próximo apartado, se tratarán diferentes estrategias biosensoras con transducción electroquímica que integran la IMS en biopsias líquidas.

4. Inmunosensores electroquímicos para la detección de exosomas como biomarcadores para cáncer de mama en biopsias líquidas

Los exosomas están recibiendo una atención muy destacada en la comunidad científica como nuevos biomarcadores para la detección del cáncer, ya que son liberados profusamente por las células tumorales en diferentes fluidos biológicos. Asimismo, también son de relevancia todas aquellas plataformas emergentes de diagnóstico dedicadas a entornos con recursos limitados para la detección de exosomas. En primer lugar, se ha diseñado y estudiado en diferentes formatos un primer dispositivo inmunosensor electroquímico para la caracterización y cuantificación de exosomas derivados de tres líneas celulares de cáncer de mama (MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3). Para tal fin, se propone el uso de IMS como método de preconcentración en fase sólida, con el fin de evitar el uso de ultracentrifugación [8]. Así, los exosomas se preconcentran a partir del sobrenadante del cultivo celular en PM modificadas con anticuerpos contra los tetraspaninas generales CD9, CD63 y CD81, así como receptores específicos del cáncer (CD24, CD44, CD54, CD326 y CD340). Además, se demuestra que el inmunosensor electroquímico para los exosomas en muestras ultracentrifugadas y basada en tetraspaninas generales (por ejemplo, CD63) puede ser utilizada como método alternativo para el recuento total de exosomas purificados en lugar del NTA, logrando LODs inferiores a 100 exosomas μL^{-1} [8]. Asimismo, el inmunosensor electroquímico es capaz de alcanzar un límite de detección de 105 exosomas μL^{-1} directamente en suero humano, mediante la IMS con partículas modificadas con antiCD81 y el marcaje basado en CD24 y CD340 como biomarcador relacionado con el cáncer, evitando la interferencia de la matriz del suero [8]. En este formato, es obligatoria la coexistencia de dos receptores en el exosoma, el primero para la IMS mientras que el segundo para la marcación y lectura electroquímica (Fig. 2).

Se probaron dos formatos, combinando biomarcadores generales y relacionados con el cáncer (Fig. 2, panel A y panel B). El uso combinado de la IMS (basado en un receptor de cáncer específico como CD24 y CD340) seguido de la detección basada en un receptor general sobreexpresado (como CD63) proporcionó los mejores

resultados en términos de sensibilidad, pudiendo distinguir claramente entre donantes sanas y mujeres con cáncer de mama (Fig. 2, panel B). Este enfoque es un método alternativo altamente adecuado para la detección de exosomas en entornos con recursos limitados [8]. El principal inconveniente de los exosomas como biomarcadores, incluso si se determinan con las mejores tecnologías actuales, sigue siendo la necesidad de caracterización a nivel de vesícula única con poca o ninguna preparación de muestra, para evaluar la rica información contenida dentro de las subpoblaciones de exosomas. Esto se debe a la alta variabilidad en la expresión de los receptores. Este hecho es confirmado por nuestro estudio, ya que se observaron diferencias en la expresión de los exosomas derivados de las tres líneas celulares de cáncer de mama [8].

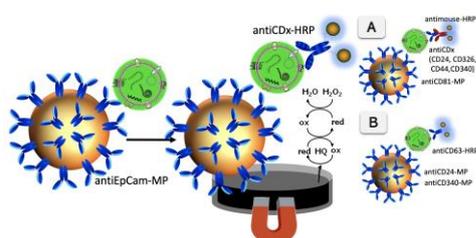


Fig 2. Esquema de un dispositivo inmunosensor de transducción electroquímica basado en el doble reconocimiento con dos anticuerpos, uno general de exosoma y otro, de cáncer de mama.

Un formato muy similar se ha descrito para la cuantificación basada en un inmunoensayo magnetoaccionado. Los exosomas se separan y se preconcentran en PM mediante IMS y se marcan con un segundo anticuerpo conjugado con una enzima para, en este caso, la lectura óptica realizada con un lector de microplacas estándar [9]. Se estudiaron varios biomarcadores moleculares, incluidos los tetraspaninas generales CD9, CD63 y CD81, y los receptores relacionados con el cáncer (CD24, CD44, CD54, CD326 y CD340), ya sea para la IMS o el marcaje, en diferentes formatos. Después de una selección racional de los biomarcadores, este inmunoensayo es capaz de detectar 105 exosomas μL^{-1} directamente en suero humano sin ningún tratamiento, como la ultracentrifugación. Además, también se demostró la diferenciación entre donantes sanos e individuos con cáncer de mama. Este enfoque es un método alternativo altamente adecuado para la citometría de flujo, proporcionando un método sensible para la detección múltiple, pero utilizando instrumentación ampliamente disponible en laboratorios con recursos limitados y que requiere poco mantenimiento, como es el caso de un lector de microplacas operado por filtros [9].

Asimismo, se ha desarrollado un segundo tipo de biosensor que combina la IMS y el biosensado

electroquímico basada en la actividad intrínseca de la fosfatasa alcalina (ALP) de los exosomas (Fig. 3). Es importante destacar que la actividad de la ALP es un biomarcador bien establecido, determinado rutinariamente en análisis clínicos, para el monitoreo de una serie de enfermedades. Por ejemplo, la ALP desempeña un papel en el diagnóstico de trastornos hepáticos, o de enfermedad periodontal. Además, varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de ALP puede estar correlacionada con procesos metastásicos en enfermedades cancerosas, como el osteosarcoma, el cáncer de próstata, el cáncer colorrectal y el cáncer de mama [10]. Este diseño explora por primera vez dos tipos diferentes de biomarcadores en exosomas, en un dispositivo biosensor único que combina dos reacciones de bioreconocimiento diferentes: inmunológica y enzimática [11]. Además, también se explora la actividad intrínseca de la ALP en los exosomas como un posible biomarcador de la carcinogénesis, así como de la invasión metastásica ósea. Para tal fin, como modelo *in vitro*, se utilizan exosomas de osteoblastos fetales humanos, que en estudios previos demostraron presencia de ALP [12].

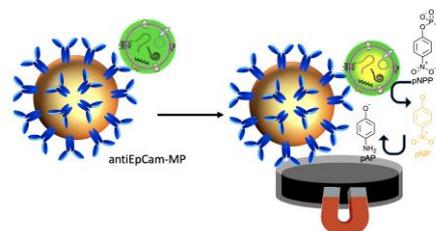


Fig 3. Esquema de un dispositivo biosensor enzimático de transducción electroquímica para la detección de exosomas de cáncer de mama, que integra el aislamiento específico de exosomas mediante CD326 epitelial (EpCAM), y la actividad intrínseca de ALP, utilizada para la lectura electroquímica.

Este es el primer biosensor electroquímico que integra el aislamiento específico de PM para la detección de la actividad de la ALP, tanto en exosomas derivados de osteoblastos como de cáncer de mama. Este dispositivo ha demostrado ser útil para la discriminación entre pacientes sanos y con cáncer de mama, confirmando la expresión simultánea de biomarcadores de cáncer en exosomas, como es el caso de CD326 epitelial (EpCAM), utilizado para el aislamiento específico, y la actividad intrínseca de ALP, utilizada para la lectura electroquímica. El biosensor electroquímico basado en ALP para exosomas, con un límite de detección de 105 exosomas μL^{-1} (4,39 mU L^{-1} o 13,47 mU mg^{-1}), representa una mejora en los límites de detección en comparación con otras cuantificaciones de exosomas, y es más sensible que el ensayo espectrofotométrico de referencia para la ALP [11].

Además, este biosensor simplifica el formato convencional de inmunodetección en sandwich, que utiliza dos anticuerpos para la detección y, en la mayoría de los casos, dos incubaciones y una reacción enzimática adicional [8,9]. La diferencia entre donantes sanos y pacientes con cáncer de mama está en concordancia con el biomarcador epitelial CD326 altamente expresado reportado previamente por nuestro grupo de investigación y la enzima ALP en pacientes con cáncer de mama. Aunque este es un estudio preliminar, el biosensor propuesto, que combina la inmunocaptura de exosomas y la detección enzimática intrínseca, proporciona un nuevo dispositivo destinado a la simplificación del procedimiento analítico. En el caso de nanovesículas con múltiples biomarcadores, la necesidad de dos o más anticuerpos para la captura y detección implica ensayos costosos y que consumen tiempo para encontrar un buen par de anticuerpos evitando la reactividad cruzada. Además, algunas subpoblaciones pueden ser excluidas ya que los dos biomarcadores deben expresarse de manera igual en un único exosoma. El uso de la actividad enzimática intrínseca de los exosomas es una estrategia novedosa que puede aplicarse a otros dispositivos no sólo para la lectura electroquímica, sino también con detección visual en pruebas de diagnóstico rápido basadas en papel utilizando los sustratos adecuados para la actividad de ALP [11].

También, se ha desarrollado un tercer tipo de dispositivo biosensor. En este tercer caso, los exosomas se preconcentran a partir del suero mediante IMS basada en el receptor CD326 como biomarcador específico del cáncer epitelial y se detectan mediante los transcritos de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) [13]. Tras la lisis de los exosomas capturados, los transcritos de GAPDH liberados se amplifican mediante RT-PCR con un conjunto de cebadores de doble marcación en PM modificadas con poli(dT), con el objeto de incrementar la sensibilidad. El amplicón de doble marca se cuantifica entonces mediante un genosensor electroquímico (Fig. 4).

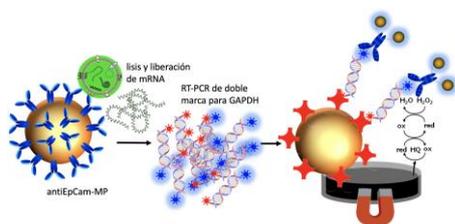


Fig 4. Esquema de un dispositivo biosensor de transducción electroquímica para la detección de exosomas de cáncer de mama, que integra el aislamiento específico de exosomas mediante CD326 epitelial (EpCAM), y la amplificación de transcritos mediante RT-PCR de doble marca, cuantificados mediante un genosensor electroquímico.

El formato basado en la combinación de IMS, RT-PCR de doble marcación y el genosensor electroquímico, se demuestra primero para la detección sensible de exosomas derivados de células de cáncer de mama MCF7 y se compara con células tumorales circulantes (CTCs) en términos de rendimiento analítico, mostrando un límite de detección de 4×10^2 exosomas μL^{-1} . El genosensor se aplicó a muestras humanas mediante la inmunocaptura de los exosomas directamente del suero de pacientes con cáncer de mama y mostró una señal electroquímica más alta (3,3 veces, $p < 0,05$), en comparación con controles sanos, lo que sugiere una sobreexpresión de GAPDH en exosomas derivados del suero de pacientes con cáncer de mama. La detección de los transcritos de GAPDH se realiza a partir de solo 1,0 mL de suero humano utilizando PM específicas, mejorando la simplificación analítica y evitando pasos de ultracentrifugación, lo que demuestra ser una estrategia prometedora para la biopsia líquida mínimamente invasiva [13]. Aunque se deben realizar más estudios con muestras en etapas tempranas de cáncer, estos datos sugieren claramente la expresión de GAPDH en exosomas totales del suero humano de pacientes sanos y con cáncer de mama, lo que reveló que el gen GAPDH está sobreexpresado en 6,7 veces en mujeres con cáncer de mama en etapa IV, en comparación con los controles sanos. Además, los exosomas específicamente inmunocapturados CD326 (+) expresaron el gen GAPDH hasta en 3,3 veces más, en comparación con los controles sanos. Es interesante destacar que la selección positiva de exosomas que expresan CD326 mediante el uso de IMS proporciona una estrategia efectiva para separar exosomas con mayor eficiencia que la ultracentrifugación, logrando un formato específico para el aislamiento y preconcentración de una subpoblación de exosomas [13]. Esta estrategia es compatible con el diagnóstico en el punto de atención, ya que las PM pueden integrarse fácilmente en diferentes plataformas de dispositivos de diagnóstico *in vitro*, incluidos los dispositivos de biosensores. En conclusión, el aumento significativo del contenido de transcritos de GAPDH en exosomas de pacientes en comparación con controles sanos vislumbra su papel como un biomarcador potencial para el diagnóstico del cáncer de mama y el monitoreo de la enfermedad metastásica. Este trabajo muestra así una estrategia prometedora, basada en una biopsia líquida mínimamente invasiva.

Por último, se ha desarrollado un cuarto tipo de dispositivo biosensor basado en un péptido biotinilado obtenido por la técnica de phage display (librería de expresión en fagos) (Fig. 5). En este formato, se realiza la separación magnética de exosomas basado en anti-CD63, seguido de detección electroquímica utilizando el péptido biotina-C3 y estreptavidina-poliHRP [14]. Los LODs alcanzados representaron una mejora de tres veces en comparación

con estudios previos [8,11], alcanzando valores del orden de 10^2 exosomas μL^{-1} . Es importante destacar que estos LODs fueron comparables a los del genosensor de transducción electroquímica basado en IMS [13], destacando la eficacia de la estrategia de marcaje con péptido biotina-C3 y estreptavidina-poliHRP. Este mejor rendimiento se atribuye a las ventajas del péptido biotina-C3, particularmente su tamaño más pequeño en comparación con los anticuerpos, lo que mejora la difusión y la cinética de unión en analitos complejos como los exosomas. Los péptidos obtenidos mediante phage display ofrecen varias ventajas en comparación con los anticuerpos como bioreceptores en biosensores, incluida la selección de péptidos con alta especificidad y afinidad para un analito. Además, la síntesis de péptidos es más económica que la de anticuerpos. Los péptidos pueden ser fácilmente sintetizados en el laboratorio, lo que permite una producción a gran escala y reproducible. Esto contrasta con los anticuerpos, que suelen ser producidos en organismos vivos. La tecnología de phage display permite la generación de péptidos específicos con costes asociados inferiores, lo que los convierte en una opción más económica para aplicaciones en biosensores. Otra característica importante es la mayor estabilidad en diferentes condiciones ambientales en comparación con los anticuerpos. Los ensayos de citometría de flujo basados en exosomas inmovilizados directamente en PM y capturados en PM modificadas con anticuerpos anti-CD9, anti-CD63 y anti-CD81 validaron la capacidad del péptido para unirse a estos exosomas. Resultados de proteómica sugieren que el péptido biotina-C3 se dirige a mitocondrias (exosomas de origen mitocondrial), destacando su potencial como marcador para procesos relacionados con tumores, incluida la reprogramación energética y el estado redox celular, especialmente en vesículas extracelulares derivadas del cáncer de mama.

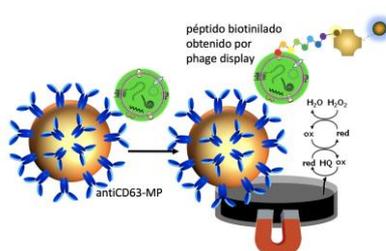


Fig 5. Esquema de un dispositivo biosensor de transducción electroquímica basado en un péptido para la detección de exosomas.

5. Comentarios finales

En resumen, este estudio ha explorado varios enfoques biosensores para la detección y cuantificación de exosomas como biomarcadores para el cáncer de mama. Se ha demostrado la eficacia de diferentes dispositivos

biosensores, cada uno con sus propias ventajas y aplicaciones potenciales. En primer lugar, se desarrolló un inmunosensor electroquímico que utiliza IMS para preconcentrar los exosomas y luego detectarlos mediante un segundo anticuerpo marcado. Este formato demostró ser capaz de distinguir entre donantes sanos e individuos con cáncer de mama, ofreciendo un método sensible y específico para la detección de exosomas en suero humano. Además, se describió un formato similar en un inmunoensayo magneto-accionado, que utiliza anticuerpos específicos para la separación y detección de exosomas. Este método es especialmente adecuado para entornos con recursos limitados debido a su uso de instrumentación estándar de bajo coste. Un segundo enfoque biosensor presentado se basa en la actividad intrínseca de la ALP de los exosomas. Este método combina la IMS con la detección enzimática, proporcionando una alternativa novedosa para la detección de exosomas con alta sensibilidad y especificidad. Un tercer enfoque utiliza IMS basada en CD326 y la amplificación de transcritos de GAPDH mediante RT-PCR en PM. El genosensor electroquímico cuantifica los transcritos amplificados, demostrando una alta sensibilidad para detectar exosomas de células de cáncer de mama MCF7. Al aplicarse a muestras de suero humano, el dispositivo revela una sobreexpresión de GAPDH en exosomas de pacientes con cáncer de mama. Esta técnica promete ser una estrategia mínimamente invasiva y efectiva para el diagnóstico y monitoreo del cáncer de mama. Finalmente, se introdujo un dispositivo biosensor basado en un péptido biotilado obtenido mediante la técnica de phage display. Este enfoque también demostró una mejora significativa en la sensibilidad de detección de exosomas y ofrece ventajas en términos de costes y ambientales, en términos de la producción de los reactivos.

Además de la aplicación en cáncer, los exosomas son también muy prometedores como biomarcadores en otro tipo de enfermedades no transmisibles tal como es la enfermedad de Alzheimer, en el que la detección de exosomas de origen neuronal en sangre periférica evitaría el diagnóstico en muestras invasivas, tal como el líquido cefalorraquídeo [15,16]. Se está trabajando con resultados muy prometedores en nuevos marcadores neuronales en exosomas en plasma para la enfermedad de Alzheimer y su integración a un dispositivo portátil con batería, que consta de un cartucho desechable y un lector (patente PCT/EP2022/071078). El dispositivo es rápido y económico, requiere un manejo mínimo por parte del usuario, ya que el cartucho elimina la necesidad de lavados y pipeteados.

Este formato puede separar de manera eficiente y específica los exosomas de origen neuronal mediante separación magnética utilizando anticuerpos dirigidos

contra proteínas enriquecidas en exosomas derivados de neuronas y biomarcadores relacionados con la enfermedad de Alzheimer. El dispositivo podría introducirse fácilmente en el cribado ambulatorio del Alzheimer y la estratificación del riesgo de los pacientes.

En general, estos resultados sugieren que los exosomas tienen un gran potencial como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades no transmisibles en biopsias líquidas, y los diferentes enfoques presentados en este estudio proporcionan herramientas prometedoras para su detección y monitoreo en entornos clínicos y de investigación.



Fig 6. Prototipo portátil de biosensor electroquímico operado por baterías, que incluye el cartucho, el lector y la electrónica involucrada.

Agradecimientos

Los resultados son gracias a los investigadores doctorales Silio Lima de Moura, Arnau Pallares-Rusiñol, Mireia Bernuz, y Rafael da Fonseca Alves, a los investigadores posdoctorales Rosanna Rossi y Luciano Sappia, y a las Dras. Thaisse Gonçalves de Araújo, Maria del Pilar Taboada Sotomayor y Mercè Martí, coinvestigadora de estos estudios. Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España (Proyectos ExoSenS PID2019-106625RB-I00/AEI/10.13039/501100011033, ExoSenSPoC PDC2022-133363, SenS4IVD PID2022-136453OB-I00, AmpliSenS CPP2021-008459) y por EChLiBRiST HORIZON-HLTH-2021-DISEASE-04 y la Generalitat de Catalunya (2021SGR-00124).

Referencias

- [1] R.M. Johnstone, M. Adam, J.R. Hammond, L. Orr, C. Turbide, *J. Biol. Chem.* 262 (19) (1987) 9412–9420.
- [2] M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, C. Théry, *Nat. Cell Biol.* 21 (1) (2019) 9–17.
- [3] M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30 (2014) 255–289.
- [4] A. Pallares-Rusiñol, M. Bernuz, S.L. Moura, C. Fernández-Senac, R. Rossi, M. Martí, M.I. Pividori, *Advances in exosome analysis*, in: G.S. Makowski (Ed.), *Advances in Clinical Chemistry*, Elsevier, 2023,112:69-117. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2022.09.002>.
- [5] A. Lermo, S. Campoy, J. Barbe, S. Hernandez, S. Alegret, M.I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* 22 (9-10) (2007), 2010-2017.
- [6] E. Zacco, J. Adrián, R. Galve, M.P. Marco, S. Alegret, M.I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* 22 (9-10) (2007), 2184-2191.
- [7] M. Bernuz, A. Pallares-Rusiñol, R. Rossi, C. Fernández-Senac, M. Martí, M.I. Pividori, *Magnetic Separation of Cell-Secreted Vesicles with Tailored Magnetic Particles and Downstream Applications*, in: S. Vainio (Ed), *Cell-Secreted Vesicles: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 2668, Springer Nature, 2023. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3203-1_18
- [8] S.L. Moura, C. García Martín, M. Martí, M.I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* 150 (2020) 111882. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111882>.
- [9] S.L. Moura, C. García Martín, M. Martí, M.I. Pividori, *Talanta* 211 (2020) 120657. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120657>.
- [10] L.-C. Tsai, M.-W. Hung, Y.-H. Chen, W.-C. Su, G.-G. Chang, T.-C. Chang *Eur. J. Biochem.* 267 (2000), 1330-1339.
- [11] S.L. Moura, A. Pallares-Rusiñol, L. Sappia, M. Martí, M.I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* 198 (2022) 113826. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113826>.
- [12] M. A. Sanchez, B. Felice, L- Sappia, S.L. Moura, M. Martí, M.I. Pividori. *Materials Science & Engineering C*, 115 (2020) 110931. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110931>
- [13] A. Pallares-Rusiñol, S.L. Moura, M. Martí, M.I. Pividori, *Analytical chemistry* 95 (2023) 2487–2495 <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04773> . Dataset available at CORA RDR repository. <https://doi.org/10.34810/data681>
- [14] R. da Fonseca Alves, A. Pallarès-Rusiñol, R. Rossi, M. Martí, E. Rezende Vaz, T. Gonçalves de Araújo, M.P. Taboada Sotomayor, M.I. Pividori, accepted. (2024).
- [15] A. Cano, M. Ettcheto, M. Bernuz, R. Puerta, E. de Antonio E, E. Sánchez-López, E.B. Souto, A. Camins, M. Martí, M.I. Pividori, M. Boada, A. Ruiz. *International Journal of Biological Sciences* 19(3) (2023) 721-743. <https://www.ijbs.com/v19p0721.htm>
- [16] A. Cano, P. García, M. Bernuz, R. Puerta, I. de Rojas, EE-De Antonio, A. Pérez-Cordón, L. Montreal et al., *Journal of Nanobiotechnology* 2023, 21 (1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01793-7>