

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 571**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 19151220 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2023** **EP 3527670**

54 Título: **Biogénesis de miARN en exosomas para diagnóstico y terapia**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791301 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.04.2024

73 Titular/es:

BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC. (50.0%)

330 Brookline Avenue

Boston, MA 02215, US y

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (50.0%)

72 Inventor/es:

KALLURI, RAGHU y

MELO, SONIA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 966 571 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biogénesis de miARN en exosomas para diagnóstico y terapia

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 La presente invención de refiere en general al campo de biología molecular, oncología y medicina. Más particularmente, hace referencia a métodos para la detección de cáncer mediante su contenido de exosoma único y métodos para terapias mejoradas de inhibición basadas en ARN.

2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 Todas las células se comunican con su entorno a través de varias vías distintas que incluyen factores de crecimiento, citocinas, hormonas, quimiocinas, proteínas unidas a la membrana y lípidos. Los exosomas son capaces de mediar en dichas comunicaciones y lo logran a través de grandes distancias (Mathivanan *et al.*, 2010, Kahlert y Kalluri, 2013). La comunicación a través de exosomas probablemente pueda superar las limitaciones asociadas a la estabilidad y la difusión de factores de crecimiento/citocinas/quimiocinas/hormonas (Mathivanan *et al.*, 2010). Los exosomas son nanovesículas con un tamaño de 30-140 nm que contienen proteínas, ARNm, y microARN (miARN) protegidos por una bicapa lipídica (Cocucci *et al.*, 2009, Simons y Raposo, 2009, Simpson *et al.*, 2008, Thery *et al.*, 2002). Varios estudios recientes demostraron que los exosomas son secretados por múltiples tipos celulares, los que incluyen células cancerosas, células madre, células inmunitarias y neuronas (Simpson *et al.*, 2008, Thery, 2001). Cabe destacar que las células cancerosas secretan más exosomas que las células normales (Taylor y Gercel-Taylor, 2011). Además, aumentan los exosomas en la circulación de los pacientes con cáncer al compararse con sujetos normales (Logozzi *et al.*, 2009, Taylor y Gercel-Taylor, 2008). Sin embargo, sigue sin conocerse un rol funcional. Pruebas recientes sugieren que los exosomas pueden cumplir una función importante en el avance del cáncer y la metástasis (Luga *et al.*, 2012, Peinado *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2011).

- 25 La idea de que los exosomas medien en la transferencia de ARN y miARN entre células aumenta adicionalmente la complejidad de las comunicaciones de célula a célula en el cuerpo. La iARN es un proceso biológico natural en las células vivas que participa en el control de la expresión y la actividad génica. En un principio se creía que los miARN extracelulares sólo estaban contenidos en los exosomas (Valadi *et al.*, 2007). Desde entonces, varios informes confirman la existencia de miARN en cuerpos apoptóticos (Zernecke *et al.*, 2009), lipoproteínas de alta y baja densidad (Vickers *et al.*, 2011) (HDL/LDL), vesículas extracelulares grandes, denominadas microvesículas, y se encuentran asociados a AGO2 (Arroyo *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2012, Turchinovich *et al.*, 2011). Sin embargo, un informe reciente sugiere que la mayoría de los miARN detectados en la saliva y el suero humanos se encuentran principalmente concentrados en exosomas (Gallo *et al.*, 2012). La presencia de miARN en exosomas ofrece la posibilidad de regular la expresión génica de células en sitios distantes (Guescini *et al.*, 2010, Valadi *et al.*, 2007, Mittelbrunn *et al.*, 2011, van Balkom *et al.*, 2013). A través de la regulación de la traducción de ARNm, los miARN coordinan la expresiones de conjuntos enteros de genes y dan forma al transcriptoma del organismo (Bartel, 2009).

- 35 Los miARN se encuentran enriquecidos en exosomas derivados de muchos tipos celulares distintos (Valadi *et al.*, 2007). Son ARN no codificantes pequeños de 18-24 nucleótidos (nt) de longitud que controlan postranscripcionalmente la expresión génica. Son sintetizados mediante acciones secuenciales de endonucleasas Drosha y Dicer y se cargan en el RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) para seleccionar los ARNm como dianas (Bartel, 2009; Maniataki y Mourelatos, 2005). En los ratones transgénicos Dicer, la falla en la biosíntesis de miARN resulta en la mortalidad debido a la diferenciación y proliferación de células madre embrionarias defectuosas (Bernstein *et al.*, 2003, Fukagawa *et al.*, 2004).

- 45 Los microARN operan mediante la interacción específica de la secuencia y el apareamiento del RISC asociado a miARN (compuesto de proteínas AGO2, TRBP y Dicer) con los ARNm dianas (Bartel, 2009). En consecuencia, dicha acción inhibe la traducción y/o provoca la desestabilización de ARNm (Filipowicz, 2005). El grado de complementariedad del miARN y su diana ARNm indica el proceso de silenciamiento de ARNm, ya sea a través de la desestabilización/degradación de ARNm o mediante la inhibición de la traducción (Ambros, 2004, Bartel, 2009). Si se observa complementariedad total entre la secuencia ARNm diana y miARN, el complejo RISC actúa para escindir el ARNm unido para su degradación (Ambros, 2004, Bartel, 2009). Si no se observa complementariedad absoluta, como en la mayoría de los casos de miARN en células animales, se impide la traducción para obtener el silenciamiento génico (Ambros, 2004, Bartel, 2009).

- 50 A efectos de que un miARN sea funcional y logre un silenciamiento génico mediado por miARN eficaz, debe formar un complejo con las proteínas Dicer, TRBP y AGO2 del RLC (complejo RISC de carga). En el RLC, las Dicer y TRBP son necesarias para procesar los miARN precursores (pre-miARN), luego de que emergen del núcleo mediante la exportina 5, para generar miARN y asociarse a AGO2. La AGO2 unida al miARN maduro constituye el RISC mínimo y posteriormente puede disociarse de Dicer y TRBP (Chendrimada *et al.*, 2005, Gregory *et al.*, 2005, Haase *et al.*, 2005, MacRae *et al.*, 2008, Maniataki y Mourelatos, 2005, Melo *et al.*, 2009). Los miARN monocatenarios por sí mismos se incorporan al RISC en forma muy escasa y, por lo tanto, no se pueden dirigir eficazmente a su ARNm diana para la regulación postranscripcional (Tang, 2005, Thomson *et al.*, 2013).

Los ARNip sintéticos (bicatenarios) provocan el deterioro de ARNm a través del apareamiento perfecto de bases con sus ARNm dianas (Ambros, 2004, Bartel, 2009). Dichos ARNip son cargados directamente a las proteínas Dicer, TRBP y AGO2 del RISC debido a su naturaleza bicatenaria (Tang, 2005). Un miARN monocatenario no puede incorporarse al RISC y, por lo tanto, no se puede dirigir a su ARNm diana para inhibir la traducción o la degradación (Tang, 2005).

Algunos informes han sugerido que los miARN contenidos en exosomas pueden influenciar la expresión génica en células diana (Ismail *et al.*, 2013, Kogure *et al.*, 2011, Kosaka *et al.*, 2013, Narayanan *et al.*, 2013, Pegtel *et al.*, 2010, Valadi *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2010), pero persiste el cuestionamiento de qué tan eficaces son estos miARN para silenciar el ARNm si no se encuentran incorporados al RISC como pre-miARN para el reconocimiento adecuado del ARNm y la detención eficaz de la traducción. Mientras que los miARN (monocatenarios) no se pueden asociar al RISC de células diana, los pre-miARN de exosomas pueden, en cierta medida, inducir el silenciamiento génico al cooptar las proteínas de RISC de las células diana. No obstante, dicho proceso es altamente ineficaz y lento debido al posible estado saturado de las proteínas implicadas en la vía de biogénesis del miARN de las células diana. Un informe reciente mostró la presencia de Drosha y Dicer en exosomas de sobrenadantes del cultivo celular de células infectadas con VIH-1 y suero de pacientes con VIH (Narayanan *et al.*, 2013). De manera adicional, otro estudio mostró el fraccionamiento conjunto de Dicer, TRBP y AGO2 en endosomas tardíos/MVB (cuerpo multivesicular) (Shen *et al.*, 2013). El documento WO2011/133504 describe nanozimas, métodos para producir nanozimas, métodos para usar nanozimas, y similares. Ramachandran *et al.*, Wiley Interdiscip Rev RNA. 2012 Mar-Apr;3(2):286-93 describen las características de los exosomas, centrándose específicamente en su papel en la transferencia horizontal de información celular. El documento WO2010/056337 describe un método para caracterizar un fenotipo en un sujeto que comprende: i) determinar una biofirma de uno o más exosomas en una muestra biológica de dicho sujeto; y ii) caracterizar un fenotipo en dicho sujeto basándose en dicha biofirma. El documento WO2009/015357 describe métodos de diagnóstico de cáncer o resultados adversos del embarazo en un sujeto midiendo cantidades de uno o más microARNs presentes en exosomas derivados de cáncer aislados de una muestra biológica del sujeto. Rottiers y Naar, Nat Rev Mol Cell Biol. 22 de marzo de 2012; 13 (4): 239-50, describen las posibles funciones de los miARN en el control del colesterol y la homeostasis de los lípidos. Melo *et al.*, Cancer Cell. 2014 Nov 10;26(5):707-21, describen que los exosomas asociados al cáncer de mama contienen microARNd (miARNs) asociados con el complejo RISC de carga (RLC) y muestran capacidad independiente de las células para procesar microARN precursores (pre-miARN) en miARNs maduros. El documento WO2013/022995 describe métodos y composiciones para caracterizar un fenotipo mediante el análisis de biomarcadores circulantes, tales como una vesícula, un microARN o una proteína presente en una muestra biológica. El documento WO2012/125471 describe composiciones que comprenden exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC), y métodos para su uso en sujetos que padecen determinadas enfermedades pulmonares, incluida la enfermedad pulmonar inflamatoria. El documento WO2009/147519 describe un método para determinar las tasas de administración y/o la eficiencia de un ARNip, miARN o molécula relacionada a órganos o células diana. Tagami *et al.*, Drug Deliv Transl Res. Agosto 2011;1(4):277-88, describen que la supresión del gen Ago2 puede ser útil para la inhibición de la progresión del cáncer.

Sumario de la invención

Los exosomas secretados por células cancerosas son únicos con relación a exosomas no cancerosos, dichos exosomas del cáncer comprenden un repertorio único de miARN así como también complejos RISC de procesamiento de ARN activo. Tales complejos de RISC y ARN encapsulado también podrían ser utilizados para la biogénesis de miARN independiente de la célula y el silenciamiento de ARNm altamente eficaz en células diana.

En una realización, la presente divulgación provee un método para la detección de un biomarcador de cáncer en un sujeto que comprende (a) la obtención de una muestra biológica del sujeto, (b) la medición del nivel de (i) uno o más miARN seleccionados de los miARN provistos en la Tabla 5 en una fracción de exosoma de la muestra, (ii) un miARN precursor, (iii) una proteína de RISC en una fracción de exosoma de la muestra o (iv) una actividad de procesamiento de miARN (por ejemplo, actividad de procesamiento de miARN primario y/o miARN precursor) en una fracción de exosoma de la muestra y (c) la identificación del sujeto con un biomarcador de cáncer o sin él, según el nivel medido de dicho miARN, miARN precursor, proteína de RISC o actividad de procesamiento de miARN. En algunos aspectos, el método comprende la medición del nivel de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de dichos miARN. En aspectos adicionales, el método comprende la medición del nivel de la proteína DICER, TRBP, o AGO2.

En algunos aspectos, la muestra biológica se encuentra esencialmente libre de células. Por ejemplo, la muestra puede tener menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 célula. En un aspecto, la muestra biológica no contiene células. En determinados aspectos, la muestra biológica puede ser una muestra de ganglio linfático, saliva, orina o sangre (por ejemplo, plasma). En un aspecto adicional, el método puede incluir adicionalmente la purificación de una fracción de exosoma de la muestra y/o el incremento de la producción de una fracción de exosoma de la muestra.

En determinados aspectos, el cáncer es un cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de tráquea, cáncer de cerebro, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de ovarios, cáncer de útero, cáncer de cuello de útero, cáncer de testículos, cáncer de colon, cáncer de recto o cáncer de piel. En determinados aspectos, el cáncer es un cáncer de mama. En un aspecto, el sujeto ha sido previamente tratado por un cáncer o previamente se le ha extraído un tumor quirúrgicamente.

- En algunos aspectos, la identificación de que el sujeto tiene un biomarcador de cáncer o no lo tiene comprende adicionalmente la correlación del nivel o los niveles medidos de miARN, el nivel de miARN precursor, el nivel de RISC o la actividad de procesamiento de miARN con riesgo de cáncer. En un aspecto adicional, la identificación de que el sujeto tiene un biomarcador de cáncer o no lo tiene comprende adicionalmente el análisis del nivel o los niveles de miARN precursor, el nivel de miARN precursor, el nivel de RISC o la actividad de procesamiento de miARN con un algoritmo. En algunos casos, se puede llevar a cabo un análisis con un ordenador.
- En determinados aspectos, el método de las realizaciones comprende adicionalmente la medición del nivel bien sea de (i) uno o más miARN seleccionados de los miARN provistos en la Tabla 5 en una fracción de exosoma de la muestra y una muestra de referencia, (ii) miARN precursor, (iii) una proteína de RISC en una fracción de exosoma de la muestra y una muestra de referencia o (iv) una actividad de procesamiento de miARN en una fracción de exosoma de la muestra y una muestra de referencia y (c) la identificación de que el sujeto tiene un biomarcador de cáncer o no lo tiene mediante la comparación del nivel de miARN, un miARN precursor, un RISC o actividad de procesamiento de miARN en la muestra del sujeto con el nivel de miARN, un miARN precursor, un RISC o actividad de procesamiento de miARN en la muestra de referencia.
- En algunos aspectos, la medición de los niveles de proteína de RISC comprende llevar a cabo un ensayo de transferencia Western, ELISA o unión a un arreglo de anticuerpos. En otros aspectos, la medición de los niveles de miARN comprende la medición de los niveles de miARN procesados. En algunos casos, la medición de los niveles de miARN comprende llevar a cabo análisis de RT-PCR, transferencia de Northern o hibridación de arreglo.
- En algunos aspectos, el método comprende adicionalmente informar si el sujeto cuenta con un biomarcador de cáncer o no. La realización del informe puede comprender la preparación de un informe por escrito, oral o electrónico. Por ejemplo, se puede proveer el informe al paciente, un doctor, un hospital o una aseguradora.
- En una realización adicional, la presente divulgación provee un método para el tratamiento de un sujeto que comprende la selección de un sujeto identificado como que tiene un biomarcador de cáncer conforme a las realizaciones y la administración al sujeto de una terapia contra el cáncer. Por ejemplo, el método puede comprender (a) la obtención del nivel de (i) uno o más miARN seleccionados de los miARN provistos en la Tabla 5, (ii) un miARN precursor, (ii) una proteína de RISC o (iii) una actividad de procesamiento de miARN, en una fracción de exosoma de una muestra del sujeto, (b) la selección de un sujeto con un biomarcador de cáncer según el nivel de dicho miARN, miARN precursor, proteína de RISC o actividad de procesamiento de miARN y (c) el tratamiento del sujeto seleccionado con una terapia contra el cáncer. En determinados aspectos, la terapia contra el cáncer es una quimioterapia, una terapia de radiación, una terapia hormonal, una terapia dirigida, una inmunoterapia o una terapia quirúrgica.
- En una realización adicional, la presente divulgación provee un método de selección de un sujeto para un procedimiento de diagnóstico que comprende (a) la obtención del nivel de ya sea (i) uno o más miARN seleccionados de los miARN provistos en la Tabla 5, (ii) un nivel de miARN precursor, (iii) una proteína de RISC o (iv) una actividad de procesamiento de miARN, en una fracción de exosoma de una muestra del sujeto, (b) la selección de un sujeto con un biomarcador de cáncer según el nivel de dicho mARN, proteína de RISC o actividad de procesamiento de miARN y (c) la realización de un procedimiento de diagnóstico en el sujeto. En un aspecto, el procedimiento de diagnóstico comprende imagenología de diagnóstico. La imagenología puede ser una biopsia, imagenología de rayos X, TC, IRM o TEP.
- En aun otra realización, la presente divulgación provee un medio tangible legible por ordenador que comprende un código legible por ordenador que, al ser ejecutado por un ordenador, provoca que el ordenador realice operaciones que comprenden (a) recibir información correspondiente a un nivel de ya sea (i) uno o más miARN seleccionados de los miARN provistos en la Tabla 5, (ii) un miARN precursor, (iii) una proteína de RISC o (iv) una actividad de procesamiento de miARN en una fracción de exosoma de una muestra del sujeto y (b) determinar un nivel relativo de uno o más de dichos miARN, miARN precursor, proteínas de RISC o una actividad de procesamiento de miARN comparado con un nivel de referencia en el que el nivel alterado comparado con un nivel de referencia indica que el sujeto tiene un biomarcador de cáncer.
- En determinados aspectos, la operación de los medios tangibles legibles por ordenador comprende adicionalmente la recepción de información correspondiente al nivel de referencia de (i) uno o más miARN seleccionados de los miARN provistos en la Tabla 5, (ii) un miARN precursor, (iii) una proteína de RISC o (iv) una actividad de procesamiento de miARN en una fracción de exosoma de un sujeto que no tiene cáncer.
- En determinados aspectos, el medio tangible legible por ordenador comprende adicionalmente un código legible por ordenador que, cuando es ejecutado por un ordenador, hace que el ordenador lleve a cabo una o más operaciones adicionales que comprenden: enviar información correspondiente al nivel relativo de miARN, un miARN precursor, una proteína de RISC o una actividad de procesamiento de miARN a un dispositivo tangible de almacenamiento de datos.
- En un aspecto adicional, se almacena el nivel de referencia en dicho medio tangible legible por ordenador. En un aspecto, la recepción de información comprende la recepción de información desde un dispositivo tangible de almacenamiento de datos correspondiente a un nivel de miARN, un nivel de miARN precursor, una proteína de RISC o actividad de procesamiento de miARN en una muestra de un sujeto. En algunos aspectos, la recepción de

información comprende además la recepción de información correspondiente a un nivel de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 de dichos miARN en una muestra de un sujeto.

En algunos aspectos, el código legible por ordenador, cuando es ejecutado por un ordenador, hace que el ordenador realice operaciones que comprenden adicionalmente (c) calcular un puntaje de diagnóstico para la muestra, en las que el puntaje de diagnóstico es un indicio de la probabilidad de que la muestra sea de un paciente con cáncer.

En una realización adicional, la presente divulgación provee un método de detección del biomarcador de cáncer en un sujeto que comprende (a) obtener una muestra biológica del sujeto, (b) medir el nivel de uno o más miARN en la muestra seleccionada del miARN provisto en la Tabla 5 o un miARN precursor de este y (c) identificar el sujeto que tiene el biomarcador de cáncer o que no lo tiene según el nivel medido de dicho miARN. En un aspecto, la muestra biológica se encuentra esencialmente libre de células. En determinados aspectos, la muestra biológica puede ser una muestra de ganglio linfático, saliva, orina o plasma. En un aspecto, el método puede comprender adicionalmente la purificación de una fracción de exosoma de un fluido corporal.

Determinados aspectos de las realizaciones tal como se detallaron previamente hacen referencia a la medición de un nivel de uno o más miARN (o miARN precursor) en una fracción de exosoma de una muestra seleccionada de aquellas provistas en la Tabla 5. Por ejemplo, un método puede comprender la medición de un nivel de uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en mmu-miR-709, hsa-miR-1308, mmu-miR-615-3p, hsa-miR-1260b, mmu-miR-1937a, mmu-mir-321-A, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-1979, mmu-miR-1937b, hsa-mir-373, mmu-miR-1937c, hsa-miR-1273d-P, mmu-miR-720, mmu-miR-1274a, hsa-mir-565-A, mmu-miR-1931, hsa-miR-1246, hsa-mir-594-P, hsa-mir-321-A, mmu-miR-2145-1-P, hsa-mir-639-P, hsa-miR-720, hsa-miR-1280, mmu-miR-3473, hsa-miR-1260, hsa-miR-1281, mmu-miR-1224-P, mmu-miR-690, hsa-miR-375-P, hsa-miR-4301, mmu-miR-700, mmu-miR-125b-5p, mmu-miR-1191-P, hsa-miR-1274a, hsa-miR-3197, mmu-miR-1935, hsa-miR-1975-P, hsa-miR-4324, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-1274b, mmu-miR-1957, hsa-miR-933, hsa-mir-675, hsa-miR-595, mmu-miR-2137, hsa-mir-572-P, mmu-miR-1195, hsa-miR-4294-P, mmu-mir-1899-P, mmu-miR-689-P, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-3117-P, mmu-mir-321-P, mmu-miR-1961-P, hsa-mir-10a, mmu-miR-669d-P, mmu-miR-1937b-2-P, hsa-miR-3125-P, mmu-miR-1934-P, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-718, mmu-miR-1198, mmu-miR-2182-P, hsa-miR-1273, mmu-miR-2133-P, hsa-miR-92b*, hsa-miR-1290, hsa-miR-448, mmu-miR-689, mmu-miR-449a, mmu-miR-1937b-4-P, hsa-miR-4286, mmu-miR-1947, mmu-miR-342-3p, hsa-miR-1303-P, mmu-miR-2132, hsa-miR-4321-P, hsa-miR-4256-P, hsa-miR-4311, mmu-miR-130a, mmu-miR-1939, hsa-miR-1268-P, mmu-miR-31, mmu-miR-99b, mmu-miR-2141, hsa-miR-1202-P, mmu-miR-466b-3p, mmu-miR-2133, hsa-miR-1268, hsa-miR-466, mmu-miR-494, hsa-miR-1289, hsa-miR-320b, hsa-miR-4254, hsa-mir-7-3-P, hsa-miR-923, hsa-miR-764, mmu-miR-291a-3p, mmu-miR-883b-3p, hsa-mir-594-A, mmu-miR-1948-P, hsa-miR-206, hsa-mir-565-P, mmu-miR-467e*, hsa-miR-1826, mmu-miR-467a*, mmu-miR-1983, hsa-miR-324-5p, mmu-let-7c, mmu-miR-1965, hsa-mir-632-P, hsa-miR-181a*MM2GT/AC, hsa-miR-1265, hsa-miR-323b-5p, hsa-mir-1914, hsa-mir-1910, hsa-miR-21, hsa-miR-431*, hsa-miR-3135-P, mmu-miR-187-P, mmu-miR-126-3p, mmu-miR-669a-P, hsa-miR-367, mmu-mir-320-P, hsa-miR-181a*MM1G/C, mmu-miR-484-P, mmu-miR-467c-P, hsa-miR-3154, mmu-miR-466d-3p, hsa-miR-3162-P, mmu-miR-201, mmu-miR-1946a, hsa-miR-937, hsa-miR-3147, hsa-mir-596-P, hsa-miR-3148, hsa-miR-1304, hsa-miR-222MM2GG/AC, mmu-miR-125a-5p, hsa-miR-1272-P, hsa-miR-638, hsa-mir-320, hsa-miR-545*, hsa-mir-1908-P, hsa-let-7d-v2-P, mmu-mir-30d-P, hsa-miR-4297, mmu-miR-182, hsa-miR-3166-P, hsa-miR-494, mmu-miR-669o-P, hsa-miR-566, mmu-miR-1188, mmu-miR-2134-AP, hsa-miR-4259-P, mmu-miR-152, mmu-miR-2134, hsa-miR-3193-AP, hsa-miR-125b, hsa-miR-3124-P, hsa-miR-10b, hsa-miR-455-5p, mmu-miR-144, hsa-miR-130a, hsa-miR-1285, hsa-miR-516b*, hsa-miR-27a, hsa-miR-138-1*, mmu-miR-471, hsa-miR-4298-P, hsa-miR-301b, hsa-mir-147-P, hsa-miR-362-5p, mmu-mir-471-P, mmu-miR-466a-3p, hsa-miR-561, hsa-miR-486-5p, mmu-miR-2861, hsa-miR-587, mmu-miR-375, hsa-mir-329-2-P, mmu-miR-2861-P, hsa-miR-144*, hsa-miR-1255a-P, hsa-mir-519a-2-P, hsa-miR-34c-5p, mmu-miR-466e-3p, mmu-miR-743b-5p, mmu-mir-350-P, mmu-miR-181d, hsa-miR-376a*, hsa-miR-1308-P, mmu-miR-467g, mmu-miR-1946a-P, hsa-miR-147-P, hsa-miR-923-P, mmu-miR-465c-5p, hsa-miR-891a, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-4292, mmu-miR-677-P, hsa-miR-4257, hsa-miR-4326, hsa-miR-17*MM2GG/AA, hsa-miR-939-P, mmu-miR-2182, hsa-miR-220c-P, hsa-miR-3132-P, hsa-miR-532-5p, mmu-miR-1947-P, mmu-miR-29a, hsa-miR-3162, hsa-miR-375MM1C/G, hsa-miR-768-3p, mmu-miR-182-P, mmu-miR-205-P, hsa-miR-505, hsa-miR-3146-P, mmu-miR-721, mmu-miR-376c, hsa-miR-1179-P, mmu-miR-1970, hsa-miR-3133-P, hsa-miR-200c, hsa-miR-220a, mmu-miR-100, hsa-miR-1255b, hsa-miR-222MM1G/A, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-517b, hsa-miR-200a, hsa-miR-3141, mmu-miR-669h-3p, hsa-miR-1301, hsa-miR-877, hsa-mir-941-2, hsa-mir-487b-P, hsa-miR-4302, hsa-miR-99b, hsa-miR-1253, hsa-let-7a*, hsa-miR-34aMM2CT/TC, hsa-miR-3181-P, hsa-miR-3200, hsa-miR-3129-P, hsa-miR-93*, hsa-miR-548g-P, mmu-miR-466g, mmu-miR-155, hsa-miR-2278-P, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-633, hsa-miR-4265, mmu-miR-2135-P, hsa-miR-190, mmu-miR-669f, hsa-miR-1323, hsa-miR-588, mmu-miR-183*, hsa-mir-941-4, hsa-mir-1913, hsa-miR-2116*, hsa-miR-1178, mmu-miR-196a, mmu-miR-574-3p, hsa-miR-346, mmu-miR-1199, mmu-miR-681, hsa-miR-4292-P, hsa-miR-522, hsa-mir-611-P, hsa-miR-3171, hsa-miR-635, hsa-miR-1197-P, hsa-miR-604, mmu-let-7a*, hsa-miR-335, mmu-miR-466c-3p, mmu-miR-466i, hsa-miR-1297, mmu-miR-338-5p, hsa-mir-526a-2-P, hsa-miR-181aMM2GC/AG, hsa-miR-18, hsa-miR-924-P, mmu-miR-190-P, hsa-miR-345, mmu-miR-711, hsa-miR-3116-2-P, hsa-miR-99a, mmu-miR-26a, hsa-miR-1248-P, mmu-miR-721-P, mmu-miR-801-P, hsa-miR-1826-P, hsa-miR-1236, hsa-miR-339-5p, mmu-miR-804, mmu-miR-467d*, mmu-miR-1191, hsa-miR-148a, hsa-miR-141, mmu-miR-1937a-P, mmu-miR-696 y hsa-miR-302a (es decir, aquellos enumerados en la Tabla 5).

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva, “un” o “uno/a” puede significar uno o más. Tal como se utilizan en la o las reivindicaciones, cuando se utilizan junto con la expresión “que comprende”, las palabras “un” o “uno/a” pueden

significar uno o más de uno.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se emplea para hacer referencia a “y/o”, a menos que se indique expresamente que hace referencia solamente a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la descripción respalda una definición que hace referencia solamente a alternativas y a “y/o”. Tal como se utiliza en la presente, “otro” puede significar al menos un segundo o más.

En toda la solicitud, la expresión “alrededor de” se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se utiliza para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

Otros objetos, características y beneficios de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debería tenerse en cuenta que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se brindan únicamente a modo de ejemplo, ya que varios cambios y modificaciones comprendidos por el espíritu y alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La patente o solicitud contiene al menos una figura en color. Si se solicitara y luego de efectuado el pago de la tasa necesaria, la oficina entregará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con la o las figuras en color. La invención puede entenderse de mejor forma mediante referencia a uno o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas que se presentan en la presente.

Figuras 1A-F. Caracterización de exosomas – Los oncosomas se encuentran enriquecidos en miARN oncogénicos en comparación con normosomas. (A) Micrografía electrónica de transmisión de oncosomas (foto superior izquierda y foto inferior izquierda y recuadro con zoom, las líneas punteadas ilustran el área del zoom). Las imágenes de la parte inferior derecha producidas por marcaje con inmunorojo con anticuerpo antiCD9 y el microscopio electrónico de transmisión. Las partículas de oro son ilustradas como puntos negros. La gráfica representa el tamaño promedio de preparaciones de exosomas analizadas a partir de 112 imágenes de TEM. (B) Imagen de microscopio de fuerza atómica de exosomas de células de cáncer de mama. La gráfica del centro representa la dispersión de partículas en el cubreobjetos con el intervalo de tamaño de exosomas. La gráfica a la derecha representa el tamaño promedio de preparaciones de exosomas analizadas a partir de 26 imágenes de AFM. (C) Inmunotransferencia con el anticuerpo anti-Dicer en exosomas cultivados a partir de: líneas celulares humanas (MCF10A) y de ratón (NMuMG) no tumorigénicas (transferencia de la izquierda, primer panel), líneas celulares de cáncer de ratón 67NR y 4T1 (transferencia del centro, primer panel), líneas celulares de cáncer humanas MCF7 y MDA-MB231 (transferencia de la derecha, primer panel). Los controles utilizados fueron: exosomas tratados con TritonX seguido de proteinasa K (Triton + PK) para inducir la lisis de exosomas y la posterior degradación de proteínas exosomales, exosomas tratados con proteinasa K para degradar proteínas extraexosomales (PK), sobrenadante luego de la ultracentrifugación para el cultivo de exosomas (Sobrenadante). Se utilizaron las inmunotransferencias de TSG101 (segunda fila) y CD9 (tercera fila) para confirmar la presencia de exosomas. (D) Análisis de citometría de flujo con marcadores de exosomas TSG101, CD9, flotilina-1 y anticuerpos CD63 de exosomas derivados de MDA-MB231 acoplados a microesferas de 0.4 μm . (E) Dimensionamiento de exosomas con espectroscopía de dispersión de luz (LSS). Se llevó a cabo la calibración del sistema mediante señales de suspensiones en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) de microesferas de cristal con diámetros nominales de 24 nm y 100 nm y microesferas de poliestireno con diámetros nominales de 119 nm, 175 nm, 356 nm y 457 nm. En la gráfica de la izquierda se ilustran los espectros experimentales y los ajustes resultantes para microesferas de cristal con diámetro nominal de 100 nm y microesferas de poliestireno con diámetro nominal de 356 nm. La gráfica de la derecha representa la medición del tamaño de una suspensión en PBS de exosomas de cáncer. El recuadro muestra la misma gráfica con una escala de hasta 10 μm para excluir la posible contaminación de las preparaciones de exosomas con células y desechos celulares. (F) Distribución del tamaño de exosomas con NanoSight. La gráfica de la izquierda representa la distribución de tamaño de partículas en una solución que muestra un tamaño promedio de 105 nm y que no presenta picos en tamaños mayores. La gráfica de la derecha representa la distribución por tamaño y la concentración de partículas en una solución con NanoSight. Los datos representados en esta figura son el resultado de tres experimentos independientes cada uno con tres replicaciones y se representan como \pm s.d.

Figuras 2A-F. Los oncosomas se enriquecen en miARN. (A) Gráfica de correlación de miARN expresados en exosomas de MDA-MB231 y en exosomas de MCF10A. (B) Gráficas de correlación de miARN en células y exosomas respectivos con 6 de los miARN expresados en forma diferencial entre normosomas y oncosomas (miR-10a, miR-10b, miR-21, miR-27a, miR-155, y miR-373) luego de 72 horas de cultivo libre de células. (C) Se volvieron a suspender normosomas y oncosomas en el medio DMEM y se mantuvieron en un cultivo libre de células durante 24 y 72 horas. Luego de 24 y 72 horas, se recuperaron los exosomas y se cuantificaron 15 miARN (véase la Tabla 4) con qPCR. Se cuantificó el cambio en veces de cada miARN en exosomas después de 72 horas de cultivo libre de células con relación al mismo miARN en exosomas después de 24 horas de cultivo libre de células. Las gráficas representan un promedio de cambio en veces para los miARN en exosomas supresores de tumores (TS) y oncogénicos (ONC)

cultivados luego de 72 horas en comparación con los cultivados luego de 24 horas. (D) Transferencias Northern de miR-10b y miR-21 de normosomas luego de 24 y 72 horas de cultivo libre de células y oncosomas sin cultivo y con de 24 horas, 72 horas y 96 horas de cultivo libre de células. Se utilizó ARNtMet como control de carga. Se realizó la cuantificación con el software Image J. (E) Gráficas de correlación entre los 15 miARN cuantificados en células MCF10A, MDA-MB231 y 4T1 y sus exosomas respectivos luego de 72 horas de cultivo libre de células. Los oncosomas presentan valores de correlación bajos con su célula de origen (gráficas al centro y a la derecha) cuando se comparan con normosomas (gráfica a la izquierda). (F) Representación gráfica del bioanalizador ilustrada en unidades de fluorescencia (FU) por segundo (s) e imágenes en gel del contenido de ARN en exosomas de normosomas y oncosomas.

Figuras 3A-E. Los exosomas contienen pre-miARN. (A) Se cuantificaron con qPCR 15 pre-miARN correspondientes a los miARN maduros estudiados de los exosomas MCF10A y MDA-MB231. Se graficó el inverso del valor ΔCt para cada pre-miARN con el fin de reflejar su abundancia y los valores se representan como \pm s.d. (B) Se volvieron a suspender los oncosomas y normosomas en el medio DMEM y se mantuvieron en condiciones de cultivo libre de células durante 24 y 72 horas. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron 15 pre-miARN con qPCR. Las gráficas muestran cambios en veces de cada pre-miARN en los exosomas MDA-MB231 y MCF10A luego de 72 horas de cultivo libre de células con relación a 24 horas de cultivo libre de células y se representan como \pm s.d. (C) Transferencias Northern de premiR-10b y pre-miR-21 con los normosomas MCF10A luego de 24 horas y 72 horas de cultivo libre de células, y los oncosomas MDA-MB231 con 0 horas, 24 horas, 72 horas y 96 horas de cultivo libre de células de. Se utilizó ARNtMet como control de carga. Se realizó la cuantificación con el software Image J. (D) Gráficas superiores: Se cuantificaron los pre-miARN oncogénicos (gráfico a la izquierda) y miARN oncogénicos (gráfico a la derecha) de oncosomas (MDA-MB231) luego de 24 horas y 72 horas de condiciones de cultivo libre de células. Se graficó el inverso del valor ΔCt para cada pre-miARN (gráfico a la izquierda) y miARN (gráfico a la derecha) en diferentes momentos para reflejar su abundancia y se notó una tendencia exponencial. Los datos presentados son el resultado de tres replicas biológicas y se representan como SD. Gráficas inferiores: Se cuantificaron los pre-miARN (gráfico a la izquierda) y miARN maduros (gráfico a la derecha) de oncosomas (MDA-MB231) luego de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas de condiciones de cultivo libre de células. Se graficó el inverso del valor ΔCt para cada pre-miARN (gráfico a la izquierda) y miARN (gráfico a la derecha) en diferentes momentos y se notó una tendencia exponencial. Los datos presentados en esta figura son el resultado de tres experimentos independientes, cada uno con tres replicas, y se representan como \pm s.d. (E) Se volvieron a suspender los oncosomas y normosomas en el medio DMEM y se mantuvieron en condiciones de cultivo libre de células durante 0 horas, 24 horas, 72 horas y 96 horas. Se extrajeron exosomas de los distintos momentos y se cuantificaron los pre-miARN con qPCR. Se graficó el inverso del valor ΔCt para cada pre-miARN en diferentes momentos para reflejar su abundancia.

Figuras 4A-N. Los oncosomas contienen proteínas RLC. (A) Inmunotransferencia con el anticuerpo anti-Dicer en exosomas cultivados a partir de: líneas celulares humanas (MCF10A) y de ratón (NMuMG) no tumorígenas, líneas celulares de cáncer de ratón 67NR y 4T1; y líneas celulares de cáncer humanas MCF7 y MDAMB231. Los controles utilizados fueron: exosomas tratados con TritonX seguido del tratamiento de proteinasa K (Triton + PK) para inducir la lisis de exosomas y la posterior degradación de proteínas exosomales y exosomas tratados con proteinasa K para degradar proteínas extraexosomales (PK). Se utilizaron las inmunotransferencias de TSG101 (segunda fila) y CD9 (tercera fila) para confirmar la presencia de exosomas. (B) Micrografía electrónica de transmisión de marcaje con inmunooro que utiliza el anticuerpo anti-Dicer en oncosomas (MDA-MB231). La imagen superior derecha es una ampliación digital de una imagen independiente nueva de la extracción. El control negativo hace referencia a la IgG. Se ilustran las partículas de oro como puntos negros y se señalan con flechas negras en la imagen inferior. La gráfica representa la cuantificación de las dos imágenes superiores de la izquierda. (C) Inmunotransferencia con anticuerpo anti-flag (panel superior) en los exosomas MCF10A y MDA-MB231 cultivados de células transfectadas con el vector vacío (pCMV-Tag4B, primer y tercer carril, respectivamente) y el vector Flag-Dicer (segundo y cuarto carril). Se utilizó la inmunotransferencia de CD9 para confirmar la presencia de exosomas y como control de carga (panel inferior). (D) Inmunotransferencia de Dicer en exosomas cultivados de células MCF10A y MDA-MB231 tratadas con el ionóforo de calcio A23187 (panel superior). Se utilizaron como control los exosomas extraídos de células sin tratar. Se utilizó como control la inmunotransferencia de CD9 (panel inferior) para mostrar la mayor secreción de exosomas. (E) Inmunotransferencia para Dicer en exosomas extraídos de células progenitoras MCF10A y MDA-MB231 y células transfectadas con plásmidos shScramble y shDicer (transferencia superior). Se utilizó inmunotransferencia de CD9 para mostrar la presencia de exosomas y como control de carga (transferencia inferior). Se realizó la cuantificación de inmunotransferencia con el software Image J. (F) Micrografía electrónica de transmisión de marcaje con inmunooro que utiliza el anticuerpo anti-Dicer en oncosomas derivados de células MDAMB231shDicer. Las partículas de oro son ilustradas como puntos negros. La gráfica de la derecha ilustra la cuantificación de partículas de oro en imágenes de EM. (G) Inmunotransferencia con anticuerpo antiAGO2 en exosomas cultivados de oncosomas (MCF7 y MDA-MB231) y normosomas (MCF10A). Los controles utilizados fueron: exosomas tratados con Triton X seguido de proteinasa K (Triton X + PK) para inducir la lisis de exosomas y la posterior degradación de proteínas exosomales, exosomas tratados con proteinasa K para degradar proteínas extraexosomales (PK) y sobrenadante luego de la ultracentrifugación para el cultivo de exosomas (Sobrenadante). Se utilizaron inmunotransferencias de TSG101 (segunda fila) y CD9 (tercera fila) para confirmar la presencia de exosomas. (H) Inmunotransferencia con anticuerpo antiTRBP en exosomas cultivados de oncosomas (MCF7 y MDA-MB231) y normosomas (MCF10A). Se utilizaron los siguientes controles: exosomas tratados con Triton X seguido de proteinasa K (Triton X + PK) para inducir la lisis de

exosomas y la posterior degradación de proteínas exosomales, exosomas tratados con proteinasa K para degradar proteínas extraexosomales (PK) y sobrenadante luego de la ultracentrifugación para el cultivo de exosomas (Sobrenadante). Se utilizaron las inmunotransferencias de TSG101 (segunda fila) y CD9 (tercera fila) como marcadores de exosomas. (I) Inmunotransferencia con anticuerpo antiGFP en células MCF10A y MDA-MB231 transfectadas con plásmido GFP-AGO2 (panel superior). Se utilizó beta actina como control de carga (panel inferior). (J) Inmunotransferencia con anticuerpo antiGFP en exosomas extraídos de células MCF10A y MDA-MB231 transfectadas con plásmido GFP-AGO2 (panel superior). Se utilizaron TSG101 (panel central) y CD9 (panel inferior) como marcadores de exosomas y controles de carga. (K) Expresión de ARNm de AGO2 en las células MCF10A y MDA-MB231 transfectadas con siAGO2. Se utilizaron las células progenitoras MCF10A y MDA-MB231 como control relativo para la comparación de cambios en veces. Los datos son el resultado de tres replicas biológicas y se representan como SD. (L) Inmunotransferencia con anticuerpo AGO2 en exosomas extraídos de células progenitoras MCF10A y MDA-MB231 o células transfectadas con sicontrol o siAGO2 (panel superior). Se utilizaron TSG101 (transferencia central) y CD9 (transferencia inferior) como marcadores de exosomas y controles de carga. Se realizó la cuantificación con el software Image J. (M) Inmunotransferencia con anticuerpo AGO2 en proteínas exosomales extraídas de células MCF10A y MDA-MB231 inmunoprecipitadas con anticuerpo Dicer o IgG (panel superior). Se utilizó como control 5 % del aporte lisado de exosomas extraídos de células MDA-MB231. Se utilizó la inmunotransferencia de Dicer como control para la inmunoprecipitación (panel inferior). (N) Inmunotransferencia con anticuerpo antiTRBP en proteínas exosomales extraídas de células MCF10A y MDA-MB231 inmunoprecipitadas con anticuerpo Dicer o IgG (panel superior). Se utilizó como control el aporte lisado de exosomas (5 %) extraídos de células MDA-MB231. Se utilizó la inmunotransferencia de Dicer como control (panel inferior).

Figuras 5A-E. Los oncosomas procesan pre-miARN para generar miARN maduros. (A) Se cultivaron exosomas de células MCF10A, MCF10A shScramble, MCF10A shDicer (gráfica superior), células MDA-MB231, MDA-MB231 shScramble y MDA-MB231 shDicer (gráfica inferior) y se mantuvieron en condiciones de cultivo libre de células durante 24 y 72 horas. Luego de 24 y 72 horas, se recuperaron los exosomas y se cuantificaron 15 pre-miARN con qPCR. Las gráficas muestran los cambios en veces de cada pre-miARN en los distintos exosomas luego de 72 horas de cultivo libre de células con relación al cultivo libre de células de 24 horas y se representan como \pm s.d. (B) Se cultivaron exosomas de células MCF10A, MCF10A shScramble, MCF10A shDicer (gráfica superior), células MDA-MB231, MDA-MB231 shScramble y MDA-MB231 shDicer (gráfica inferior) y se mantuvieron en condiciones de cultivo libre de células durante 24 y 72 horas. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron 15 miARN con qPCR. Las gráficas muestran los cambios en veces de cada miARN en los distintos exosomas luego de 72 horas de cultivo libre de células con relación a de 24 horas de cultivo libre de células y se representan como \pm s.d. (C) Inmunotransferencia con anticuerpo anticonejo y antirratón secundario para detectar el anticuerpo Dicer primario de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) y el anticuerpo de actina primario sometidos a electroporación en exosomas de células MDA-MB231. Se utilizaron como control negativo exosomas sometidos a electroporación sin anticuerpos derivados de células MDA-MB231. Los tratamientos con proteínasa K fueron realizados después de la electroporación para garantizar la reducción de anticuerpos no incluidos en los exosomas. (D) Se cultivaron los oncosomas (MDA-MB231) por duplicado (gráfica inferior) o cuadruplicado (gráfica superior). Las muestras se sometieron a electroporación con anticuerpo anti-Dicer, anticuerpo antiactina, o anticuerpo antiTRBP. Se dejaron las muestras más el control durante 24 y 72 horas en condiciones de cultivo libre de células. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron los 6 pre-miARN oncogénicos (gráfico superior) o los 15 pre-miARN (gráfico inferior) con qPCR. Se cuantificó el cambio en veces de cada pre-miARN en exosomas después de 72 horas de cultivo libre de células con relación al mismo pre-miARN en exosomas después de 24 horas de cultivo libre de células en cada muestra. Las gráficas representan un cambio en veces promedio para los pre-miARN (en la gráfica inferior - TS = supresor tumoral, ONC = oncogénico) en exosomas de 72 horas con relación a exosomas de 24 horas y se representan como \pm s.d. (E) Se cultivaron los oncosomas (MDAMB231) por cuadruplicado (gráfica superior) o duplicado (gráfica inferior). Las muestras se sometieron a electroporación con anticuerpo anti-Dicer, anticuerpo antiactina, o anticuerpo antiTRBP. Se dejaron las muestras más el control durante 24 y 72 horas en condiciones de cultivo libre de células. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron los 6 miARN oncogénicos (gráfico superior) o los 15 miARN (gráfico inferior) con qPCR. Se cuantificó el cambio en veces de cada miARN en exosomas luego de 72 horas de cultivo libre de células con relación al mismo miARN en exosomas luego de 24 horas de cultivo libre de células en cada muestra. Las gráficas representan un cambio en veces promedio para los miARN (en la gráfica inferior - TS = supresor tumoral, ONC = oncogénico) en exosomas de 72 horas con relación a exosomas de 24 horas y se representan como \pm s.d.

Figuras 6A-F. Los oncosomas procesan pre-miARN para generar miARN maduros. (A) Se cultivaron los exosomas de células MDA-MB231 y se sometieron a electroporación con geldanamicina. Se dejaron las muestras en condiciones de cultivo libre de células durante 24 y 72 horas, luego de lo que se extrajeron los exosomas y se cuantificaron los 6 miARN con qPCR. Se cuantificó el cambio en veces de cada miARN en exosomas luego de 72 horas de cultivo libre de células con relación al mismo miARN en exosomas luego de 24 horas de cultivo libre de células en cada muestra. Las gráficas representan el cambio en veces promedio para los miARN en exosomas de 72 horas con relación a exosomas de 24 horas y se representan como \pm s.d. (B) Se sometieron a electroporación los pre-miARN-10b, -21 y -cel-1 en exosomas cultivados de células MCF10A (electrop. MCF10A), MCF10AshDicer (electrop. MCF10AshDicer), MDAMB231 (electrop. MDA-MB231) y MDA-MB231shDicer (electrop. MDAMB231shDicer). Se recuperaron exosomas luego de condiciones de cultivo libre de células durante 72 horas. Se cuantificaron pre-miR-10b, -21 y -cel-1 con qPCR antes y después de 72 horas de electroporación y cultivo. Cada barra en las gráficas muestra el cambio en veces de

pre-miR-10b, -21 y -cel-1 72 horas después de la electroporación con relación a 0 horas después de la electroporación y se representa como \pm s.d. Se utilizaron los exosomas MCF10A y MDA-MB231 sometidos a electroporación en ausencia de pre-miARN como controles para resaltar los niveles basales. (C) Se sometieron a electroporación los pre-miARN -10b, -21 y -cel-1 en exosomas cultivados de células MCF10A (electrop. MCF10A), MCF10AshDicer (electrop. MCF10AshDicer), MDAMB231 (electrop. MDA-MB231) y MDAMB231shDicer (electrop. MDA-MB231shDicer). Se recuperaron exosomas luego de condiciones de cultivo libre de células durante 72 horas. Se cuantificaron MiR-10b, -21 y -cel-1 con qPCR antes y después de 72 horas de electroporación y cultivo. Cada barra en las gráficas muestra el cambio en veces de miR-10b, -21 y -cel-1 72 horas después de la electroporación con relación a 0 horas (gráfico superior) o 24 horas (gráfico inferior) después de la electroporación y se representa como \pm s.d. Se utilizaron los exosomas MCF10A y MDA-MB231 sometidos a electroporación en ausencia de pre-miARN como controles para determinar los niveles basales. (D) Transferencia Northern sin sonda de detección con muestras del ensayo de fragmentación. En el ensayo de fragmentación se utilizaron distintos extractos de proteína exosomales y pre-miR-10b sintética marcada internamente con biotina. Se utilizaron las muestras de exosomas MCF10A, MCF10AshDicer, MDA-MB231 (Exos MDA231), exosomas de MDA-MB231shDicer clon 1 y clon 2 (exos MDA231shDicer 1 y exos MDA231shDicer 2, respectivamente), células MDA-MB231shDicer y exosomas MDA-MB231 sometidos a electroporación con el anticuerpo Dicer (exos MDA231 + Dicer AB). (E) Transferencia Northern sin sonda de detección con muestras del ensayo de fragmentación. En el ensayo de fragmentación se utilizaron distintos extractos de proteína exosomales y pre-miR-21 sintética marcada internamente con biotina. Se utilizaron las muestras de exosomas MCF10A, MCF10AshDicer, exosomas MDA-MB231 (Exos MDA231), exosomas de MDA-MB231shDicer clon 1 y clon 2 (exos MDA231shDicer 1 y exos MDA231shDicer 2, respectivamente), células MDA-MB231shDicer y exosomas MDA-MB231 sometidos a electroporación con el anticuerpo Dicer (exos MDA231 + Dicer AB). (F) Transferencia Northern sin sonda de detección con muestras del ensayo de fragmentación. En el ensayo de fragmentación se utilizaron distintos extractos de proteína exosomales y pre-cel-miR-1 sintética marcada internamente con biotina. Se utilizaron las muestras MCF10A, MCF10AshDicer, exosomas MDA-MB231 (Exos MDA231), exosomas MDA-MB231shDicer (exos MDA231shDicer) y exosomas MDAMB231 sometidos a electroporación con el anticuerpo Dicer (exos MDA231 + Dicer AB). Los datos son el resultado de tres replicaciones biológicas y se representan como SD.

Figuras 7A-H. Los oncosomas inducen alteraciones del transcriptoma en células receptoras y formación del tumor en una manera dependiente de Dicer. (A) Inmunotransferencia con anticuerpo antiPTEN y extractos de proteína de células MCF10A tratadas durante 0, 30 minutos, 1 hora, 12 horas y 24 horas con oncosomas MDA-MB231 luego del cultivo libre de células. Se utilizó beta actina como control de carga. (B) Inmunotransferencia con anticuerpo antiHOXD10 y extractos de proteína de células MCF10A tratadas durante 0, 30 minutos, 1 hora, 12 horas y 24 horas con oncosomas MDA-MB231 luego de las condiciones de cultivo libre de células. Se utilizó beta actina como control de carga. (C) Gráfica que muestra la actividad del indicador de luciferasa en células MCF10A transfectadas en forma transitoria con 3'UTR-PTEN-WT, 3'UTRPTEN-Mut, 3'UTR-HOXD10-WT y 3'UTR-HOXD10-Mut y tratadas con oncosomas derivados de células MDA-MB231. (D) Inmunotransferencia con anticuerpo antiPTEN (panel superior) y anticuerpo antiHOXD10 (panel central) y extractos de proteína de células MCF10A tratadas durante 0, 30 minutos, 1 hora, 12 horas y 24 horas con oncosomas MDAMB231 sometidos a electroporación con el anticuerpo Dicer, luego de las condiciones de cultivo libre de células. Se utilizó beta actina como control de carga. (E) Inmunotransferencia con anticuerpo antiSmad4 (panel superior) y extractos de proteína de células MCF10A y células MCF10A tratadas con exosomas MDA-MB231 con anti-miR-182-5p y exosomas MDA-MB231 sin tiempo de cultivo libre de células. Se utilizó beta actina como control de carga. (F) Viabilidad celular medida mediante un ensayo de MTT durante 5 días de cultivo con células MCF10A, células MCF10A tratadas con exosomas MDA-MB231 sin tiempo de cultivo libre de células (MCF10A + exos MDA231), células MCF10A tratadas con exosomas MDA-MB231 con tiempo de cultivo libre de células (cultivo de células MCF10A + exos MDA231) y células MCF10A tratadas con exosomas MDA-MB231 sometidas a electroporación con el anticuerpo Dicer sometido a electroporación con tiempo de cultivo libre de células (células MCF10A + exos MDA231 Dicer AB) y se representan como \pm s.d. * $p=0.0027$. (G) El ensayo de formación de colonias muestra la formación de colonias en la placa de cultivo y se marca con el reactivo MTT luego de 8 días de cultivo con células MCF10A, células MCF10A tratadas con exosomas MDA-MB231 sin tiempo de cultivo libre de células (MCF10A + exos MDA231), células MCF10A tratadas con exosomas MDA-MB231 con tiempo de cultivo libre de células (cultivo de células MCF10A + exos MDA231) y células MCF10A tratadas con exosomas MDA-MB231 sometidas a electroporación con el anticuerpo Dicer con tiempo de cultivo libre de células (células MCF10A + exos MDA231 Dicer AB). (H) Gráfica superior: Se inyectaron ortotópicamente células MCF10A, células MCF10A expuestas a oncosomas MDA-MB-231 (cultivo de células MCF10A + exos MDA231), células MCF10A expuestas a oncosomas MDA-MB231 sometidos a electroporación con anticuerpo Dicer (células MCF10A + exos MDA231 Dicer AB) y células MCF10A expuestas a oncosomas MDAMB231 sometidos a electroporación con anticuerpo Actina (células MCF10A + exos MDA231 Actina AB) en el pániculo mamario de ratones lampiños atímicos. La gráfica ilustra el volumen del tumor en función del tiempo y se representa como \pm s.d. * $p = 0.005$. Gráfica inferior: Se inyectaron ortotópicamente células MCF10A, células MDA-MB231 y células MCF10A expuestas a oncosomas (MDA-MB231) en el pániculo mamario de ratones lampiños atímicos. La gráfica ilustra el volumen tumoral en función del tiempo.

Figuras 8A-I. El suero de pacientes con cáncer de mama contiene Dicer y procesa pre-miARN. (A) Inmunotransferencia con anticuerpo anti-Dicer que reconoce Dicer humano y de ratón, y extractos de proteína de exosomas de suero cultivados de ratón con injertos de tumores humanos (tal como se ilustra en la Figura 18A). OVA1-5 representa injertos de ovario humano, END1-3 representa injertos de endometrio humano y BRST1 y 2 representan injertos de mama humanos. Se utilizaron las células y exosomas 4T1 como control para Dicer murino. El hsa-Dicer representa el peso

molecular de Dicer humano y mmu-Dicer representa el peso molecular de Dicer murino. Véase en la Figura 18D la tinción de Comassie de las membranas como control de carga. (B) El análisis de rastreo de partículas NanoSight muestra la distribución de tamaño de exosomas extraídos del suero de 8 donantes saludables (gráfica a la izquierda) y 11 pacientes con cáncer de mama (gráfica a la derecha). La concentración de muestras se estandarizó para mostrar mejor el tamaño. (C) Micrografía electrónica de transmisión de exosomas cultivados del suero de pacientes con cáncer de mama. (D) Concentración de exosomas del suero de 8 donantes saludables y 11 pacientes con cáncer de mama evaluados mediante análisis de rastreo de partículas NanoSight. * $p=0.012$ (E) Se cultivaron exosomas de suero fresco de 8 donantes saludables y 11 pacientes con cáncer de mama. Se dejaron las muestras extraídas en condiciones de cultivo libre de células durante 24 y 72 horas. Luego de 24 y 72 horas, se recuperaron los exosomas y se cuantificaron 6 pre-miARN con qPCR. Se cuantificó el cambio en veces de cada pre-miARN en exosomas después de 72 horas de cultivo libre de células con relación al mismo pre-miARN en exosomas después de 24 horas de cultivo libre de células en cada muestra. Las gráficas con puntos representan un cambio en veces promedio para los pre-miARN en exosomas de 72 horas con relación a exosomas de 24 horas y se representan como \pm s.d. (F) Se cultivaron exosomas de suero fresco de 8 donantes saludables y 11 pacientes con cáncer de mama. Se dejaron las muestras extraídas en condiciones de cultivo libre de células durante 24 y 72 horas. Luego de 24 y 72 horas, se recuperaron los exosomas y se cuantificaron 6 miARN con qPCR. Se cuantificó el cambio en veces de cada miARN en exosomas luego de 72 horas de cultivo libre de células con relación al mismo miARN en exosomas luego de 24 horas de cultivo libre de células en cada muestra. Las gráficas con puntos representan un cambio en veces promedio para los miARN en exosomas de 72 horas con relación a exosomas de 24 horas. Los paneles E y F son el resultado de tres experimentos independientes, cada uno con tres replicaciones, y se representan como \pm s.d. (G) Se inyectaron células MCF10A, células MCF10A mezcladas con exosomas de donantes saludables (H1-8) y células MCF10A mezcladas con exosomas de pacientes con cáncer de mama (BC1-11) en forma ortotópica en el panículo adiposo mamario de ratones lampiños atímicos. Se calculó la cantidad de exosomas utilizados por peso corporal, lo que refleja la concentración inicial recogida del suero. Las muestras que no han formado un tumor aparecen superpuestas en el eje x de la gráfica. Dicha gráfica ilustra el volumen del tumor en función del tiempo y se representa como \pm s.d. (H) Inmunotransferencias con anticuerpo anti-Dicer y extractos de proteína de exosomas de suero cultivados de 5 individuos saludables (C46, C45, C44, C43 y C41) y 4 carcinomas de cáncer metastásico (Met219, Met354, Met299 y Met356) con transferencia de CD9 como control de carga. (I) Tiempo de duplicación de HDF y HDF tratado con oncosomas (MDA-MB231). * $p=0.0114$. Se realizó la cuantificación mediante inmunotransferencia con el software Image J.

Figuras 9A-B. Dicer se encuentra presente en cuerpos multivesiculares y CD43 citoplasmático desplaza Dicer hacia exosomas. (A) Inmunotransferencia de CD43 en extractos de proteína de células MDA-MB231 inmunoprecipitadas con el anticuerpo Dicer (IP Dicer) o con IgG (panel superior, carriles derecho y central, respectivamente). Se utilizó la inmunotransferencia de Dicer solo como control (panel inferior). (B) Inmunotransferencia de Dicer en extractos de proteína de exosomas derivados de MDA-MB231 y exosomas derivados de MDA-MB231 siCD43. Se utilizó la inmunotransferencia de CD9 como control de carga. Se realizó la cuantificación con el software Image J.

Figuras 10A-E. Caracterización de exosomas. (A) Fotografía de exosomas marcados con PKH26 en el fondo del tubo de ultracentrifugación. El recuadro representa una imagen con ampliación digital de los exosomas. (B) Representación esquemática del sistema experimental utilizado para recoger los espectros de LSS. (C) Viabilidad celular medida mediante ensayo de MTT durante 5 días de cultivo de células MCF10A, NMuMG, MDA-MB231 y 4T1. (D) Análisis de citometría de flujo para yoduro de propidio (PI) y anexina V de células MDA-MB231 y 4T1. Se utilizaron las células MDA-MB231 tratadas con etopósido como control positivo para determinar la apoptosis. (E) Análisis de inmunotransferencia de citocromo C en exosomas con células MDA-MB231 como control positivo y TSG101 como control de carga para exosomas. Los datos presentados en esta figura son el resultado de tres experimentos independientes, cada uno con tres replicaciones, y se representan como \pm s.d.

Figuras 11A-E. Los oncosomas se enriquecen en miARN en comparación con normosomas. (A) La representación gráfica del bioanalizador ilustrada en unidades de fluorescencia (FU) por nucleótidos (nt) (gráficas) e imágenes de gel (imagen a la derecha) del contenido de ARN de líneas celulares mamarias humanas de maMCF10A (no tumorigeno) y MDA-MB231 (cáncer de mama). (B) Se volvieron a suspender exosomas cultivados de células 4T1, MCF10A y MDA-MB231 en el medio DMEM y se mantuvieron en condiciones de cultivo libre de células durante 24 y 72 horas. Luego de 24 y 72 horas, se recuperaron los exosomas y se cuantificaron 15 miARN (véase la Tabla 4) con qPCR. Los gráficos muestran el cambio en veces de cada miARN en oncosomas luego del cultivo libre de células durante 24 horas (gráficas superiores) y 72 horas (gráficas inferiores) con relación a los normosomas luego de 24 horas y 72 horas de cultivo libre de células, respectivamente. Los datos representados son el resultado de tres replicaciones biológicas y se representan como SD. (C) Se cuantificaron 15 miARN maduros (véase la Tabla 4) con qPCR en células MCF10A (gráfica a la izquierda), MDA-MB231 (gráfica del centro) y 4T1 (gráfica a la derecha) y sus respectivos exosomas. Se cuantificó el cambio en veces de cada miARN en exosomas con relación al mismo miARN en células. TS: miARN supresor tumoral, ONC: miARN oncogénicos. Los datos son el resultado de tres replicaciones biológicas y se representan como SD. (D) Se volvieron a suspender exosomas cultivados de células MCF10A, MDA-MB231 y 4T1 en el medio DMEM y se mantuvieron durante 24 y 72 horas en condiciones de cultivo libre de células. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron 15 miARN (véase la Tabla 4) con qPCR. Se cuantificó el cambio en veces de cada miARN en exosomas después de 72 horas de cultivo libre de células con relación al mismo miARN en exosomas después de 24 horas de cultivo libre de células. Los datos corresponden a gráficas detalladas de las gráficas del promedio de cambio en veces en la Figura 2C. Los datos presentados en esta figura son

el resultado de tres experimentos independientes, cada uno con tres replicasiones, y se representan como \pm s.d. (E) Gráficas de correlación entre los 15 miARN cuantificados en células MCF7 y 67NR y sus exosomas respectivos luego del cultivo libre de células de 72 horas.

Figuras 12A-E. Los exosomas contienen pre-miARN. (A) Se cuantificaron 15 pre-miARN que corresponden a miARN maduros cuantificados previamente (véase la Tabla 4) con qPCR en exosomas NMuMG y 4T1. Se graficó el inverso del valor Δ Ct para cada pre-miARN para reflejar su abundancia. Los datos son el resultado de tres replicasiones biológicas y se representan como \pm s.d. (B) Se volvieron a suspender exosomas cultivados de células NMuMG y 4T1 en el medio DMEM y se mantuvieron durante 24 y 72 horas en condiciones de cultivo libre de células. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron 15 pre-miARN con qPCR. Las gráficas muestran cambios en veces de cada pre-miARN en los exosomas NMuMG y 4T1 luego de 72 horas de cultivo libre de células con relación a 24 horas de cultivo libre de células. Los datos son el resultado de tres replicasiones biológicas y se representan como SD. (C) Expresión de ARNm de XPO5 en células MDAMB231 con dos ARNip transfectados en forma transitoria que seleccionan XPO5 como diana en comparación con un cambio en veces para controlar las células. (D) Se transfectaron células MDA-MB231 con construcciones de ARNip de XPO5 y se evaluó la expresión de miR-21 en varios momentos 12 horas después de la transfección (0 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas). A modo de comparación, para mostrar el efecto de períodos prolongados de centrifugación, se centrifugaron células MDA-MB231 transfectadas con construcciones de ARNip de XPO5 a 4 °C durante 3 horas y se volvieron a colocar en el cultivo. Se evaluó la expresión de miR-21 en varios momentos posteriores a la centrifugación (0 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas). Se retrasa el procesamiento de premiR21 en miR-21 en células centrifugadas (barra verde). Los datos presentados en esta figura son el resultado de tres experimentos independientes, cada uno con tres replicasiones, y se representan como \pm s.d. (E) Se volvieron a suspender exosomas cultivados de células NMuMG y 4T1 en el medio DMEM y se mantuvieron en condiciones de cultivo libre de células durante 0, 24, 72 Y 96 horas. Se extrajeron exosomas de los distintos momentos y se cuantificaron los pre-miARN con qPCR. Se graficó el inverso del valor Δ Ct para cada pre-miARN en diferentes momentos para reflejar su abundancia. Los datos son el resultado de tres replicasiones biológicas y se representan como SD.

Figuras 13A-H. Oncosomas que contienen Dicer. (A) Imagen de micrografía electrónica de transmisión producida por marcaje con inmunoro con anticuerpo anti-Dicer (fotos a la derecha) y control negativo (fotos a la izquierda) en exosomas derivados de células MCF10A. Comparación con la Figura 4B para el marcaje positivo con inmunoro de exosomas MDA-MB231. (B) Imagen de micrografía electrónica de transmisión producida por marcaje con inmunoro con anticuerpo antiGFP en exosomas derivados de MDA-MB231. (C) Inmunotransferencia con anticuerpo anti-flag (panel superior) en las células MCF10A y MDAMB231 transfectadas con el vector vacío (pCMV-Tag4B, primer y tercer carril, respectivamente) y el vector Flag-Dicer (segundo y cuarto carril). Se utilizó inmunotransferencia de beta actina como control de carga (panel inferior). (D) Inmunotransferencia con anticuerpo anti-Dicer (panel superior) en células MCF10A, MCF10AshScramble y MCF10AshDicer clones 1 y 2, respectivamente (MCF10AshDicer clon 1 y MCF10AshDicer clon 2). Se utilizó inmunotransferencia de beta actina como control de carga (panel inferior). (E) Inmunotransferencia con anticuerpo anti-Dicer (panel superior) en células MDA-MB231, MDA-MB231shScramble y MDA-MB231shDicer clones 1 y 2, respectivamente (MDA-MB231shDicer clon 1 y MDA-MB231shDicer clon 2). Se utilizó inmunotransferencia de beta actina como control de carga (panel inferior). Se realizó la cuantificación mediante inmunotransferencia con el software Image J. (F) Inmunotransferencia con anticuerpo AGO2 en proteínas exosomales extraídas de células MCF10A y MDA-MB231 inmunoprecipitadas con anticuerpo Dicer o IgG (panel superior). Se utilizó como control 5 % del aporte lisado de exosomas extraídos de células MDA-MB231. Se utilizó la inmunotransferencia de Dicer como control para la inmunoprecipitación (panel inferior). (G) Inmunotransferencia con anticuerpo antiTRBP en proteínas exosomales extraídas de células MCF10A y MDA-MB231 inmunoprecipitadas con anticuerpo Dicer o IgG (panel superior). Se utilizó como control el aporte lisado de exosomas (5 %) extraído de células MDA-MB231. Se utilizó la inmunotransferencia de Dicer como control para la inmunoprecipitación (panel inferior). (H) Inmunotransferencia de Dicer en oncosomas de líneas celulares A549 (cáncer de pulmón humano), SW480 (cáncer de colon humano), HeLa (cáncer de cuello de útero humano) y 4T07 (cáncer de mama murino) (transferencia superior). Se utilizó la inmunotransferencia de TSG101 para confirmar la presencia de exosomas y carga (transferencia inferior).

Figuras 14A-F. Detección de Dicer en exosomas. (A) Inmunotransferencia con anticuerpos anti-Dicer en células 4T1, 4T1shScramble y 4T1shDicer y exosomas cultivados de células 4T1 (exos 4T1) y 4T1shDicer (exos 4T1shDicer) (transferencia superior). Se utilizó inmunotransferencia de GADPH como control de carga (transferencia inferior). Se realizó la cuantificación con el software Image J. (B) Se cultivaron exosomas de células 4T1, 4T1shScramble y 4T1shDicer y se mantuvieron durante 24 y 72 horas en condiciones de cultivo libre de células. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron 15 pre-miARN con qPCR. Las gráficas muestran cambios en veces de cada pre-miARN en los distintos exosomas luego de 72 horas del cultivo libre de células con relación a 24 horas de cultivo libre de células. Los datos son el resultado de tres replicasiones biológicas y se representan como SD. (C) Se cultivaron exosomas de células 4T1, 4T1shScramble y 4T1shDicer y se mantuvieron durante 24 y 72 horas en condiciones de cultivo libre de células. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron 15 miARN con qPCR. Las gráficas muestran cambios en veces de cada miARN en los distintos exosomas luego de 72 horas de cultivo libre de células con relación a 24 horas de cultivo libre de células. Los datos son el resultado de tres replicasiones biológicas y se representan como SD. (D) Se cultivaron exosomas de células MDA-MB231 por duplicado. Una de las muestras se sometió a electroporación con anticuerpo anti-Dicer. Se dejaron las dos

muestras en condiciones de cultivo libre de células durante 24 y 72 horas. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron 15 pre-miARN (véase la Tabla 4) con qPCR. Se cuantificó el cambio en veces de cada pre-miARN en exosomas después de 72 horas de cultivo libre de células con relación al mismo pre-miARN en exosomas después de 24 horas de cultivo libre de células en cada muestra. Las gráficas representan el cambio en veces de pre-miARN en exosomas de 72 horas con relación a exosomas de 24 horas y son un análisis detallado de la gráfica representada en la Figura 5D. Los datos son el resultado de tres replicas biológicas y se representan como SD. (E) Se cultivaron exosomas de células MDA-MB231 por duplicado. Una de las muestras se sometió a electroporación con anticuerpo anti-Dicer. Se dejaron las dos muestras en condiciones de cultivo libre de células durante 24 y 72 horas. Luego de 24 y 72 horas, se volvieron a extraer los exosomas y se cuantificaron 15 miARN (véase la Tabla 4) con qPCR. Se cuantificó el cambio en veces de cada miARN en exosomas después de 72 horas de cultivo libre de células con relación al mismo miARN en exosomas después de 24 horas de cultivo libre de células en cada muestra. Las gráficas representan el cambio en veces de miARN en exosomas de 72 horas con relación a exosomas de 24 horas y son un análisis detallado de la gráfica representada en la Figura 5E. Los datos son el resultado de tres replicas biológicas y se representan como SD. (F) Representación gráfica de las categorías (oncogénico, supresor tumoral y no determinado con relación al cáncer) de los miARN regulados por disminución en exosomas MDA-MB231 sometidos a electroporación con Dicer (exos MDA-MB231 Dicer AB) en comparación con exosomas MDA-MB231 (exos MDA-MB231). Se atribuyeron microARN a cada categoría con base en la bibliografía. Los datos presentados en esta figura son el resultado de tres experimentos independientes, cada uno con tres replicas, y se representan como \pm s.d.

Figuras 15A-C. Detección de Dicer en exosomas. (A) Se cultivaron exosomas de células MCF10, MCF10AshDicer, MDA-MB231 y MDA-MB231shDicer y se sometieron a electroporación con pre-miARN-10b, -21 y -cel-1 sintéticos. Se cuantificó cada pre-miARN con qPCR en los exosomas sometidos a electroporación y se representó como un cambio en veces con relación a exosomas que se sometieron a electroporación únicamente con amortiguador de electroporación. (B) Transferencia dot de biotina marcada internamente pre-miR-21, -10b y -cel-1. (C) Análisis de expresión de miR-10b, -21 y -cel-1 de células MCF10A transfectadas con pre-miR-10b, -21 y -cel-1. Cada barra representa el cambio en veces de las células transfectadas en comparación con las no transfectadas. Los datos presentados en esta figura son el resultado de tres experimentos independientes, cada uno con tres replicas, y se representan como \pm s.d.

Figuras 16A-I. Dicer se encuentra presente en cuerpos multivesiculares y CD43 citoplasmático desplaza dicho Dicer hacia exosomas. (A) La gráfica representa el porcentaje de colocalización en las imágenes confocales como fue cuantificado con el software Image J. (B) La expresión de ARNm de Hrs, TSG101 y BiG2 después de la regulación por disminución con dos ARNip distintos para Hrs y TSG101 y dos clones sh distintos para BiG2. Se utilizaron como control células no transfectadas y shScramble transfectadas. (C) Cuantificación de proteínas mediante ensayo Bradford de exosomas extraídos de MCF10A, MCF10AsiHrs, MDA-MB231 y MDA-MB231siHrs (gráfica a la izquierda), MCF10shScramble, MCF10AshBiG2, MDA-MB231shScramble, MDA-MB231shBiG2 (gráfica del centro) y MCF10AsiTSG101 y MDA-MB231siTSG101 (gráfica de la derecha). Se utilizaron células progenitoras no transfectadas como control relativo para el análisis de cambios expresados en veces. Se normalizaron los datos por cantidad de células y son el resultado de tres replicas biológicas representados como SD. (D) Inmunotransferencia de CD9 en extractos de proteínas exosomales de células MCF10A, MCF10AsiTSG101 (siTSG101), MCF10AsiHrs (siHrs) y MCF10AshBiG2 (shBiG2) (transferencia superior), inmunotransferencia de CD9 en extractos de proteínas exosomales de células MDA-MB231, MDA-MB231siTSG101 (siTSG101), MDA-MB231siHrs (siHrs) y MDA-MB231shBiG2 (shBiG2) (transferencia inferior). (E) Análisis de rastreo de partículas NanoSight de exosomas derivados de MDA-MB231, MDA-MB-231siTSG101, -siHrs y shBiG2 que muestra la regulación por disminución de la cantidad de exosomas en células Hrs, TSG101 y BiG2 reguladas por disminución y la distribución de tamaño esperada de exosomas. (F) Expresión de ARNm de Dicer en células MCF10A, MCF10AshScramble, MCF10AsiHrs, MCF10AshBiG2, MCF10AsiTSG101, MDA-MB231, MDA-MB231shScramble, MDA-MB231siHrs, MDA-MB231shBiG2, MDA-MB231siTSG101, 4T1, 4T1siHrs, 4T1shBiG2 y 4T1siTSG101. Se utilizaron células progenitoras como control relativo para la comparación de cambios expresados en veces. Los datos son el resultado de tres replicas biológicas y se representan como SD. (G) Inmunotransferencia de Dicer en extractos de proteína de células cancerosas MDA-MB231 y 4T1 inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-Dicer (transferencia superior, dos carriles izquierdos) junto con 5 % del aporte que corresponde al lisado de proteína utilizado para la inmunoprecipitación (transferencia superior, dos carriles derechos). Inmunotransferencia de poliubiquitina en extractos de proteína de células MDA-MB231 y 4T1 inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-Dicer (transferencia inferior, dos carriles izquierdos) junto con 5 % del aporte que corresponde al lisado de proteína utilizado para la inmunoprecipitación (transferencia inferior, dos carriles derechos). (H) Expresión de ARNm de CD43 en células MCF10A, MCF10AsiCD43, MDA-MB231 y MDA-MB231siCD43. Se utilizaron las células progenitoras MCF10A y MDA-MB231 como control relativo para la comparación de cambios expresados en veces. Los datos son el resultado de tres replicas biológicas y se representan como SD. (I) Expresión de ARNm de Dicer en células MCF10A, MCF10AsiCD43, MDA-MB231 y MDA-MB231siCD43. Se utilizaron las células progenitoras MCF10A y MDA-MB231 como control relativo para la comparación de cambios expresados en veces. Los datos son el resultado de tres replicas biológicas y se representan como SD.

Figuras 17A-G. Los oncosomas inducen alteraciones del transcriptoma en la recepción de células y formación de tumores en una manera dependiente de Dicer. (A) Análisis de rastreo de partículas NanoSight de exosomas derivados

de células MDA-MB231 CD63-GFP. La línea negra representa una medida de población total de exosomas y la línea verde ilustra la población de exosomas marcada con CD63-GFP mediante Nanosight equipado con un rayo láser de 488 nm. El gris claro y el verde claro representan las barras de error de cada medida. (B) Inmunotransferencia con anticuerpo antiPTEN y extractos de proteína de células MCF10A tratadas durante 0, 30 minutos, 1 hora, 12 horas y 24 horas con oncosomas MDA-MB231 recién extraídos. Se utilizó beta actina como control de carga. (C) Inmunotransferencia con anticuerpo antiHOXD10 y extractos de proteína de células MCF10A tratadas durante 0, 30 minutos, 1 hora, 12 horas y 24 horas con oncosomas MDA-MB231 recién extraídos. Se utilizó beta actina como control de carga. (D) Se transfectaron células MCF10A con ARNip para que XPO5 regule por disminución el flujo de pre-miARN hacia el citoplasma desde el núcleo. Se evaluó el procesamiento de pre-miR15 mediante la medición de niveles de miR-15 conforme al transcurso del tiempo (6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas y 48 horas) en células MCF10AsiXPO5 y células MCF10AsiXPO5 tratadas con exosomas MDA-MB231 con anticuerpo Dicer y sin él. No se observaron cambios significativos. (E) La expresión de miR182-5p se controló en exosomas derivados de MDA-MB231 conforme al transcurso del tiempo (0 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas). Cada barra representa el cambio en veces de cada momento en comparación con 0 horas. No se observaron diferencias significativas. (F) La gráfica provee la cuantificación de cantidades de colonia de la Figura 7G. * p=0.0006. (G) Inmunotransferencia con anticuerpo anti-Dicer y extractos de proteína de células MCF10A tratadas durante 0, 30 minutos, 1, 12 y 24 horas con oncosomas MDA-MB231 sometidos a electroporación con anticuerpo Dicer luego de las condiciones del cultivo libre de células. Se utilizó alfa tubulina como control de carga.

Figuras 18A-D. Los exosomas de pacientes con cáncer de mama contienen Dicer, procesan pre-miARN e ingresan en células en distintos órganos. (A) Fotos representativas de injertos ortotópicos derivados de fragmentos de tumor fresco de ovario humano primario, endometrio y mama en ratones lampiños. (B) Tinción de hematoxilina-eosina (HE) de xenoinjertos ortotópicos de cáncer de ovario, endometrio y mama. (C) Micrografía electrónica de transmisión de exosomas de suero cultivados de ratones con xenoinjertos de tumor ortotópico. (D) Tinción de Comassie de membranas de inmunotransferencias ilustrada en la Figura 8A.

Descripción de realizaciones ilustrativas

El avance del cáncer depende de la comunicación eficaz entre células en el tumor. Los exosomas son nanovesículas secretadas por todos los tipos de célula y contienen proteínas y ácidos nucleicos. Los exosomas secretados por células cancerosas contienen específicamente microARN (miARN) asociados con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, Dicer/TRBP/AGO2) y tienen la capacidad celular autónoma de procesar microARN precursores (pre-miARN) en miARN maduros. La existencia de miARN asociados a RISC, en lugar de miARN sin conjugar, permite un silenciamiento de ARNm muy eficaz y rápido en células diana, lo que altera efectivamente su transcriptoma. Las proteínas de RISC en células cancerosas se dirigen específicamente a cuerpos multivesiculares (MVB) y, posteriormente, a exosomas en una forma dependiente de CD43. Los miARN incorporados en RISC de exosomas estimulan células epiteliales no tumorígenas para formar tumores mediante la inducción específica de vías oncogénicas y activan fibroblastos estromales. Este estudio revela la posible función de los exosomas de cáncer en la inducción del "efecto de campo" oncogénico que subyuga adicionalmente las células normales para que participen en el desarrollo y el avance del cáncer. Además, la biogénesis de miARN puede ocurrir en una manera independiente de la célula en exosomas, lo que ofrece nuevas oportunidades para diseñar terapias dirigidas eficientes mediadas por miARN para innumerables enfermedades.

I. Exosomas derivados del cáncer

Los tumores contienen células cancerosas y elementos estromales (Tse y Kalluri, 2011). Pruebas recientes sugieren que la comunicación entre células de los tumores y sus entornos también determinan la tasa y la intensidad de propagación sistémica del cáncer (Luga *et al.*, 2012). Algunos estudios sugieren que los tumores primarios pueden educar y preparar sitios de tumores secundarios para metástasis futuras mediante factores secretados por la célula cancerosa (Hood *et al.*, 2011, Peinado *et al.*, 2012). Se han identificado varios de dichos mediadores, los que incluyen factores de crecimiento solubles, metabolitos de glucosa, quimiocinas, enzimas, micropartículas, microvesículas, exosomas y ácidos nucleicos libres (Guermónprez *et al.*, 2002, Luga *et al.*, 2012, Peinado *et al.*, 2012, Simons y Raposo, 2009, Thery y Casas, 2002).

En años recientes, se ha observado una gran cantidad de publicaciones relativas a los exosomas y su asociación con el cáncer (Yang y Robbins, 2011). La mayoría de los estudios señalan que las células cancerosas secretan un mayor número de exosomas en comparación con células normales (Yang y Robbins, 2011). Las células cancerosas hipóxicas diseminan más exosomas que las células cancerosas normóxicas (King *et al.*, 2012). Se especula que los exosomas derivados del cáncer transportan cargas útiles específicas de proteínas y ácidos nucleicos que incluyen miARN (Valadi *et al.*, 2007). Aunque son provocativos, dichos estudios no llegan a explicar cómo las proteínas y los miARN pueden inducir cambios funcionales significativos en células diana cercanas o lejanas. La mayoría de los estudios han identificado miARN maduros en exosomas pero, en gran medida, su función es desconocida. Además, los miARN monocatenarios son muy ineficaces en el silenciamiento de ARNm diana sin incorporación de RISC para facilitar el reconocimiento de ARNm. Las proteínas del RLC reconocen el pre-miARN y lo procesan en un dúplex de ARN de 22 nucleótidos. AGO2 selecciona una cadena para el posterior silenciamiento génico, al tiempo que habitualmente la otra cadena se degrada. La reacción global es espontánea y no requiere ningún factor más allá de las tres proteínas y el pre-miARN incorporado (Maniataki y Mourelatos, 2005). Por lo tanto, a efectos de que un miARN sea completamente

funcional, es necesario el procesamiento incorporado a RLC de su pre-miARN y el reconocimiento y silenciamiento de ARNm mediados por AGO.

En la presente, se sondaron los perfiles de miARN de exosomas de células cancerosas (oncosomas) y células de control (normosomas) y se evaluaron las capacidades funcionales de miARN exosomales para lograr el silenciamiento génico y la alteración del transcriptoma de la célula diana. Los oncosomas contienen específicamente Dicer, TRBP y AGO2 como un complejo funcional con la capacidad de procesar pre-miARN en miARN. Los pre-miARN se encontraban presentes en todos los exosomas pero sólo se procesaron en los oncosomas debido a la presencia de RLC. Resulta interesante que existiera una preferencia por la acumulación de pre-miARN/miARN oncogénicos en los oncosomas y esto podría ser meramente un reflejo del contenido de pre-miARN de las células cancerosas, las que generalmente se encontraban enriquecidas con miARN/pre-miARN oncogénicos (Bartels y Tsongalis, 2009, Nicoloso *et al.*, 2009).

Informes previos sugerían la presencia de miARN en exosomas y especulaban sobre su función (Valadi *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2010). Dado que es necesario que los miARN se encuentren presentes en una concentración estequiométrica para el silenciamiento adecuado de ARNm diana, parece poco probable que los exosomas en circulación suministraran concentraciones suficientes de miARN maduros para reprimir el transcriptoma diana. El procesamiento de los pre-miARN originados a partir de exosomas en las células receptoras es un evento improbable debido a que la velocidad de la biogénesis de miARN en células receptoras es limitada no sólo por la cantidad total de pre-miARN disponible para el procesamiento que ya existe dentro de la célula sino también por las cantidades de enzimas requeridas. Por lo tanto, es más eficaz tener miARN maduros que ingresen a las células receptoras para la alteración directa de la expresión génica de forma postranscripcional sin tener que pasar por una vía de procesamiento, tal como sucedería en el caso de que los pre-miARN fueran transferidos a las células receptoras y no los miARN maduros respectivos. La biogénesis de miARN específicos en exosomas soluciona este inconveniente para las células cancerosas. Los oncosomas se enriquecen mucho en un subconjunto de miARN maduros que se asocian a RISC y pueden cumplir una función biológica importante en la formación del fenotipo de células diana.

Además, las células cancerosas sobreexpresan miARN con potencial oncogénico, tal como miR-21 y miR-155, lo que les otorga una ventaja proliferativa y de supervivencia y se encuentran asociadas a la etapa clínica avanzada, de metástasis y de pronóstico desfavorable (Yan *et al.*, 2008). También se ha informado previamente que estos miARN se sobreexpresan en la circulación de pacientes con cáncer (Mao *et al.*, 2013). La síntesis de miARN en células es una reacción enzimática y, por lo tanto, depende de la cantidad de enzimas claves, tales como Dicer, presentes en su citoplasma. Se ha descrito el Dicer como regulado por disminución en tumores y células de cáncer de mama (Grellet *et al.*, 2009, Martello *et al.*, 2010). Por lo tanto, la cantidad de miARN que pueden ser sintetizadas por estas células cancerosas es limitada. Debido a que la producción de exosomas es un proceso continuo, se crea la hipótesis de que las células cancerosas empaquetan pre-miARN específicos con proteínas de RLC para permitir el enriquecimiento del miARN maduro en exosomas y, al mismo tiempo, mantener estos miARN regulados por aumento en las células de origen. Los oncosomas se enriquecen mucho en miARN maduros que se asocian a RISC y pueden cumplir una función biológica importante en la formación del fenotipo de células diana. Al mismo tiempo, las células de origen mantienen su sobreexpresión de miARN oncogénicos beneficiosos, mientras que las células receptoras no ven su vía de biogénesis sobresaturada con la entrada de pre-miARN a través de los exosomas.

Los presentes estudios revelan el mecanismo dependiente de RISC mediante el cual los exosomas de cáncer se enriquecen en un subconjunto de miARN. El uso de ARNip/ARNhp contra Dicer en células cancerosas no era una opción viable para sondear el contenido de miARN en exosomas, ya que cualquier disminución en miARN exosomal podría ser un mero reflejo del nivel bajo de miARN debido a la supresión de Dicer. Por lo tanto, se desarrolló un método de electroporación para administrar anticuerpos neutralizantes directamente a los exosomas. Este método funcionó de manera eficaz para inhibir la actividad de Dicer en exosomas y prevenir el procesamiento de pre-miARN.

Si bien algunos miARN se regulan por aumento en tumores específicos (Volinia *et al.*, 2006), también se informa que ocurre una reducción global de miARN en cánceres humanos (Kumar *et al.*, 2007, Lu *et al.*, 2005, Melo *et al.*, 2011, Melo *et al.*, 2010, Melo *et al.*, 2009, Ozen *et al.*, 2008). Se describe Dicer como eliminado en células cancerosas, pero los niveles bajos son suficientes para mantener el crecimiento tumoral (Kumar *et al.*, 2009). La regulación por disminución parcial de Dicer a través de miR-103/107 mejora la invasividad de la célula cancerosa sin afectar la proliferación celular (Martello *et al.*, 2010). La pérdida total de Dicer es perjudicial para la supervivencia celular (Fukagawa *et al.*, 2004). Mientras que se asocian niveles bajos de Dicer a la baja supervivencia en pacientes con cáncer de ovario y pulmón (Karube *et al.*, 2005, Merritt *et al.*, 2008). Asimismo, la pérdida de heterocigotos de Dicer se correlaciona con metástasis en pacientes con cáncer de mama (Martello *et al.*, 2010). La regulación por disminución de Dicer en cáncer de mama también ocurre de manera postranscripcional debido a que los niveles de miARN permanecen inalterados (Grellet *et al.*, 2009, Wiesen y Tomasi, 2009). En las células cancerosas, una fracción de Dicer se dirige a endosomas/MVB en una manera dependiente de CD43. Finalmente, el Dicer se secreta a través de los exosomas. La regulación por disminución de Hrs, BiG2 y TSG101, componentes de la vía de biogénesis exosomal, llevó a cambios importantes en la localización celular de la proteína Dicer. Una explicación posible para los niveles de Dicer eliminado en células cancerosas es que pueden deberse a la exportación activa a través de los exosomas. Si se interrumpe la vía de secreción de exosomas, las células cancerosas presienten el aumento de la proteína Dicer y regulan por disminución su expresión de ARNm. Además, trasladan la proteína al compartimiento nuclear, donde ya no puede asistir en la producción de miARN maduros. En este sentido, la regulación por aumento de Dicer en células

cancerosas agresivas las hace más indolentes (Park *et al.*, 2011).

La CD43 es una proteína transmembrana que se encuentra predominantemente presente en leucocitos. En algunas células cancerosas, se observa un CD43 truncado en el citoplasma y el núcleo (Shelley *et al.* 2012). Previamente se ha mostrado que CD43 podría dirigir determinadas proteínas membrana a exosomas (Shen *et al.*, 2011a). La supresión de CD43 en un modelo de ratón de cáncer de mama ortotópico reduce la carga tumoral en 76 % (Shelley *et al.*, 2012). Los estudios clínicos sugieren que la expresión de CD43 se correlaciona con la baja supervivencia de pacientes con cáncer de mama (de Laurentiis *et al.*, 2011). Este informe identifica que CD43 se encuentra funcionalmente implicado en el direccionamiento de Dicer hacia los oncosomas.

Estudios recientes muestran que los exosomas derivados de melanoma cumplen una función en la metástasis y que los exosomas derivados de fibroblastos cumplen una función en la migración de células de cáncer de mama (Luga *et al.*, 2012, Peinado *et al.*, 2012). Los exosomas derivados de células cancerosas cumplen una función protumorigena asociada a la transferencia de ARNm y las proteínas proangiogénicas (Luga *et al.*, 2012, Peinado *et al.*, 2012, Skog *et al.*, 2008). Los exosomas derivados de células cancerosas también pueden contribuir a una transferencia horizontal de oncogenes, tal como EGFRvIII (Skog *et al.*, 2008). Los oncosomas median alteraciones significativas del transcriptoma en células diana a través de miARN asociados al RISC. Innumerables procesos biológicos se ven afectados en las células diana, lo que induce la proliferación y convierte células no tumorígenas en células formadoras de tumores. No obstante, el efecto potencial in vivo de los oncosomas en células receptoras probablemente dependa de varios otros parámetros ambientales y barreras de accesibilidad.

Los oncosomas también activan fibroblastos estromales para adquirir un fenotipo de miofibroblastos. A modo de ejemplo, se ilustra la capacidad de los oncosomas de silenciar los supresores tumorales PTEN y HOXD10 mediante miR-21 y miR-10b derivados de oncosomas, respectivamente (Ma *et al.*, 2007, Maehama, 2007). Estos resultados resaltaron la naturaleza compleja de la comunicación adoptada por las células cancerosas para lograr su neoplasia maligna. Estos datos ilustran que las células cancerosas pueden utilizar exosomas para manipular las células normales circundantes a efectos de acelerar la evolución del cáncer y reclutar el estroma reactivo.

Muchos estudios han mostrado que los fibroblastos y las células epiteliales normales también exhiben regulación por disminución de supresores tumorales y activación de oncógenos sin mutaciones evidentes. En conjunto, este estudio revela la posible función de los exosomas de cáncer en la inducción de un "efecto de campo" oncogénico que subyuga adicionalmente las células normales adyacentes para que participen en el desarrollo y la evolución del cáncer. Los oncosomas pueden convertir células no tumorígenas en células formadoras de tumores mediante la activación de vías oncogénicas. De manera adicional, los oncosomas también pueden participar en la generación de estroma reactivo. Posiblemente, esto se logre sin necesidad de mutaciones genéticas definidas y explica la naturaleza compleja de cómo las células cancerosas mutadas extienden su programa para conseguir apoyo de su micro y macroentorno.

II. Detección de biomarcadores

Es posible medir la expresión de biomarcadores o genes mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. La cuantificación de los niveles de ARN mensajero (ARNm) de un biomarcador puede ser utilizada para medir la expresión del biomarcador. De manera alternativa, la cuantificación de los niveles de producto proteico de un biomarcador puede ser utilizada para medir la expresión del biomarcador. Se puede encontrar información adicional relativa a los métodos que se discuten más adelante en Ausubel *et al.* (2003) o Sambrook *et al.* (1989). Un experto en la técnica sabrá qué parámetros es posible manipular para optimizar la detección del ARNm o proteína de interés.

En algunas realizaciones, dicha obtención de información de expresión puede comprender la cuantificación de ARN, por ejemplo, chips de ADNc, RT-PCR cuantitativa, hibridación in situ, transferencia Northern o protección de nucleasas. Dicha obtención de información de expresión puede comprender la cuantificación de proteínas, por ejemplo, la cuantificación de proteínas comprende inmunohistoquímica, un ELISA, un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo inmunoradiométrico, un fluoroinmunoensayo, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de bioluminiscencia, una electroforesis en gel, un análisis de transferencia Western, un análisis de espectrometría de masa o un microarreglo de proteína.

Es posible emplear un microarreglo de ácido nucleico para cuantificar la expresión diferencial de múltiples biomarcadores. Es posible llevar a cabo análisis de microarreglos con equipamiento comercialmente disponible conforme a los protocolos de los fabricantes, tal como mediante el uso de tecnología Affymetrix GeneChip® (Santa Clara, CA) o Microarray System de Incyte (Fremont, CA). Por ejemplo, es posible colocar ácidos nucleicos de cadena simple (por ejemplo, ADNc u oligonucleótidos) en placas en un sustrato de microchip u ordenarlos en este. Luego, se hibridan las secuencias ordenadas con sondas de ácidos nucleicos específicos para las células de interés. Es posible generar sondas de ADNc marcadas en forma fluorescente mediante la incorporación de desoxinucleótidos marcados en forma fluorescente mediante la transcripción inversa de ARN extraído de las células de interés. De manera alternativa, es posible amplificar el ARN mediante transcripción in vitro y marcarlo con un marcador tal como biotina. Entonces, se hibridan las sondas marcadas con los ácidos nucleicos en el microchip en condiciones sumamente rigurosas. Luego de un lavado riguroso para eliminar las sondas no específicamente unidas, se analiza el chip mediante microscopía confocal láser o mediante otro método de detección, tal como una cámara CCD. En general, los datos de intensidad de fluorescencia brutos en los archivos de hibridación son previamente procesados con el

algoritmo de promedio multichip importantes (RMA) para generar valores de expresión.

También es posible emplear PCR en tiempo real (qRT-PCR) para medir la expresión diferencial de múltiples biomarcadores. En qRT-PCR, generalmente se transcribe la plantilla de ARN en forma inversa en ADNc, que luego se amplifica mediante una reacción de PCR. Se hace un seguimiento ciclo a ciclo de la cantidad de producto de PCR en tiempo real, lo que permite determinar las concentraciones ideales de ARNm. Para medir la cantidad de producto de PCR, la reacción puede ser llevada a cabo en presencia de un tinte fluorescente, tal como verde SYBR, que se une a ADN de doble cadena. La reacción también puede ser llevada a cabo con una sonda indicadora fluorescente específica para el ADN que se amplifica.

Un ejemplo no taxativo de una sonda indicadora fluorescente es una sonda TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). La sonda indicadora fluorescente fluoresce cuando se elimina el desactivador durante el ciclo de extensión de PCR. La qRT-PCR múltiple puede ser desarrollada mediante el uso de múltiples sondas indicadoras específicas para ciertos genes, cada una de las que contiene un fluoróforo diferente. Se registran los valores de fluorescencia durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado hasta dicho punto en la reacción de amplificación. Es posible llevar a la práctica la qRT-PCR con un estándar de referencia para minimizar errores y reducir la variación entre muestras. El estándar de referencia ideal se expresa a un nivel constante en diferentes tejidos, y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Estándares de referencia adecuados incluyen, de modo no taxativo, ARNm para los genes constitutivos gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y actina β . El nivel de ARNm en la muestra original o el cambio de expresión de cada biomarcador pueden ser determinados mediante cálculos conocidos en la técnica.

También es posible emplear tinción inmunohistoquímica para medir la expresión diferencial de múltiples biomarcadores. Dicho método permite localizar una proteína en las células de una sección de tejido mediante la interacción de la proteína con un anticuerpo específico. Para ello, se puede fijar el tejido en formaldehído u otro agente de fijación adecuado, colocarlo en cera o plástico y cortarlo en secciones delgadas (de alrededor de 0.1 mm a varios milímetros de espesor) con un microtomo. De manera alternativa, es posible congelar el tejido, y cortarlo en secciones delgadas con un criostato. Las secciones de tejido pueden ser colocadas en una superficie sólida o fijadas en ella (es decir, un microarreglo de tejido). Se incuban las secciones de tejido con un anticuerpo primario contra el antígeno de interés, seguido de lavados para eliminar los anticuerpos no unidos. El anticuerpo primario puede acoplarse a un sistema de detección o puede ser detectado con un anticuerpo secundario acoplado a un sistema de detección. El sistema de detección puede ser un fluoróforo o puede ser una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina, que puede convertir un sustrato en un producto colorimétrico, fluorescente, o quimioluminiscente. Se analizan generalmente las secciones de tejido teñido en microscopio. Debido a que una muestra de tejido de un sujeto con cáncer puede ser heterogénea, es decir, algunas células pueden ser normales y otras células pueden ser cancerosas, es posible determinar el porcentaje de células positivamente teñidas en el tejido. Dicha medida, junto con una cuantificación de la intensidad de la tinción, puede ser utilizada para generar un valor de expresión para el biomarcador.

Es posible utilizar un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, o ELISA, para medir la expresión diferencial de múltiples biomarcadores. Existen diversas variaciones de un ensayo ELISA. Todas se basan en la inmovilización de un antígeno o anticuerpo en una superficie sólida, generalmente, en una placa de microtitulación. El método ELISA original comprende preparar una mezcla que contiene las proteínas biomarcadoras de interés, revestir las paredes de una placa de microtitulación con la muestra, incubar cada pocillo con un anticuerpo primario que reconoce un antígeno específico, lavar el anticuerpo no unido, y luego detectar los complejos de anticuerpo-antígeno. Los complejos de anticuerpo y antígeno pueden ser detectados directamente. Para ello, los anticuerpos primarios se conjugan a un sistema de detección, tal como una enzima que produce un producto detectable. Los complejos de anticuerpo y anticuerpo pueden ser detectados indirectamente. Para ello, el anticuerpo primario es detectado por un anticuerpo secundario conjugado a un sistema de detección, tal como se describió anteriormente. Entonces, se escanea la placa de microtitulación y es posible convertir los datos de intensidad brutos en valores de expresión mediante medios conocidos en la técnica.

También es posible utilizar un microarreglo de anticuerpo para medir la expresión diferencial de múltiples biomarcadores. Para ello, se ordenan múltiples anticuerpos y se enlazan en forma covalente a la superficie del microarreglo o biochip. En general, se marca un extracto de proteína que contiene proteínas biomarcadoras de interés con un tinte fluorescente o biotina. Se incuban las proteínas biomarcadoras marcadas con el microarreglo de anticuerpo. Luego de lavados para eliminar las proteínas no unidas, se analiza el microarreglo. Entonces, es posible convertir los datos de intensidad fluorescente brutos en valores de expresión mediante medios conocidos en la técnica.

También es posible utilizar microesferas de multiplexación Luminex para medir la expresión diferencial de múltiples biomarcadores. Dichas microesferas microscópicas de poliestireno codificadas por color internamente con tintes fluorescentes, de forma que cada microesfera tiene una firma espectral única (de las que hay hasta 100). Las microesferas con la misma firma son marcadas con un oligonucleótido específico o anticuerpo específico que se unirá a la diana de interés (es decir, ARNm o proteína biomarcadora, respectivamente). A su vez, también se marca la diana con un indicador fluorescente. Por lo tanto, existen dos fuentes de color, una de la microesfera y la otra de la molécula indicadora en la diana. Luego, se incuban las microesferas con la muestra que contiene las dianas, de las que es posible detectar hasta 100 en un pocillo. El área superficial/tamaño pequeño de las microesferas y la exposición

tridimensional de las microesferas a las dianas permite la cinética prácticamente de fase de solución durante la reacción de unión. Las dianas capturadas son detectadas mediante mecánica de fluidos con base en citometría de flujo en la que láseres excitan los tintes internos que identifican cada microesfera y también cualquier tinte indicador capturado durante el ensayo. Es posible convertir los datos de los archivos de adquisición en valores de expresión mediante medios conocidos en la técnica.

También es posible emplear hibridación in situ para medir la expresión diferencial de múltiples biomarcadores. Dicho método permite la ubicación de ARNm de interés en las células de una sección de tejido. En dicho método, es posible congelar, o fijar y embeber el tejido, y luego cortarlo en secciones delgadas que se arreglan y fijan en una superficie sólida. Se incuban las secciones de tejido con una sonda antisentido marcada que se hibridará con un ARNm de interés. En general, las etapas de hibridación y lavado son llevadas a cabo en condiciones extremadamente rigurosas. La sonda puede ser marcada con un fluoróforo o una etiqueta pequeña (tal como biotina o digoxigenina) que puede ser detectada por otra proteína o anticuerpo, de forma que el híbrido marcado pueda ser detectado y visualizado en microscopio. Es posible detectar múltiples ARNm en forma simultánea, siempre que cada sonda antisentido presentara una marca distintiva. Se analizan generalmente las secciones de tejido hibridado en microscopio. Debido a que una muestra de tejido de un sujeto con cáncer puede ser heterogénea, es decir, algunas células pueden ser normales y otras células pueden ser cancerosas, es posible determinar el porcentaje de células positivamente teñidas en el tejido. Dicha medida, junto con una cuantificación de la intensidad de la tinción, puede ser utilizada para generar un valor de expresión para cada biomarcador.

En una realización adicional, es posible comparar el nivel de marcador con el nivel del marcador de un control, en el que el control puede comprender una o más muestras tumorales extraídas de uno o más pacientes quienes se determinó que presentan un determinado tumor metastásico o que no presentan un determinado tumor metastásico, o ambos.

El control puede comprender datos obtenidos al mismo tiempo (por ejemplo, en el mismo experimento de hibridación) que los datos individuales del paciente, o puede ser un valor o conjunto de valores almacenado, por ejemplo, almacenado en un ordenador, o en un medio legible por ordenador. Si se utilizaran los últimos, es posible comparar nuevos datos de pacientes para los marcadores seleccionados, obtenidos de muestras iniciales o de seguimiento, con los datos almacenados para los mismos marcadores sin que sean necesarios experimentos de control adicionales.

III. Definiciones

Tal como se usa en la presente, “obtener una muestra biológica” u “obtención de una muestra biológica” hacen referencia a la recepción de una muestra biológica o de sangre, por ejemplo, ya sea en forma directa o indirecta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se obtiene la muestra biológica, tal como una muestra de sangre o una muestra que contiene células mononucleares de sangre periférica (PBMC) directamente de un sujeto en el laboratorio o la ubicación en la que se analizará la muestra biológica o cerca de estos. En otras realizaciones, la muestra biológica puede ser extraída por un tercero y luego transferirse, por ejemplo, a una entidad o ubicación independiente para su análisis. En otras realizaciones, la muestra puede ser obtenida y evaluada en la misma ubicación con un ensayo en el sitio de atención. En dichas realizaciones, tal obtención hace referencia a la recepción de la muestra, por ejemplo, del paciente, de un laboratorio, de un consultorio médico, por correo, correo privado, u oficina de correos, etc. En algunos aspectos adicionales, el método puede comprender adicionalmente indicar la determinación del sujeto, un individuo o entidad a cargo de los gastos de salud, un médico tratante, un farmacéutico, un gerente de beneficios de farmacia, o cualquier individuo para el que la determinación pueda ser de interés.

Con “sujeto” o “paciente” se hace referencia a cualquier sujeto individual para el que se desea terapia o prueba de diagnóstico. En este caso, en general, los sujetos o pacientes hacen referencia a seres humanos. También se pretende incluir como sujeto a cualquier sujeto involucrado en ensayos clínicos de investigación que no presenten signos clínicos de enfermedad, o sujetos involucrados en ensayos epidemiológicos, o sujetos utilizados como controles.

Tal como se usa en la presente, “expresión aumentada” hace referencia a un nivel elevado o aumentado de expresión en una muestra cancerígena relativa a un control adecuado (por ejemplo, una muestra celular o tejido no canceroso, un estándar de referencia), en la que la elevación o aumento en el nivel de expresión génica es estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Es posible determinar si un aumento en la expresión de un gen en una muestra de cáncer respecto a un control es estadísticamente significativo mediante una prueba t (por ejemplo, prueba t de una muestra, prueba t de dos muestras, prueba t de Welch) u otra prueba estadística conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los genes que se sobreexpresan en un cáncer pueden ser genes conocidos por su sobreexpresión en un cáncer, o para los que se determinó previamente dicha sobreexpresión.

Tal como se usa en la presente, “expresión reducida” hace referencia a un nivel reducido o disminuido de expresión en una muestra cancerígena relativa a un control adecuado (por ejemplo, una muestra celular o tejido no canceroso, un estándar de referencia), en la que la reducción o disminución en el nivel de expresión génica es estadísticamente significativo ($p < 0.05$). En algunas realizaciones, el nivel reducido o disminuido de expresión génica puede ser una ausencia total de expresión génica, o un nivel de expresión de cero. Es posible determinar si una reducción en la expresión de un gen en una muestra de cáncer respecto a un control es estadísticamente significativo mediante una prueba t (por ejemplo, prueba t de una muestra, prueba t de dos muestras, prueba t de Welch) u otra prueba estadística

conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los genes que no se expresan en forma suficiente en un cáncer pueden ser genes conocidos por su sobreexpresión en un cáncer, o para los que se determinó previamente dicha sobreexpresión.

5 La expresión "fragmento de unión al antígeno" se usa en la presente en el sentido más amplio y abarca específicamente los anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos.

10 El término "cebador", tal como se usa en la presente, pretende abarcar cualquier ácido nucleico capaz de cebar la síntesis de ácidos nucleicos nacientes en un proceso dependiente de plantilla. Los cebadores pueden ser oligonucleótidos de diez a veinte y/o treinta pares de base de longitud, pero también pueden emplearse secuencias más largas. Los cebadores pueden ser provistos en forma de cadena doble y/o cadena sencilla, aunque se prefiere la forma de cadena sencilla.

IV. Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben tener en cuenta que las técnicas descritas en los ejemplos que se encuentran a continuación representan técnicas que el inventor observó que funcionan en forma correcta en la práctica de la invención y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para llevarla a la práctica.

Ejemplo 1 – Procedimientos experimentales

20 *Aislamiento y purificación de exosomas.* Los exosomas fueron purificados mediante centrifugación diferencial, tal como se describió anteriormente (Thery *et al.*, 2006; Luga *et al.*, 2012). En pocas palabras, se sometió el sobrenadante de las células cultivadas durante 24 horas a etapas de centrifugación secuencial de 800 g y 2000 g y se filtró el sobrenadante con un filtro de 0.2 µm en frascos de cultivo. Se sedimentaron los exosomas a 100 000 g en un rotor basculante SW40Ti durante 2 horas (Beckman). Se descartó el sobrenadante y se agregó PBS para una etapa de lavado de 1 hora. Se analizó el sedimento para determinar exosomas. Se resuspendieron los exosomas para
25 extracción de ARN en 500 µl de Trizol, los exosomas para extracción de proteínas en 250 µl de solución amortiguadora de lisis (urea 8M/SDS 2.5 %, 5 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de pepstatina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM) y los exosomas para tratamientos en PBS. Se descongelaron muestras de suero congeladas en hielo y se agregaron 500 µl a 12 mL de PBS y se siguió el procedimiento anteriormente mencionado. Se trataron los exosomas purificados mediante centrifugación (37 °C, 60 minutos) con 500 g/mL de proteinasa K (Sigma-Aldrich) disuelta en agua libre de RNasa, seguida de la inactivación por calor de la proteasa (60 °C, 10 minutos) e incubación (37 °C, 15 minutos) con 2 g/mL de RNasa libre de proteasa (Sigma-Aldrich) seguida de la adición de inhibidor de RNasa concentrado 10X (Ambion). Se purificaron los exosomas en duplicado y se utilizó uno de los sedimentos para la cuantificación de proteína para el tratamiento de exosomas.

35 *Análisis de exosomas mediante citometría de flujo.* Se incubaron preparaciones de exosomas (5-10 µg) con 5 µl de microesferas de látex de aldehído/sulfato de 4 µm de diámetro (Interfacial Dynamics, Portland, OR) y se resuspendieron en 400 µl de PBS con BSA al 2 %. Se incubaron microesferas recubiertas con exosomas (20 µl) con los siguientes anticuerpos: anti-CD63 (Santa Cruz), anti-CD9 (abcam), anti-TSG101 (abcam), anti-flotilina-1 (Santa Cruz) durante 30 minutos a 4 °C seguido, cuando fuera necesario, por incubación con anticuerpo secundario conjugado con FITC y analizado en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences).

40 *Electroporación de exosomas.* Se mezclaron exosomas a una concentración proteica total de 100 µg (determinada mediante ensayo de Bradford) y 5 µg de anticuerpo Dicer (policlonal SC-30226, Santa Cruz, CA), 5 µg de anticuerpo de actina, o 10 µg de pre-miRNA-21, -10b y -cel1 en 400 µl de amortiguador de electroporación (fosfato de potasio 1.15 mM pH 7.2, cloruro de potasio 25 mM, 21 % Optiprep) y se electroporaron en una cubeta de 4 mm con un sistema de electroporación Gene Pulser Xcell (Biorad), tal como se describió previamente (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011). Luego
45 de la electroporación, se trataron los exosomas con proteinasa K y/o RNasa, cuando fue apropiado.

Espectroscopía de dispersión de luz (LSS). Se recolectaron espectros de LSS con el sistema experimental descrito en la Figura 10B. Se utilizó el láser supercontinuo de banda ancha Fianium SC-450-2 como una fuente de luz blanca. Se enfocó la luz del láser supercontinuo en la muestra con una lente de longitud de foco larga. Se colocaron las muestras que consisten en suspensiones líquidas de exosomas o microesferas en un soporte de muestra de cuarzo
50 cúbico usual. Se recogieron las señales de fondo de las muestras de solventes sin exosomas o microesferas. Se recogió la luz dispersada por exosomas o microesferas a 90° al haz incidente con los otros lentes de distancia local y se dirigió al espectrógrafo Princeton Instrument Acton 2300i acoplado con un detector EMCCD DV885 Andor Technology iXon de alta eficiencia. La detección fue llevada a cabo en el intervalo de longitud de onda de 470–870 nm. El detector fue controlado por un ordenador a la que se transfirieron los datos y en la que se almacenaron, y se
55 procesaron.

Para calibrar el sistema y establecer su capacidad para detectar con precisión los tamaños de las partículas, las que pueden ser menores que la longitud de onda, se midieron las señales de suspensiones de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) de microesferas de cristal con diámetros nominales de 24 nm y 100 nm y microesferas de

poliestireno con diámetros nominales de 119 nm, 175 nm, 356 nm y 457 nm. Se ajustaron los espectros predichos por teoría Mie a los datos con el método de minimización de mínimos cuadrados previamente desarrollado (Fang *et al.*, 2003). En la Figura 1E se ilustran los espectros experimentales y los ajustes resultantes para microesferas de cristal con diámetro nominal de 100 nm y microesferas de poliestireno con diámetro nominal de 356 nm. En ella, se ilustra el desvío de la dispersión de Rayleigh a la cuarta potencia de la longitud de onda para enfatizar el comportamiento no Rayleigh del espectro de LSS. Al comparar las distribuciones de tamaño obtenidas mediante LSS para microesferas con las especificaciones provistas por el fabricante, se concluyó que puede estimarse que la precisión del método de LSS es de 10 nm. También se estableció que las distribuciones de tamaño reconstruidas no son sensibles a los índices de refracción de las microesferas y el solvente. Cabe destacar que dado que la dispersión de luz de partículas pequeñas es proporcional a la sexta potencia de su tamaño, la detección de partículas de menos de 50 nm en presencia de partículas mayores requeriría un aumento importante de la relación entre señal y ruido del sistema experimental.

Luego, se desarrollaron experimentos de LSS con la suspensión en PBS de exosomas. Se presentan los espectros de LSS experimentales de los exosomas y los ajustes Mie correspondientes en la Figura 1B. El ajuste del espectro reconstruido es excelente. Se encontró la distribución de tamaño de exosomas (vea la gráfica a la derecha y el recuadro de la Figura 1R), la que presentó un pico a 104 nm, mediante la técnica de reconstrucción anteriormente mencionada (Fang *et al.* 2003; Itzkan *et al.* 2007; Fang *et al.* 2007). Se comparó dicha distribución de tamaño de extracción con las medidas morfométricas llevadas a cabo en las fotografías obtenidas por TEM de las muestras de exosomas similares (Figura 1A). Dado que la cantidad de partículas en las fotografías de TEM no era lo suficientemente grande como para graficar una distribución estadísticamente significativa, se calculó el tamaño medio de las partículas mayores de 50 nm a partir de la fotografía de TEM y se determinó que era de 95 nm. Por lo tanto, la distribución de tamaño reconstruida de LSS y las medidas morfométricas obtenidas de las fotografías de TEM de los exosomas coinciden con todos los datos.

Tratamientos con N-Rh-PE. Se marcaron las células con N-Rh-PE mediante incubación con N-Rh-PE 8 μ M (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) diluida en amortiguador Hanks 1 X helado (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 1 hora en hielo. Luego, se lavaron las células 3 veces con amortiguador Hanks helado antes de colocarlas nuevamente en placas con medio DMEM. Se utilizaron células de N-Rh-PE en imagenología confocal aproximadamente 24 horas después de ser marcadas.

Marcaje con inmunoro y microscopía electrónica Se colocaron especímenes fijos a una concentración óptima en mallas recubiertas de carbono/formvar de 300 mesh y se permitió que absorbieran formvar durante un mínimo de 1 minuto. Se reemplazaron las mallas en un amortiguador de bloqueo durante 1 hora para una etapa de bloqueo/permeabilización para la tinción con inmunoro. Inmediatamente, se colocaron las mallas, sin enjuague, en el anticuerpo primario en dilución adecuada durante la noche a 4 °C (policlonal anti-Dicer 1:10 SC-30226, Santa Cruz, monoclonal anti-CD9 1:10, Abcam). No se expusieron algunas de las mallas al anticuerpo primario para usarlas como controles. Al día siguiente, se enjuagaron todas las mallas con PBS y luego se dejaron flotar en gotas del anticuerpo secundario adecuado unido a partículas de oro de 10 nm (AURION, Hatfield, PA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron las mallas con PBS y se colocaron en glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de fosfato 0.1 M durante 15 minutos. Luego del enjuague en PBS y agua destilada, se dejó que las mallas se secaran y se tiñeron por contraste con acetato de uranilo. Las muestras fueron observadas en microscopio electrónico de transmisión de Tecnai Bio Twin (FEI, Hillsboro, OR) y se obtuvieron imágenes con una cámara de CCD AMT (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA).

Transferencia Western y anticuerpos. Se cultivaron células en amortiguador RIPA y exosomas en urea 8 M/SDS al 2.5 %, 5 μ g/ml de leupeptina, 1 μ g/ml de pepstatina y amortiguador de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM para controlar las respuestas de genes endógenos. Se colocaron las proteínas conforme a cuantificación de Bradford en geles de acrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF (ImmobilonP) mediante transferencia electroforética húmeda. En el caso de muestras de proteínas de exosomas en suero recogidos en modelos de xenoinjerto ortotópicos, se utilizó gel de acrilamida al 4 % de 15 cm de altura para resolver bandas de Dicer humanas y de ratón. En general, se interrumpieron las transferencias durante 1 hora a TA con leche en polvo descremada al 5 % en PBS/Tween al 0.05 % y se incubó durante la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: 1:500 anti-Dicer (SC-30226) Santa Cruz, 1:1000 proteínas antiubiquitiniladas, clon FK2 Millipore, 1:500 clon M2 de peroxidasa M2 anti-Flag Sigma, 1:500 anti-CD43 ab9088 Abcam, 1:500 anti-PTEN, ab32199, Abcam, 1:300 anti-CD9 ab92726, Abcam, 1:500 anti-GADPH ab9483, Abcam, 1:250 anti-TRBP ab72110, Abcam; 1:300 anti-TSG101 ab83, Abcam, 1:400 anti-AGO2 ab32381, Abcam, 1:4000 clon AC-15 de peroxidasa anti-actina β , Sigma, 1:500 anti-GFP ab6556, Abcam, 1:500 anti-HOXD10 ab76897 Abcam. Se incubaron los anticuerpos secundarios durante 1 hora a TA. Se realizaron lavados luego de la incubación de anticuerpos en un agitador orbital cuatro veces en intervalos de 10 minutos con Tween20 al 0.05 % en PBS 1X. Se revelaron las transferencias con reactivos quimioluminiscentes de Pierce.

PCR en tiempo real. Se realizó la transcripción inversa de ARN tratada con DNasa con transcriptasa inversa MultiScribe (Applied Biosystems) y cebadores oligo-d(T) luego de la purificación de ARN total con Trizol (Invitrogen). Se realizó PCR en tiempo real de ARNm en un instrumento de sistema de detección de secuencias 7300HT ABI PRISM con mezcla SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) y actina β como control. Se enumeran los cebadores en la Tabla 1.

Se cuantificó el pre-miARN con 150 ng de ARN tratado con DNasa y el kit de RT-qPCR en una etapa SuperScript III Platinum (Invitrogen) (Schmittgen *et al.*, 2004). Se enumeran los cebadores en la Tabla 1.

Para el análisis de expresión de miARN, se mezclaron 10 ng de ARN con el reactivo del kit de transcripción inversa de microARN TaqMan que contiene cebadores de miARN específicos y se transcribieron en forma inversa conforme a las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Se incubaron las mezclas de reacción a 16 °C durante 30 minutos, 42 °C durante 30 minutos y 85 °C durante 5 minutos. Se llevó a cabo PCR en tiempo real con un instrumento de sistema de detección de secuencias 7300HT ABI PRISM (Applied Biosystems) con Assay-on-Demand comercialmente disponible para cada miARN estudiado (Applied Biosystems). Se normalizó la expresión de miARN para la expresión de ARNr 18S (reactivo de ensayo predesarrollado TaqMan, Applied Biosystems) que sirvió como un control interno de la cantidad y la integridad de ARN. Cada medida fue realizada por triplicado. Se determinó el ciclo umbral (Ct), la cantidad de ciclos fraccionales en la que la diana amplificada alcanza un umbral fijo, y se midió la expresión con la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, como se informó previamente (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 1. Secuencias de cebadores de qPCR

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
BiG2 F	5' CAGGAGGTGGTGAAGGACAT3'	1
BiG2 R	5' CCCGTTGGTCTGTGAGTTT3'	2
TSG101 F	5' GATACCCTCCCAATCCAGT3'	3
TSG101 R	5' GTCACCTGACCGCAGAGATGA3'	4
Hrs F	5'AGTGGCTGTCTGGGTATTCATC3'	5
Hrs R	5'CCGTCCATATCCCTTGAAGAATC3'	6
CD43 F	5'GCTGGTGGTAAGCCCAGAC3'	7
CD43 R	5'GGCTCGCTAGTAGAGACCAAA3'	8
hsa-Actina F	5'CATGTACGTTGCTATCCAGGC3'	9
hsa-Actina R	5'CTCCTTAATGTACGCACGAT3'	10
mmu-Actina F	5'GGCTGTATTCCCTCCATCG3'	11
mmu-Actina R	5'CCAGTTGGTAACAATGCCATGT3'	12
Pre-miR-let7-a F	5'AGGTAGTAGGTTGTATAGTTTTAGG3'	13
Pre-miR-let7-a R	5'TAGGAAAGACAGTAGATTGTATAGT3'	14
Pre-miR-15b F	5'AGCACATCATGGTTTACATGC3'	15
Pre-miR-15b R	5'CTAGAGCAGCAAATAATGATTGG3'	16
Pre-miR-26a F	5'TTCAAGTAATCCAGGATAGGCTGT3'	17
Pre-miR-26a R	5'TGCAAGTAACCAAGAATAGGCC3'	18
Pre-miR-31 F	5'TGAGTGTGTTTTCCCTCCCT3'	19
Pre-miR-31 R	5'GCCATGGCTGCTGTCTAG3'	20
Pre-miR-125a F	5'GTCCCTGAGACCCCTTAACC3'	21
Pre-miR-125a R	5'AACCTCACCTGTGACCTG3'	22
Pre-miR-125b F	5'GTCCCTGAGACCCCTAAGTTG3'	23
Pre-miR125b R	5'AGCCTAACCCGTGGATTT3'	24
Pre-miR-200a F	5'TTCCACAGCAGCCCCTG3'	25
Pre-miR-200a R	5'GATGTGCCTCGGTGGTGT3'	26
Pre-miR-200c F	5'CTCGTCTTACCCAGCAGTGT3'	27
Pre-miR-200c R	5'GTCATCATTACCAGGCAGTATTAG3'	28
Pre-miR-335 F	5'GTCAAGAGCAATAACGAAAAATG3'	29
Pre-miR-335 R	5'GAGGTCAGGAGCAATAATGAA3'	30
Pre-miR-10a,b F	5'TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG3'	31
Pre-miR-10a,b R	5'ATTCCCCTAGATACGAATTTGTGA3'	32
Pre-miR-21 F	5'GCTTATCAGACTGATGTTGACTG3'	33
Pre-miR-21 R	5'CAGCCCATCGACTGGTG3'	34
Pre-miR-27a F	5'GCAGGGCTTAGCTGCTTG3'	35
Pre-miR-27a R	5'GGCGGAAGTTAGCCACTGT3'	36
Pre-miR-155 F	5'GTTAATGCTAATCGTGATAGGG3'	37
Pre-miR-155 R	5'GCTAATATGTAGGAGTCAGTTGGA3'	38
Pre-miR-373 F	5'CTCAAAATGGGGGCGCTT3'	39
Pre-miR-373 R	5'CACCCCAAAATCGAAGCACT3'	40
Pre-cel-1 F	5'CCACCCCGTTCTACATACTTC3'	41
Pre-cel-1 R	5'ACCGTACCGAGCTGCATACT3'	42

15 *Transferencia Northern.* Se realizó una transferencia Northern con oligonucleótidos de ADN Bio[TEG] 3' del complemento inverso del miARN maduro como sondas (vea la Tabla 2). Se utilizaron geles de urea/acrilamida 15 % para cargar 40 µg de ARN exosomal (tratado con DNasa) junto con tinte de carga de ARN 1X luego de 2 minutos a

95 °C seguido de un período de 2 minutos en hielo. Se utilizó el marcador de microARN conforme a las instrucciones del fabricante (N2102, New England BioLabs). La electroforesis fue realizada a 4 °C durante 3 horas con TBE 1X. La transferencia fue llevada a cabo con papeles de transferencia Whatman y membrana de nylon cargada positivamente BrightStar-Plus (Ambion) durante 2 horas a 4 °C con TBE 0.5X. Se reticuló el ARN con la membrana con un transiluminador UV durante 20 minutos. Se prehibridaron las membranas mediante rotación durante 1 hora a 42 °C en solución de hibridación ULTRAhyb®-Oligo de Ambion (Ambion). Se descongelaron las sondas en hielo y se agregaron 150 ng por mL de amortiguador de hibridación luego de 5 minutos de incubación a 95 °C, luego de lo que se dejó que las membranas rotaran durante la noche a 42 °C. Se realizaron los siguientes lavados: SSPE 2X/SDS al 0.5 % – dos veces durante 15 minutos, SSPE 0.2/SDS al 0.5 % – dos veces durante 30 minutos y SSPE 2X - 5 minutos. Se siguió a dichas etapas de lavado iniciales con más lavados y posteriormente, se revelaron las transferencias con el kit BioDetect de BrightStar conforme a las instrucciones del fabricante (Ambion). Se expusieron las transferencias durante la noche con dos películas apiladas. Se expusieron las transferencias y se volvieron a sondear dos veces más.

Tabla 2. Secuencias de sondas de transferencia Northern

Nombre de sonda	Secuencia de sonda	SEQ ID NO:
miR-10b	5' CACAAATTCGGTTCTACAGGG3'	43
miR-21	5' TCAACATCAGTCTGATAAGCTA3'	44
miR-cel-1	5' AGTATGCAGCTCGGTACGGT3'	45
pre-miR-10b	5' TGAAGTTTTTGCATCGACCATATATTCCCCTAGAATCGAA3'	46
pre-miR-21	5' TGTCAGACAGCCCATCGACTGGTGTGGCCATGAGAT3'	47
tRNAMet	5' CAGCACGCTTCCGCTGCGCCACTCT3'	48

Cultivos celulares, plásmidos, pre-miARN y ARNip. Se cultivaron las líneas celulares MCF10A, MCF7, MDA-MB231, A549, SW480 y HeLa humanas, así como las líneas celulares NMuMG, 67NR y 4T1 de mamífero de ratón en FBS en DMEM al 10 % (todas las células provienen de American Type Culture Collection – ATCC). Se llevaron a cabo transfecciones con reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) para ARNip. Se utilizó RNAiFect (Qiagen) para las transfecciones pre-miARN sintéticas en todas las líneas celulares. Se enumeran las secuencias de ARNip en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de ARNip

Nombre ARNip	Secuencia ARNip	SEQ ID NO:
Hrs	5' GGAACGAGCCCAAGUACAATT3'	49
Hrs	5' UUGUACUUGGGCUCGUUCCGG3'	50
TSG101	5' GUUUUAUCAUUAAGUGUAATT3'	51
TSG101	5' UUACACUUGAAUGAUAACTG3'	52
CD43	5' GGAGAGCCUUUGGUCUCUATT3'	53
CD43	5' UAGAGACCAAAGGCUCUCCGG3'	54
AGO2	5' GCGGUUACACGAUGCACUUTT3'	55
AGO2	5' AAGUGCAUCGUGUAACGCCTG3'	56

Plásmidos. p-CMV-Tag4B-Dicer (Melo *et al.*, 2009), p-CMV6-CD63-GFP de Origene (RG217238), GFP-hAGO2 de Addgene (plásmido 11590), pGFP-shBiG2 de Origene (TG314697), pGFP-shDicer de Origene (TG304991), pre-miR-10b, -21 y -cel-1 sintéticos adquiridos en Ambion, 3'UTR-WTPTEN, 3'UTR-Mutant-PTEN (laboratorio de Dr. Joshua Mendell), 3'UTR-WTHOXD10 y 3'UTR-Mutant-HOXD10 (laboratorio de Dr. Robert Weinberg) de Addgene.

Inmunocitoquímica y microscopía confocal. Se colocaron las células con confluencia adecuada en placas de 12 pocillos en cubreobjetos que se insertan y se cultivan durante la noche. Al día siguiente, se lavaron las células con PBS 1X frío y se fijaron durante 20 minutos a TA con PFA/PBS al 4 %. Se permeabilizaron los portaobjetos durante 10 minutos a TA con Triton X-100 al 0.5 % en PBS, se bloquearon durante 1 hora a TA con BSA al 5 % y se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios en PBST (PBS, Triton al 0.1 %) con BSA al 2 %: 1:100 anti-Dicer (SC-30226) Santa Cruz, 1:500 anti-Flag Sigma, 1:50 anti-CD43 ab9088 (Abcam), 1:100 anti-TSG101 ab83 (Abcam), 1:500 anti-GFP ab6556 (Abcam), 1:100 anti-LAPM-1 ab25630 (Abcam), 1:100 anti-Hrs ab56468 (Abcam), 1:100 anti-BiG2 ab75001 (Abcam), 1:500 anti-biotina ab66233 (Abcam). Se incubaron anticuerpos secundarios de cabra antirratón Alexa 543 o de cabra antirratón Alexa-488 1 hora a TA en dilución 1:200 en PBST con BSA al 2 %. Se utilizó DAPI para teñir los núcleos. Se incubaron exosomas cultivados con Triton X al 0.05 % durante 15 minutos y posteriormente con BSA al 5 % durante 1 hora a TA para el análisis de exosomas. Se incubó el primer anticuerpo primario (anti-CD9, 1:50) durante la noche en 100 ul de PBST a 4 °C y se agregó el segundo anticuerpo primario, anti-flag (1:50), el día siguiente y se incubó durante 1 hora a TA. Se agregaron los anticuerpos secundarios en forma consecutiva y también se incubaron durante 1 hora a TA. Se colocaron los exosomas en placas sobre cubreobjetos en placas de 12 pocillos en PFA al 4 % durante 45 minutos y se lavaron con PBS frío. Se obtuvieron imágenes con un sistema confocal directo Zeiss LSM510 con la herramienta de reciclaje para mantener configuraciones idénticas. Los

exosomas agregados llevan a estructuras de más de 200 nm visibles mediante microscopía confocal. Se seleccionaron imágenes de un conjunto formado a partir de al menos dos experimentos independientes para analizar datos. Las figuras ilustran campos representativos.

Ensayos de fragmentación in vitro. Se incubaron extractos de proteínas exosomales (10 µg) a 37 °C con 3 pmol de horquillas pre-miR-10b, -21 y -cel-1 marcadas internamente con biotina en presencia de MgCl₂ 3 mM, NaCl 30 mM y Hepes 100 mM, pH 7.5. El volumen final de cada reacción fue de 10 µl. Se detuvieron las reacciones con la adición de 10 µl de amortiguador de carga de gel de formamida. Se resolvió el ARN con electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante y se reveló con el kit BioDetect de BrightStar conforme a las instrucciones del fabricante (Ambion).

Ensayos de formación de colonias y viabilidad celular. Se colocaron las células en placas de 96 pocillos y se agregaron exosomas cultivados el día 1 en una concentración de 100 µg/mL. Se determinó la viabilidad celular mediante ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT). Se colocaron las células en placas de 12 pocillos y se agregaron exosomas entre el día 1 y el día 5 de cultivo en una concentración de 100 µg/mL para experimentos de formación de colonias. Luego de 8 días, se fijaron las colonias y se tiñeron con reactivo MTT.

Arreglo de expresión de ARNm humano-HT12 Illumina. Se hibridó ARN en un arreglo de expresión de ARNm humano-HT12 Illumina. Se normalizaron los datos con la rutina neqc ofrecida por el paquete R limma (Shi *et al.*, 2010). Se determinaron las abundancias de genes mediante la mediana de las sondas por gen. La acumulación es llevada a cabo mediante media aritmética de distancias euclidianas de genes (filas) y muestras (columnas).

Arreglo de expresión de miARN. Se utilizó un miARN usual tal como se describió en 9. El arreglo contiene 1833 sondas de microARN humano, 1084 sondas de micro ARN de ratón y otras 78 sondas de ARN no codificantes. Se imprimen las sondas en duplicado. Se incluyen los identificadores de acceso a GenBank asociados a cada sonda. Se realizó un análisis bioinformático con R (versión 2.14.2) (en internet en r-project.org) y Bioconductor (en internet en bioconductor.org/). La intensidad en bruto de cada sonda es la mediana de intensidad de píxeles a la que se resta la mediana del fondo. Fijar un desfase de 1 garantiza que no existan valores negativos luego de transformar logarítmicamente los datos. Se normalizaron los datos por cuantil luego de la transformación por log2. Se promediaron las señales de las sondas que miden el mismo miARN. El análisis se llevó a cabo con las funciones de la biblioteca LIMMA. Los mapas de riesgo fueron generados con la función de mapa de riesgo de la biblioteca made4. Cuando se realizaron repeticiones técnicas, el mapa de riesgo representó los valores de expresión promedio obtenidos a partir de las medidas repetidas.

Xenoinjertos ortotópicos de tumores de ovario, endometrio y mama. Se alojaron ratones nu/nu atímicos hembra (Harlan) de entre 4 y 6 semanas de edad en jaulas ventiladas individualmente en un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad a 21 a 23 °C y 40 % a 60 % de humedad. Se dejó que los ratones accedieran a alimentos irradiados y a agua esterilizada libremente. Todos los protocolos animales fueron evaluados y aprobados conforme a los comités de uso y cuidado animal institucional españoles.

Los especímenes de tumor primario fueron obtenidos en Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España). El comité institucional de revisión aprobó el estudio. Se obtuvo consentimiento informado escrito de los pacientes. Se seleccionaron partes de tejido no necrótico (aproximadamente 2-3 mm³) extirpadas de cinco tumores ováricos epiteliales (EOC) humanos: seroso, endometrial, tumor de células claras y mucinoso y se colocaron en DMEM (BioWhittaker) complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina a temperatura ambiente. Se sometió a los animales anestesiados con isoflurano a una laparotomía lateral, se expusieron sus ovarios y se anclaron partes de los tumores a la superficie ovárica con suturas de Prolene 7.0. De manera adicional, se implantaron partes de tumores de mama y endometriales humanos en los panículos adiposos mamarios y la pared endometrial, respectivamente.

Se permitió que los tumores injertados en forma ortotópica crecieran y al momento del sacrificio, se extrajeron 2 ml de sangre de los ratones anestesiados mediante punción cardíaca. Se centrifugaron las muestras a 14 000 rpm y se congelaron a -80 °C.

Inmunoprecipitación. Se lavaron las células y exosomas, se lavaron en PBS y se centrifugaron o se ultracentrifugaron, respectivamente, para recoger los sedimentos. Se agregaron amortiguador RIPA helado o amortiguador SDS/urea 8 M a las células y exosomas, respectivamente. Se mecieron las suspensiones suavemente a 4 °C durante 15 minutos en el caso de células y durante 2 horas en el caso de exosomas. Se centrifugaron los lisados a 14 000 rpm en una centrífuga previamente enfriada durante 15 minutos y se descartó el sedimento. Se lavaron las microesferas de agarosa/sefrosa de proteína A o G dos veces con PBS y se restauraron con PBS en suspensión al 50 %. Se agregó una mezcla de microesferas/suspensión (100 µl) a 1 mL de lisado celular y 500 µl de lisado exosomal, y se incubó a 4 °C durante 10 minutos. Se eliminaron las microesferas mediante centrifugación a 14 000 x g a 4 °C durante 10 minutos y se descartaron los sedimentos. Se agregó anticuerpo Dicer (5 µg en el caso de células y 10 µg en el caso de exosomas) a 500 µl de lisado celular o 250 µl de lisado exosomal (1 µg/µl células, 10 µg/µl exosomas) y se incubó durante la noche a 4 °C en un agitador orbital. Se agregaron 100 µl de suspensión de microesferas de agarosa/sefrosa en proteína A o G y se dejaron a 4 °C durante la noche. Luego del centrifugado, se descartó el sobrenadante y se lavaron las microesferas 3 veces con amortiguador RIPA helado en el caso de células o amortiguador de urea/SDS en el caso de exosomas. Se hirvieron las microesferas de agarosa/sefrosa durante 5

minutos para disociar los inmunocomplejos de las microesferas. Se recogieron las microesferas mediante centrifugado y se llevó a cabo transferencia Western con el sobrenadante.

Condiciones de cultivo en presencia de ionóforo de Ca^{2+} A23187. Se cultivaron células (8×10^7 células) a 5×10^5 células/ml en DMEM. Para tratar las células, se agregó A23187 (concentración final 200 nM, Calbiochem, La Jolla, CA) a los cultivos cuatro horas después. Se cultivó medio de células tratadas y no tratadas y se recogieron exosomas.

Inyección ortotópica de células en ratones lampiños. Se midió el crecimiento tumoral ortotópico mediante inyección de células epiteliales mamarias no tumorígenas MCF10A, células epiteliales mamarias no tumorígenas MCF10A expuestas a exosomas derivados de MDA-MB231 y células de cáncer de mama MDA-MB-231 (1×10^5 células en 0.2 ml de PBS) en el panículo adiposo mamario de ratones lampiños atímicos hembra de 3 semanas de edad, tal como se describió previamente (Welch, 1997). Se controló el crecimiento tumoral semanalmente mediante medidas de la longitud y el ancho tumorales con un calibre y se informó como diámetro promedio, tal como se describió previamente (Welch, 1997). Todos los animales fueron sometidos a eutanasia 21 días después de la inyección de las células tumorales.

Estadísticas. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) entre replicados biológicos. Se llevaron a cabo triplicados técnicos y biológicos de cada experimento. Se calculó la significancia estadística mediante prueba t de Student.

Ejemplo 2 - Resultados

Aislamiento e identificación de exosomas. Se aislaron exosomas de células cancerosas (carcinoma metastásico humano triple negativo MDA-MB231, adenocarcinoma de mama humano MCF7, carcinoma de mama no metastásico de ratón 67NR y carcinoma de mama metastásico de ratón 4T1) y células de control (mama epiteliales humanas no tumorígenas MCF10A y mama epiteliales de ratón no tumorígenas NMuMG) mediante métodos de ultracentrifugado (Figura 10A) (Luga *et al.*, 2012; Thery *et al.*, 2006). Se analizaron los exosomas cultivados mediante microscopio electrónico de transmisión (TEM) y microscopio de fuerza atómica (AFM). Se identificaron las partículas de entre 40-140 nm de tamaño (Figuras 1A-B) (Thery *et al.*, 2002). Asimismo, se confirmó la identidad de los exosomas mediante detección de TSG101 y CD9, dos marcadores de exosomas (Figura 1C) (Ostrowski *et al.*, 2010). Los exosomas aislados también fueron positivos para el marcador CD9 cuando se analizaron mediante microscopio electrónico con marcaje con inmunorojo (Figura 1A). También se analizaron microesferas de látex acopladas a exosomas mediante citometría de flujo que presentan expresión superficial de las tetraspaninas CD9, CD63, TSG101 y flotilina1, las que son marcadores de exosomas comúnmente utilizados (Figura 1D). Adicionalmente, se utilizó espectroscopia de dispersión de luz (LSS) (Fang *et al.*, 2007; Itzkan *et al.*, 2007; Bang y Setabutr, 2010; Benitez-vieyra *et al.*, 2009; Khairkar *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2010) para demostrar que las muestras aisladas revelan una distribución de tamaño estrecha con un pico en diámetro de 104 nm (Figura 1E, panel derecho). El sistema de LSS permitió la detección precisa de todos los tamaños de partículas en extractos de exosomas mediante microesferas de cristal de diferentes diámetros como controles internos. LSS también excluyó la contaminación con desechos celulares o bacteriales y microvesículas posibles en dichos aislados (Figura 1E, vea el recuadro en la gráfica derecha). Asimismo, y de acuerdo con los datos de LSS, el análisis de seguimiento de nanopartículas NanoSight reveló partículas con una distribución de tamaño con un pico en un diámetro de 105 ± 1.0 nm (Figura 1F) que excluye adicionalmente la existencia de posibles contaminantes de diferentes intervalos de tamaño que existen en solución cuando no se filtra (Figura 1F, gráfica derecha). Se emplearon ensayo de viabilidad celular colorimétrica (MTT), ensayo de tinción con dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL), análisis mediante citometría de flujo de Anexina V y yoduro de propidio e inmunotransferencias con citocromo C de exosomas (Figuras 10C-E) para demostrar la viabilidad de las células previamente a la extracción de exosomas con el fin de excluir la posibilidad de contaminación de los aislados con cuerpos apoptóticos o desechos celulares aleatorios. Se hace referencia a los exosomas aislados de células cancerosas en conjunto como oncosomas, tal como se definió anteriormente (Lee *et al.*, 2011). Se hace referencia a los exosomas aislados de células de control colectivamente como normosomas.

Oncosomas específicamente enriquecidos en miARN oncogénico en comparación con normosomas. Se analizó el contenido global de miARN de oncosomas y normosomas. El análisis de microfluidos de ARN aislado de exosomas reveló un aumento en el contenido de ARN pequeño de oncosomas en comparación con normosomas (Figura 2F). Asimismo, se observó una baja correlación entre los niveles de miARN en normosomas (derivados de MCF10A) y oncosomas (derivados de MDA-MB-231) con un valor de R^2 de 0.35 (Figura 2A). El análisis de arreglo de miARN global mostró un enriquecimiento del contenido de miARN en oncosomas en comparación con normosomas. Este análisis también reveló un perfil de expresión de miARN muy distintivo en oncosomas en comparación con normosomas. Los datos de arreglo de miARN mostraron 305 miARN expresados en forma diferencial entre oncosomas y normosomas (Tabla 5) con un enriquecimiento global de contenido de miARN en oncosomas en comparación con normosomas. El enriquecimiento de miARN en oncosomas no fue un mero reflejo de un aumento en miARN en las células cancerosas porque las células cancerosas mostraron una reducción en la cantidad general de ARN pequeño total en comparación con las células no tumorígenas (Figura 11A). Por lo tanto, la acumulación de miARN en exosomas parece ser específica y dirigida.

Se evaluó adicionalmente la expresión de 15 miARN en las células cancerosas y exosomas derivados de dichas células que se determinó que se expresaban en forma diferencial en el arreglo de miARN entre oncosomas y

normosomas (Tablas 4 y 5). Se ha determinado la implicación de seis miARN de esta colección en la evolución del cáncer (miARN oncogénicos: miR-10a, miR-10b, miR-21, miR-27a, miR-155 y miR-373) y se informó que nueve miARN presentaban funciones de supresión tumoral (miARN supresores de tumores: let7a, miR15b, miR26a, miR31, miR125a, miR125b, miR200a, miR200c, miR335) y se expresaron en células y exosomas derivados de dichas células (Figuras 11B-C y Tabla 4). Para determinar la semivida de miARN en exosomas, se desarrolló un sistema libre de células para estudiarla en exosomas aislados. Se colocaron exosomas purificados, libres de células, en medio de cultivo y se incubaron durante 24 horas o 72 horas a 37 °C. Luego del período de incubación, se analizaron los exosomas para determinar su contenido de miARN y se compararon a las células a partir de las que se originaron. Se redujeron los valores de correlación de dichos miARN en los oncosomas en comparación con las células tras 72 horas en comparación con 24 horas ($R^2 = 0.60$ a $R^2 = 0.43$), mientras que se mantuvo una correlación elevada entre normosomas y células MCF10A (células usadas para derivar los normosomas, $R^2 = 0.98$ a $R^2 = 0.98$) (Figura 2B). Se observó una regulación por aumento importante de los seis miARN oncogénicos analizados exclusivamente en oncosomas cultivados durante 72 horas en comparación con oncosomas cultivados durante 24 horas con un cambio promedio de 17.6 y 13.2 veces para oncosomas derivados de MDA-MB231 y 4T1, respectivamente, lo que da sostén adicional a un aumento específico del contenido de miARN en oncosomas con el transcurso del tiempo (gráficas del medio e inferior de la Figura 2C y a gráficas a la derecha, superior e inferior de la Figura 11D). Se notan diferencias insignificantes de miARN supresor de tumores cuando se cultivan los oncosomas durante 24 horas o 72 horas (Figura 2c y Figura 11D). Los normosomas no revelaron diferencias en su contenido de miARN independientemente del tiempo de cultivo (Figura 2C y Figura 11D). La presencia de todos los 15 miARN fue idéntica en normosomas cultivados durante 72 horas y en las células a partir de las que se derivaron y tuvo un coeficiente de correlación de 0.93 (Figura 2E, izquierda). Los coeficientes de correlación de exosomas MDA-MB231 y 4T1 fueron significativamente menores ($r^2 = 0.56$ y 0.42 , respectivamente), lo que apoya adicionalmente una alteración específica en los niveles de miARN de oncosomas con el transcurso del tiempo (Figura 2E, centro y derecha). Adicionalmente, los niveles de correlación se reducen con el aumento de las neoplasias malignas de las líneas celulares cuando se comparan los oncosomas de MCF7 ($r^2 = 0.76$), MDA-MB231 ($r^2 = 0.56$), 67NR ($r^2 = 0.64$) y 4T1 ($r^2 = 0.42$) (Figura 2E y Figura 11E). Por lo tanto, el contenido de miARN de los normosomas fue reflejo de su célula de origen en todo momento, al tiempo que se alteró el contenido de miARN de los oncosomas con el transcurso del tiempo en una forma independiente de las células.

Cuando se comparó el contenido de miARN de oncosomas MDA-MB231 y 4T1 al de los normosomas de células MCF10A y NMuMG, se observó un enriquecimiento de miARN oncogénico en los oncosomas cultivados durante 24 horas con un cambio promedio de 2.7 y 2.0 veces, respectivamente (Figura 11B). Al cumplirse 72 horas se detectó un cambio promedio de 30 y 18.2 veces en miARN oncogénicos en oncosomas derivados de MDA-MB231 y 4T1, respectivamente, en comparación con normosomas derivados de MCF10A y NMuMG (Figura 11B). Se confirmó la regulación por aumento de miR-10b y miR-21 exclusivamente en oncosomas mediante transferencia Northern, lo que apoya tanto el arreglo de miARN como el análisis mediante qPCR (Figura 2D).

Oncosomas contienen pre-miARN y proteínas centrales de RLC. El cultivo libre de células de oncosomas recientemente aislados resultó en un aumento del contenido de miARN, lo que sugiere la biogénesis activa en exosomas. Adicionalmente, el análisis microfluído también sugirió la presencia de moléculas de ARN mayores (Figura 2F). Por lo tanto, se exploró la posible presencia de pre-miARN en preparaciones de normosomas y oncosomas. Se llevó a cabo el cultivo libre de células de exosomas durante 24 horas o 72 horas luego de su aislamiento y se sometió a tratamiento con RNasa para eliminar cualquier ARN extraexosomal posible. A continuación se detectaron pre-miARN en exosomas. Los pre-miARN analizados fueron los correspondientes a los 15 miARN maduros previamente evaluados (Tabla 4).

Tabla 4 15 miARN expresados en forma diferencial entre oncosomas y normosomas

ID de microARN	Referencias
miR-let7-a	Kim <i>et al.</i> , 2012; Spizzo <i>et al.</i> , 2009
miR-15b	Cimmino <i>et al.</i> , 2005; Palamarchuk <i>et al.</i> , 2010
miR-26a	Kota <i>et al.</i> , 2009
miR-31	Valastyan <i>et al.</i> , 2009
miR-125a	Guo <i>et al.</i> , 2009; Spizzo <i>et al.</i> , 2009
miR-125b	Spizzo <i>et al.</i> , 2009; Zhang <i>et al.</i> , 2011
miR-200a	Park <i>et al.</i> , 2008; Spizzo <i>et al.</i> , 2009
miR-200c	Park <i>et al.</i> , 2008; Spizzo <i>et al.</i> , 2009
miR-335	Heyn <i>et al.</i> , 2011; Scarola <i>et al.</i> , 2010; Tavazoie <i>et al.</i> , 2008
miR-10a	Tan <i>et al.</i> , 2009
miR-10b	Spizzo <i>et al.</i> , 2009; Yigit <i>et al.</i> , 2012
miR-21	Spizzo <i>et al.</i> , 2009; Yan <i>et al.</i> , 2008
miR-27a	Gutilla y White, 2009; Mertens-Talcott <i>et al.</i> , 2007
miR-155	Mattiske <i>et al.</i> , 2012
miR-373	Spizzo <i>et al.</i> , 2009; Voorhoeve <i>et al.</i> , 2006

La totalidad de los 15 pre-miARN analizados se encontraban presentes en exosomas (normosomas y oncosomas)

(Figura 3A y Figura 12A). Tal como se observa con miARN, los oncosomas se enriquecieron mucho en pre-miARN oncogénico, al tiempo que los pre-miARN supresores de tumores se vieron subrepresentados (Figura 3A y Figura 12A). Cuando se cultivaron los exosomas durante 24 horas o 72 horas, se observó una regulación por disminución significativa de pre-miARN oncogénicos en oncosomas cultivados durante 72 horas al compararse con oncosomas cultivados durante 24 horas. No se observó dicha variación en normosomas (Figura 3B y Figura 12B). Los pre-miARN supresores de tumores no presentaron diferencia alguna en oncosomas o normosomas (Figura 3B y Figura 12B). Asimismo, se observaron cantidades reducidas de pre-miARN oncogénicos en oncosomas, pero no en normosomas, luego de 96 horas de cultivo, momento en el que los niveles de pre-miARN oncogénicos alcanzaron niveles de pre-miARN supresores de tumores (Figura 3E y Figura 12E). Se confirmó la regulación por disminución de pre-miARN oncogénicos en oncosomas mediante transferencia Northern para pre-miR10b y pre-miR21 (Figura 3C). A continuación, se llevó a cabo un análisis conforme al transcurso de tiempo de pre-miARN y miARN en exosomas. Al cultivar oncosomas aislados durante 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas, se observó que los niveles de los 6 pre-miARN analizados eran inversamente proporcionales a sus respectivos miARN con tiempo de cultivo aumentado (Figura 3D). Aumentó la cantidad de miARN maduros entre 24 y 72 horas de cultivo, luego de lo que llegaron a una meseta (Figura 3D). Por lo tanto, se elimina el contenido de pre-miARN de los oncosomas al tiempo que se aumentan sus miARN maduros respectivos con el transcurso del tiempo. Esta observación llevó a la hipótesis de que los oncosomas tienen la capacidad de biogénesis de miARN.

Se controlaron los seis miARN en células de MDA-MB-231 silenciadas para exportina-5 (XPO5) para entender por qué el procesamiento de pre-miARN en exosomas cultivados comienza luego de 24 horas y no en forma inmediata (Figuras 12C y D). XPO5 es responsable del transporte de pre-miARN del núcleo al citoplasma (Yi *et al.*, 2003). El silenciamiento de XPO5 evita el flujo de pre-miARN desde el núcleo al citoplasma y permite que se evalúe el procesamiento de pre-miARN citoplasmático sin introducir nuevo pre-miARN citoplasmático desde el núcleo. Se controló el microARN-21 en células MDA-MB-231siXPO5 antes y después de centrifugar (Figuras 12C y D), lo que ocurrió a 4 °C durante 3 horas para imitar las condiciones de aislamiento de exosomas. No se observó regulación por aumento significativa de miR-21 en los mismos momentos entre células centrifugadas y no centrifugadas, aunque las primeras sufren un período de retraso de 24 horas (Figuras 12C y D). Por lo tanto, tanto las células como los exosomas requieren un período de tiempo para recuperarse de la tensión de la centrifugación a 4 °C para iniciar el procesamiento de pre-miARN. Se espera dicha aclimatación para las actividades enzimáticas en células cultivadas luego del pasaje del cultivo de tejido.

Oncosomas contienen proteínas centrales de RISC (RLC). Los oncosomas reducen mucho su concentración pre-miARN con aumento simultáneo en sus miARN maduros respectivos con el transcurso del tiempo. Esto lleva a evaluar las capacidades de biogénesis de miARN y procesamiento de pre-miARN en exosomas. La biogénesis de microARN requiere componentes proteicos clave de RLC, Dicer, TRBP y AGO2 (Chendrimada *et al.*, 2005). Previamente se ha demostrado que Dicer y TRBP forman un complejo que provee estabilidad a la proteína Dicer, al tiempo que luego se recluta AGO2 en la vía de biogénesis para favorecer la selección de cadenas y el proceso de desenrollamiento de ARN (Chendrimada *et al.*, 2005). Se detectó proteína Dicer en oncosomas derivados de células cancerosas MCF7, MDA-MB231, 67NR y 4T1 (Figura 1C y Figuras 4A-B). Se eliminó la posibilidad de detectar proteína Dicer extraexosomal contaminante al tratar todas las preparaciones de exosomas con proteinasa K antes de la extracción de proteínas exosomales, tal como se describió anteriormente (Montecalvo *et al.*, 2012) (Figura 1C y Figuras 4A-B). Adicionalmente, varias líneas de células cancerosas, tales como A549 (cáncer de pulmón humano), SW480 (cáncer colorrectal humano), HeLa (cáncer de cuello uterino humano) y 4T07 (cáncer de mama de ratón) también producen exosomas que contienen Dicer (Figura 13H). No se detectó proteína Dicer en normosomas producidos por líneas celulares MCF10A (células epiteliales de mama no tumorígenas humanas) y NMuMG (células epiteliales de mama no tumorígenas de ratón) (Figura 1C y Figura 4A). Se corroboró la presencia de proteína Dicer en oncosomas, pero no en normosomas, mediante marcaje con inmunoro de exosomas y microscopio electrónico de transmisión (Figura 4B y Figura 13A). Adicionalmente, se utilizó anticuerpo anti-GFP como otro control negativo en experimentos de marcaje con inmunoro, y no se detectó nada en los exosomas (Figura 13B).

La proteína Dicer se sobreexpresó aun más con una etiqueta Flag en extremo N en células MCF10A y MDA-MB231 (Figura 13C). La inmunotransferencia y la microscopía confocal confirmaron adicionalmente la presencia de la proteína Dicer-Flag específicamente en oncosomas y no en normosomas (Figura 4C). Los niveles intracelulares de Ca²⁺ en aumento estimulan la secreción de exosomas (Savina *et al.*, 2003). Se agregó ionóforo de Ca²⁺ A23187 al medio de cultivo de células MCF10A y MDA-MB231 y se recogieron exosomas. Se observó un aumento significativo en la producción de exosomas conforme a la expresión de CD9 (Figura 4D). Se detectó proteína Dicer en oncosomas, pero no en normosomas (Figura 4D). Además, dichos resultados sugirieron que no es la cantidad de exosomas que determina el contenido, sino un mecanismo específico que lleva a la acumulación de Dicer. Adicionalmente, se redujo la expresión de Dicer mediante la expresión estable de dos construcciones de horquilla corta en células MCF10A y MDA-MB-231 (Figuras 13D-E). Los oncosomas derivados de células MDA-MB-231shDicer contenían significativamente menos Dicer en comparación con células progenitoras MDA-MB-231 o shScramble mediante inmunotransferencia o marcaje con inmunoro (Figuras 4E-F). Tampoco se detectó Dicer en normosomas derivados de células MCF10AshDicer (Figura 4E).

De manera adicional, también se detectaron proteínas de RLC, AGO2 y TRBP en oncosomas, pero no en normosomas (Figuras 4G-H). Se extrajeron exosomas de células MCF10A y MDA-MB231 transfectadas con una AGO2 marcada con GFP (Figura 4I). Se detectó la presencia de GFP-AGO2 en exosomas extraídos de células MDA-MB231-GFP-

AGO2 con un anticuerpo anti-GFP (Figura 4J). Con el silenciamiento de ARNip de AGO2 en células de MCF10A y MDA-MB231, se observó una regulación por disminución de proteína AGO2 en oncosomas derivados de MDA-MB231 (Figuras 4K-L). Se demostró mediante inmunoprecipitación que AGO2 se une a Dicer en oncosomas, al tiempo que ninguno de los dos es detectable en normosomas (Figura 4M). La TRBP es un adjunto fundamental que induce la estabilidad de Dicer y favorece su actividad de escisión de pre-miARN (Chendrimada *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009). La inmunoprecipitación reveló la presencia de complejo de Dicer y TRBP en oncosomas, pero no en normosomas (Figura 4N).

La inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Dicer reveló que AGO2 se une a Dicer en oncosomas, al tiempo que ninguno de los dos es detectable en normosomas (Figura 13F). La TRBP es un adjunto fundamental que induce la estabilidad de Dicer y favorece su actividad de escisión de premiARN (Chendrimada *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009). La inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Dicer reveló la presencia de complejo de Dicer y TRBP en oncosomas, pero no en normosomas (Figura 13G).

Oncosomas usan RLC para procesar pre-miARN para generar miARN maduro. Se evaluó la función de las proteínas de RLC (propiedades de fraccionamiento y silenciamiento) en oncosomas para generar miARN maduro a partir de pre-miARN. Se extrajeron exosomas carentes de Dicer de las células MCF10AshDicer, MDA-MB231shDicer y 4T1shDicer (Figura 14A). El contenido de pre-miARN y miARN no reveló cambios significativos en los exosomas con regulación por disminución de Dicer con el transcurso del tiempo, lo que indica que no se procesó pre-miARN para generar miARN en ausencia de Dicer en oncosomas (Figuras 5A-B y Figuras 14B-C). A continuación, se insertaron anticuerpos anti-Dicer y anti-TRBP en exosomas mediante electroporación y se compararon a oncosomas y normosomas electroporados con anticuerpo de control anti-actina tratado con proteinasa K luego de la electroporación para evitar la presencia de anticuerpos fuera de los exosomas (Figura 5C). Los oncosomas electroporados con el anticuerpo anti-actina de control exhibieron las mismas variaciones en niveles de pre-miARN y miARN, tal como se mencionó anteriormente (Figuras 5D-E y Figuras 14D-E). En oncosomas con anticuerpos anti-Dicer y anti-TRBP, se observaron cambios insignificantes en los niveles de pre-miARN y miARN con el transcurso del tiempo, lo que sugiere una inhibición del procesamiento de pre-miARN (Figuras 5D-e y Figuras 14D-E). Se evaluó el contenido total de miARN mediante arreglos de expresión de miARN de oncosomas (derivados de MDA-MB-231), oncosomas electroporados de anticuerpo anti-Dicer (derivados de MDA-MB231) y normosomas (derivados de MCF10A) luego de 72 horas de cultivo libre de células. El contenido de miARN total de oncosomas con anticuerpo anti-Dicer se asemejaba más al de normosomas de MCF10A ($R^2 = 0.79$) que oncosomas derivados de MDA-MB231 ($R^2 = 0.48$). Al comparar oncosomas con oncosomas que contienen anticuerpo anti-Dicer, se observaron 198 miARN con expresión diferencial, de los que el 48 % se encontraban significativamente regulados por reducción (Tabla 6). De ellos, 19 % son oncogénicos y sólo 1 % informó presentar propiedades de supresión de tumores con base en bibliografía previamente publicada (Figura 14F, Tabla 6).

Se sabe que la reacción enzimática que transforma un pre-miARN en un miARN maduro es espontánea y no requiere factores más allá de las tres proteínas de RLC, pre-miARN incorporado, y Hsp90, una proteína presente en exosomas (Maniataki y Mourelatos, 2005; McCready *et al.*, 2010). Se electroporaron oncosomas con geldanamicina, un fármaco que inhibe selectivamente la actividad de Hsp90, para confirmar adicionalmente esto (Miyata, 2005). Se determinó una reducción significativa en la cantidad de miARN maduro sintetizado en presencia de geldanamicina en comparación con los controles (Figura 6A). Dos procesos potencialmente superpuestos podrían mediar el efecto de las proteínas Hsp90 sobre la expresión de miARN maduro: un papel activo para favorecer la actividad de AGO2 en la biogénesis de miARN y la estabilización de miARN maduros unidos a proteínas AGO2 en RISC.

Para confirmar adicionalmente la capacidad de procesamiento de pre-miARN específica de los oncosomas, se electroporaron pre-miARN sintéticos 10b y 21, así como el pre-miARN pre-cel-1 precursor de *C. elegans*, en exosomas para estudiar su procesamiento (Figura 15A). Se observó regulación por disminución significativa de pre-miARN y regulación por aumento de sus miARN respectivos en oncosomas luego de 72 horas de cultivo (Figuras 6B-C). Los oncosomas con anticuerpo Dicer no presentaron una diferencia en contenido de pre-miARN luego de 72 horas de cultivo (Figuras 6B-C). Los oncosomas derivados de células shDicer no presentaron una diferencia en contenido de pre-miARN luego de 72 horas de cultivo (Figuras 6B-C). De manera adicional, se marcaron internamente pre-miR-10b, 21 y cel-1 con biotina-desoxitimidina (dT) y se transfectoron en células de MCF10A. Se procesaron los pre-miARN modificados con dT y como resultado, se generaron miARN maduros, lo que confirmó que el marcaje no altera su potencial de procesamiento (Figuras 15B-C). Se utilizaron los pre-miARN en ensayos de fragmentación para demostrar que los exosomas que contienen Dicer son específicamente capaces de procesar pre-miARN y generar miARN maduro (Figuras 6D-F).

CD43 citoplasmático en células cancerosas contribuye a la movilización de Dicer. Los cuerpos multivesiculares (MVB) son organelos celulares que contienen endosomas que eventualmente se liberan como exosomas luego de la fusión con la membrana plasmática (Pant *et al.*, 2012). Se explora un posible mecanismo que permite reclutar proteínas de RISC en endosomas y su posterior liberación en exosomas. En primer lugar, se evaluó si Dicer se asocia con MVB en células cancerosas en comparación con células de control. Se comparó la distribución celular de Dicer junto con marcadores de la vía de biogénesis de exosomas y MVB. Hrs y BiG2 son marcadores de endosomas tempranos y TSG101 es un marcador de MVB (Razi y Futter, 2006; Shin *et al.*, 2004). Se colocó Dicer con Hrs, BiG2 y TSG101 en células de MDA-MB231 y 4T1 (Figura 16A). Las células absorben fosfotidiletanolamina marcada con N-rodamina (NRhPE) y se retiene en los MVB (Sherer *et al.*, 2003). La tinción con Dicer en células de MDA-MB231 y 4T1 se

colocalizó principalmente con NRhPE en MVB, lo que eventualmente genera exosomas. Dichos datos concuerdan con observaciones previas en estudios de fraccionamiento conjunto en los que aparecen Dicer, TRBP y AGO2 en fracciones posteriores de endosomas/MVB (Shen *et al.*, 2013). En contraste, no se produjo colocalización de Dicer con Hrs, BiG2, TSG101 o NRhPE en células de control (NMuMG y MCF10A) (Figura 16A). Asimismo, se silenciaron los genes Hrs y TSG101 con dos ARNip diferentes, así como BiG2 con dos ARNhp diferentes, en células MDA-MB231 y MCF10A, y se evaluó la expresión de proteína Dicer (Figura 16B). El silenciamiento de Hrs, BiG2 y TSG101 impide la formación de MVB y lleva a la regulación por disminución de la producción de exosomas (Figuras 16C-E). Se observó aumento de proteína Dicer en el citoplasma y el núcleo de células MDA-MB231 con siHrs, shBiG2 o siTSG101. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizan células 4T1 en lugar de células MDA-MB231. Cuando se silenciaron los genes Hrs, BiG2 o TSG101 en células MCF10A, no se observaron ubicación (citoplasma) ni expresión de proteína Dicer alterada. Curiosamente, se redujo la expresión de ARNm Dicer en siHrs, shBiG2 y siTSG101 de células MDA-MB231 y 4T1 (Figura 16F). Esto podría representar un bucle de respuesta negativo entre la cantidad de proteína Dicer en la célula y sus niveles de transcripción. Estos resultados sugieren que la exportación de proteínas Dicer mediada por exosomas puede ser una etapa limitante de velocidad para la eliminación de Dicer en células cancerosas. El impedimento de formación de MVB llevó a la acumulación de proteína Dicer en el citoplasma y el núcleo sin aumento de niveles de transcripción de Dicer.

Los MVB también secuestran proteínas ubiquitinadas para la posterior degradación mediante lisosomas (Luzio *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la proteína Dicer no se ubiquitina y no se colocaliza con LAMP-1, un marcador ampliamente utilizado para lisosomas. Dichos resultados sugieren que Dicer no es seleccionada como objetivo de degradación en células cancerosas, sino que es secretado a través de exosomas (Figura 16G).

Las señales enviadas por proteínas diana a los MVB y exosomas son mayormente desconocidas. Recientemente, se especuló que una variedad de proteínas ancla de membrana plasmática, tales como CD43, son posibles mediadores del transporte de proteínas hacia MVB y exosomas (Shen *et al.*, 2011b). CD43 es predominantemente una sialoglicoproteína transmembrana leucocitaria que se expresa en gran medida en células cancerosas (en su forma citoplasmática trucada) y no en células de control (Shelley *et al.*, 2012). Se detecta CD43 en muchos tumores sólidos que incluyen cáncer de mama y en los que se correlaciona con la evolución del cáncer y las metástasis (Shelley *et al.*, 2012). Se exploró la posibilidad de que CD43 contribuya al transporte de proteínas de RISC a MVB. Se demostró que Dicer se inmunoprecipita con proteína CD43 en células MDA-MB231 (Figura 9A). Cuando se regula por disminución CD43 con ARNip en células MCF10A y MDA-MB231, los niveles de Dicer se reducen significativamente en oncosomas (Figuras 9B y 16H) con una acumulación citoplasmática y nuclear de proteína Dicer. Se observó una regulación por disminución de la expresión de ARNm de Dicer en células cancerosas MDA-MB231siCD43, pero no en células no tumorígenas MCF10AsiCD43, tal como también se observó anteriormente con siHrs, shBiG2 y siTSG101 (Figura 16I).

[0106] *Oncosomas alteran el transcriptoma de células diana en una forma dependiente de Dicer.* Se transfectaron células cancerosas (células MDA-MB231) con CD63-GFP, un marcador de exosomas (Escola *et al.*, 1998). Se emplearon células MDA-MB231 CD63-GFP para aislar exosomas GFP+, los que posteriormente se incuban con células MCF10A. Se demostró que los exosomas de MDA-MB231-CD63-GFP eran verdes mediante el uso de NanoSight complementado con un rayo láser que detecta partículas que emiten fluorescencia verde (Figura 17A). Se demostró que los oncosomas CD63-GFP+ ingresaban en las células MCF10A, en las que aparecen en el citoplasma. Se demostró que las células MCF10A expuestas a oncosomas derivados de MDA-MB231 adquieren un nuevo perfil de expresión de miARN distinto al de las células progenitoras MCF10A y similar al de las células MDA-MB231 con arreglos de expresión de miARN. Se demostró que las células MCF10A expuestas a oncosomas derivados de MDA-MB-31 adquieren un nuevo perfil de expresión de miARN distinto al de las células progenitoras MCF10A con arreglos de expresión de miARN. El perfil de transcriptoma global de MCF10A tratado con oncosomas se asemeja más al de las células MDA-MB231. Tal alteración significativa del perfil de expresión de ARNm se revierte cuando se exponen las células MCF10A a oncosomas MDA-MB231 con anticuerpo Dicer, y el patrón de expresión se reaglomera con las células progenitoras de MC10A.

Un análisis profundo de los perfiles de expresión de miARN y ARNm de las células progenitoras MCF10A expuestas a oncosomas MDA-MB231 comparadas a células MCF10A reveló una importante regulación por aumento de determinados miARN y una regulación por disminución de sus dianas de ARNm descritas en células MCF10A tratadas. Por ejemplo, se regularon por aumento miARN-21 y 10b (4.6 y 2.3 veces, respectivamente) en células MCF10A tratadas, entre otros miARN oncogénicos. Se ha determinado la implicación de microARN-21 y 10b en la evolución del cáncer de mama, su invasividad y sus metástasis (Ma *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2011). Tal como se demostró anteriormente, se sintetizaron miR-21 y 10b en oncosomas a partir de sus pre-miARN. Se describen PTEN y HOXD10 como dianas de miR-21 y miR-10b y se eliminaron en el análisis de arreglo de expresión de células MCF10A tratadas con oncosomas cuando se comparan con las células MCF10A de control. El análisis de transferencia Western demostró la eliminación de los niveles de PTEN y HOXD10 en células MCF10A expuestas a oncosomas (Figuras 7A-B). Para evaluar si miR-21 y miR-10b en oncosomas pueden silenciar PTEN y HOXD10 en células receptoras MCF10A, se transfectaron células MCF10A en forma transitoria con indicadores de luciferasa que contienen 3'UTR de genes PTEN o HOXD10 de tipo salvaje capaces de unirse a miR-21 y miR-10b. Se emplearon vectores 3'UTR de PTEN o HOXD10 mutantes como controles. Se observó una reducción de actividad de indicador de luciferasa en células MCF10A incubadas con oncosomas, lo que confirman el suministro funcional de miARN de oncosomas a células receptoras (Figura 7C). Se evaluaron los niveles de expresión de PTEN y HOXD10 en diferentes momentos en las células MCF10A incubadas con oncosomas. Se detectó una reducción significativa de expresión de PTEN y

HOXD10 inmediatamente después de tratar las células con exosomas cultivados durante 72 horas (Figuras 7A-B). Los niveles de expresión de PTEN y HOXD10 cambiaron en forma mínima en células MCF10A tratadas con exosomas recientemente aislados, lo que sugiere que es posible que no hubiera una concentración suficiente de miARN maduros en dicho momento (Figuras 17B-C). Las células MCF10A tratadas con oncosomas cultivados durante 72 horas con anticuerpo anti-Dicer revelaron una regulación por disminución insignificante de PTEN y HOXD10 (Figura 7D y Figura 17G). Adicionalmente, no se alteró el procesamiento de miR-15 en células, un miARN no detectado en oncosomas derivados de MDA-MB231, debido al tratamiento de las células MCF10A con exosomas MDA-MB-231 que contienen anticuerpo Dicer, lo que muestra un efecto insignificante del anticuerpo Dicer en las células tratadas (Figura 17D). Algunos informes muestran la regulación por disminución de dianas de miARN en células incubadas con exosomas sin necesidad de períodos de cultivo extensos (Kosaka *et al.*, 2013; Narayanan *et al.*, 2013; Pegtel *et al.*, 2010). MiR-182-5p es uno de los miARN regulado por aumento en células MCF10A luego del tratamiento con oncosomas y Smad4, una diana de miR-182-5p (Hirata *et al.*, 2012), es uno de los genes regulados por disminución luego del tratamiento con oncosomas de dichas células (Figura 7E). No se observó regulación por aumento de miR-182-5p en oncosomas durante el período de cultivo y no se detectó pre-miR182-5p en oncosomas (Figura 17E). Por lo tanto, los oncosomas también empaquetan miARN maduro sin que sea necesario el procesamiento de pre-miR. Si dichos miR maduros se encuentran en cantidades estequiométricas relevantes, podrían regular la expresión génica de células receptoras, tal como se demostró previamente (Ismail *et al.*, 2013; Kogure *et al.*, 2011; Kosaka *et al.*, 2013; Narayanan *et al.*, 2013; Pegtel *et al.*, 2010; Valadi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). Sin embargo, si algunos miARN maduros no se encuentran presentes en exosomas, pero sí se encuentran sus pre-miARN, estos también pueden tener un efecto biológico sobre sus dianas debido a que se procesarán en miARN asociado a RLC maduro.

Se produjo un aumento de la viabilidad y la proliferación celular de células MCF10A tratadas con oncosomas cultivados durante 72 horas, lo que no se observó cuando se utilizaron oncosomas recientemente aislados (Figura 7F). No se observó diferencia cuando se trataron células MCF10A con oncosomas derivados de MDA-MB231 que contienen anticuerpos anti-Dicer (Figura 7F). Se cumple el mismo patrón para la capacidad de formación de colonias de las células MCF10A tratadas con oncosomas (Figuras 7G y 17F). Las células MCF10A tratadas con colonias de oncosomas cultivadas durante 72 horas para formar colonias en comparación con células no tratadas (Figura 7G). No se observó dicha formación de colonias cuando se utilizaron oncosomas de Dicer AB u oncosomas recientemente aislados (Figura 7G).

Oncosomas inducen la formación de tumores de células epiteliales no tumorígenas y activan fibroblastos. Estudios recientes sugieren que los exosomas derivados de células estromales mesenquimales de la médula ósea dan sostén al crecimiento celular del mieloma múltiple (Roccaro *et al.*, 2013). En lo que respecta al potencial oncogénico funcional de células MCF10A y MCF10A previamente expuestos a oncosomas (oncosomas células MCF10A), se inyectaron dichas células en forma ortotópica en los panículos adiposos mamarios de ratones nu/nu hembra, de manera similar al protocolo recientemente descrito (Luga *et al.*, 2012). Las células MCF10A no formaron tumores en dichos ratones, tal como también se informó anteriormente (Mavel *et al.*, 2002; Thery *et al.*, 2002) (Figura 7H). Los oncosomas-células MCF10A formaron tumores luego de 21 días, al igual que las células MDA-MB231 de control (Figura 7H). Las células MCF10A incubadas con oncosomas que contienen anticuerpo anti-Dicer (pero que no contienen anticuerpos anti-actina de control) exhibieron una reducción significativa en su volumen tumoral (Figura 7H). Dichos resultados apoyan la conversión oncogénica de células MCF10A al exponerse a oncosomas que contienen proteína Dicer (Figuras 7F-H y Figura 17F).

Exosomas en suero de pacientes con cáncer contienen Dicer y procesan pre-miARN para generar miARN maduro. Se evaluaron los exosomas de tumores humanos para determinar la presencia de proteínas de RISC. Para lograr especificidad de células cancerosas, se injertaron en forma ortotópica partes de tumores de ovario, mama y endometrio humanos recientemente aislados en los órganos adecuados de ratones atímicos nu/nu hembra (Figuras 18A-B). Se evaluaron los exosomas en suero de dichos ratones mediante microscopio electrónico (Figura 18C). Se demostró la existencia de proteína Dicer exclusivamente de origen humano (hsa-Dicer) mediante transferencia de proteínas con exclusión por tamaño del contenido aislado de dichos exosomas (Figura 8A y Figura 18D). Se utilizaron extractos de proteínas de exosomas derivados de 4T1 y células 4T1 como controles para mostrar Dicer de origen de ratón, el que exhibe un peso molecular diferente (mmu-Dicer) (Figura 8A).

Se incubaron oncosomas de células MDA-MB231 con fibroblastos dérmicos humanos (HDF). La obtención de perfil de expresión génica global de los fibroblastos incubados con oncosomas revela un impacto significativo en su transcriptoma cuando se compara con las células de control. Se observó regulación por aumento de α SMA (ACTA) (18 veces), COL1A1 (12 veces), TGF β 1 (15 veces), CTGF (8 veces), Ras (6 veces) y ERK (4 veces). Los fibroblastos incubados con oncosomas proliferaron a una velocidad mayor (Figura 8I). Estos resultados sugieren que los oncosomas pueden activar fibroblastos estromales para que se asemejen a un fenotipo de miofibroblastos y presenten características asociadas con fibroblastos asociados a carcinoma.

A continuación, se aislaron exosomas de 100 μ l de muestras de suero fresco de 8 individuos sanos (H) y 11 pacientes con carcinoma de mama (BC) (Figura 8B). Se distinguieron membranas de bicapa lipídica en los exosomas mediante microscopio electrónico (Figura 8C). El suero de pacientes con cáncer de mama contuvo significativamente más exosomas en comparación con el suero de donantes sanos (Figura 8D). Cuando se colocaron cantidades iguales de exosomas en cultivo durante 24 y 72 horas, se observó que los 6 pre-miARN se regularon por disminución exclusivamente en pacientes con cáncer de mama y sus miARN maduros respectivos se regularon por aumento luego

de 72 horas de cultivo, lo que sugiere que los pre-miARN se procesaron en forma madura en los exosomas de suero fresco de pacientes con cáncer de mama y no en los controles sanos (Figuras 8E-F). A continuación, se inyectaron exosomas solos o combinados con células MCF10A en forma ortotópica en el pániculo adiposo mamario de ratones nu/nu hembra. De los 11 exosomas de suero derivados de pacientes con cáncer de mama combinados con células MCF10A, 5 formaron tumores. Ninguno de los exosomas de donantes sanos o exosomas solos formó tumores (Figura 8G). Cabe destacar que se demostró que los exosomas que formaron tumores también presentan el mayor aumento expresado en veces de la cantidad de miARN maduro luego de 72 horas de cultivo (Figuras 8E-F).

Se aislaron adicionalmente los exosomas de un nuevo conjunto de muestras de suero obtenidas de 5 individuos sanos (C46, C45, C44, C43, y C41) y 4 pacientes con carcinoma de mama metastásico (Met219, Met354, Met299 y Met356). Se observó expresión de Dicer en exosomas únicamente en muestras de carcinoma de mama metastásico y no en exosomas de suero de individuos sanos (Figura 8H).

Tabla 5. miARN expresado en forma diferencial entre oncosomas (derivados de MDA-MB231) y normosomas (derivados de MCF10A)

miARN	Valor p
mmu-miR-709	1.30E-06
hsa-miR-1308	3.71E-06
mmu-miR-615-3p	9.08E-06
hsa-miR-1260b	1.06E-05
mmu-miR-1937a	1.36E-05
mmu-miR-321-A	1.54E-05
hsa-miR-615-3p	1.80E-05
hsa-miR-1979	2.10E-05
mmu-miR-1937b	2.72E-05
hsa-miR-373	3.15E-05
mmu-miR-1937c	3.28E-05
hsa-miR-1273d-P	3.68E-05
mmu-miR-720	4.08E-05
mmu-miR-1274a	4.45E-05
hsa-miR-565-A	6.63E-05
mmu-miR-1931	6.77E-05
hsa-miR-1246	7.35E-05
hsa-miR-594-P	7.56E-05
hsa-miR-321-A	7.83E-05
mmu-miR-2145-1-P	9.36E-05
hsa-miR-639-P	9.54E-05
hsa-miR-720	0.000112771
hsa-miR-1280	0.000116
mmu-miR-3473	0.000136388
hsa-miR-1260	0.000178848
hsa-miR-1281	0.000193167
mmu-miR-1224-P	0.00019941
mmu-miR-690	0.000223064
hsa-miR-375-P	0.000242513
hsa-miR-4301	0.000254614
mmu-miR-700	0.000322167
mmu-miR-125b-5p	0.000333431
mmu-miR-1191-P	0.000412736
hsa-miR-1274a	0.000420621
hsa-miR-3197	0.00042765
mmu-miR-1935	0.000459256
hsa-miR-1975-P	0.000467699
hsa-miR-4324	0.000595518
hsa-miR-886-3p	0.00060906
hsa-miR-1274b	0.000643024
mmu-miR-1957	0.000679996
hsa-miR-933	0.000752624
hsa-miR-675	0.000775607
hsa-miR-595	0.000835784
mmu-miR-2137	0.000867405
hsa-miR-572-P	0.000935968
mmu-miR-1195	0.000971222

miARN	Valor p
hsa-miR-4294-P	0.001008217
mmu-mir-1899-P	0.00104201
mmu-miR-689-P	0.001048727
hsa-miR-199b-3p	0.001330193
hsa-miR-3117-P	0.001331776
mmu-mir-321-P	0.001407081
mmu-miR-1961-P	0.001479699
hsa-mir-10a	0.001756816
mmu-miR-669d-P	0.001842801
mmu-miR-1937b-2-P	0.001855411
hsa-miR-3125-P	0.00206976
mmu-miR-1934-P	0.002222993
hsa-miR-574-3p	0.002231887
hsa-miR-718	0.002533178
mmu-miR-1198	0.002640837
mmu-miR-2182-P	0.002722356
hsa-miR-1273	0.002723198
mmu-miR-2133-P	0.002794947
hsa-miR-92b*	0.003046008
hsa-miR-1290	0.003307286
hsa-miR-448	0.003318093
mmu-miR-689	0.003367203
mmu-miR-449a	0.003657703
mmu-miR-1937b-4-P	0.004021961
hsa-miR-4286	0.004068181
mmu-miR-1947	0.00408589
mmu-miR-342-3p	0.004178728
hsa-miR-1303-P	0.004771531
mmu-miR-2132	0.004826438
hsa-miR-4321-P	0.004925885
hsa-miR-4256-P	0.004994658
hsa-miR-4311	0.005120539
mmu-miR-130a	0.005138148
mmu-miR-1939	0.005186979
hsa-miR-1268-P	0.005383176
mmu-miR-31	0.005491579
mmu-miR-99b	0.005498217
mmu-miR-2141	0.005742427
hsa-miR-1202-P	0.005825202
mmu-miR-466b-3p	0.005831681
mmu-miR-2133	0.005962416
hsa-miR-1268	0.006022349
hsa-miR-466	0.006338384
mmu-miR-494	0.006386665
hsa-miR-1289	0.006571828
hsa-miR-320b	0.006612583
hsa-miR-4254	0.006670963
hsa-mir-7-3-P	0.00673441
hsa-miR-923	0.006748425
hsa-miR-764	0.006790693
mmu-miR-291a-3p	0.007141562
mmu-miR-883b-3p	0.007204478
hsa-mir-594-A	0.00721747
mmu-miR-1948-P	0.007524668
hsa-miR-206	0.007553353
hsa-mir-565-P	0.007700663
mmu-miR-467e*	0.00778865
hsa-miR-1826	0.007812174
mmu-miR-467a*	0.007840082
mmu-miR-1983	0.007889552
hsa-miR-324-5p	0.008058633
mmu-let-7c	0.008070282

miARN	Valor p
mmu-miR-1965	0.00810043
hsa-mir-632-P	0.008277449
hsa-miR-181a*MM2GT/AC	0.008292477
hsa-miR-1265	0.008367622
hsa-miR-323b-5p	0.008373161
hsa-mir-1914	0.008444953
hsa-mir-1910	0.008458754
hsa-miR-21	0.008557419
hsa-miR-431*	0.008595529
hsa-miR-3135-P	0.008851151
mmu-miR-187-P	0.009290275
mmu-miR-126-3p	0.009334952
mmu-miR-669a-P	0.00943601
hsa-miR-367	0.009568574
mmu-mir-320-P	0.009788835
hsa-miR-181a*MM1G/C	0.009821714
mmu-miR-484-P	0.009847016
mmu-miR-467c-P	0.010318688
hsa-miR-3154	0.010452692
mmu-miR-466d-3p	0.01047819
hsa-miR-3162-P	0.010642567
mmu-miR-201	0.010827783
mmu-miR-1946a	0.010877863
hsa-miR-937	0.011009279
hsa-miR-3147	0.011883963
hsa-mir-596-P	0.012205467
hsa-miR-3148	0.012245577
hsa-miR-1304	0.012451991
hsa-miR-222MM2GG/AC	0.012512207
mmu-miR-125a-5p	0.012630083
hsa-miR-1272-P	0.012893462
hsa-miR-638	0.012956727
hsa-mir-320	0.013366703
hsa-miR-545*	0.013713081
hsa-mir-1908-P	0.01374103
hsa-let-7d-v2-P	0.013846844
mmu-mir-30d-P	0.014771375
hsa-miR-4297	0.015365603
mmu-miR-182	0.015432962
hsa-miR-3166-P	0.015893116
hsa-miR-494	0.015960208
mmu-miR-669o-P	0.016133286
hsa-miR-566	0.01616152
mmu-miR-1188	0.016736136
mmu-miR-2134-AP	0.016811955
hsa-miR-4259-P	0.016856716
mmu-miR-152	0.01715464
mmu-miR-2134	0.017178929
hsa-miR-3193-AP	0.017496022
hsa-miR-125b	0.017917521
hsa-miR-3124-P	0.018466818
hsa-miR-10b	0.018671177
hsa-miR-455-5p	0.018771585
mmu-miR-144	0.019121516
hsa-miR-130a	0.019424172
hsa-miR-1285	0.019710834
hsa-miR-516b*	0.020003951
hsa-miR-27a	0.020049082
hsa-miR-138-1*	0.020302422
mmu-miR-471	0.020513954
hsa-miR-4298-P	0.020520647
hsa-miR-301b	0.0205242

miARN	Valor p
hsa-mir-147-P	0.020570657
hsa-miR-362-5p	0.020602873
mmu-mir-471-P	0.020639505
mmu-miR-466a-3p	0.020737186
hsa-miR-561	0.020878532
hsa-miR-486-5p	0.021122352
mmu-miR-2861	0.021313137
hsa-miR-587	0.021396357
mmu-miR-375	0.021423748
hsa-mir-329-2-P	0.021718025
mmu-miR-2861-P	0.022230123
hsa-miR-144*	0.022500042
hsa-miR-1255a-P	0.022928296
hsa-mir-519a-2-P	0.023328916
hsa-miR-34c-5p	0.023452529
mmu-miR-466e-3p	0.023486196
mmu-miR-743b-5p	0.023621503
mmu-mir-350-P	0.023797354
mmu-miR-181d	0.024929082
hsa-miR-376a*	0.025160569
hsa-miR-1308-P	0.025400926
mmu-miR-467g	0.025684158
mmu-miR-1946a-P	0.025903246
hsa-miR-147-P	0.025981647
hsa-miR-923-P	0.026407247
mmu-miR-465c-5p	0.026498492
hsa-miR-891a	0.026826475
hsa-miR-28-5p	0.026908406
hsa-miR-4292	0.02699168
mmu-miR-677-P	0.027117156
hsa-miR-4257	0.027412394
hsa-miR-4326	0.027447003
hsa-miR-17*MM2GG/AA	0.027471134
hsa-miR-939-P	0.027590618
mmu-miR-2182	0.027770773
hsa-miR-220c-P	0.027834269
hsa-miR-3132-P	0.027949304
hsa-miR-532-5p	0.028123552
mmu-miR-1947-P	0.028342198
mmu-miR-29a	0.028448253
hsa-miR-3162	0.028472579
hsa-miR-375MM1C/G	0.028539316
hsa-miR-768-3p	0.028631264
mmu-miR-182-P	0.028668937
mmu-miR-205-P	0.029630816
hsa-miR-505	0.029688956
hsa-miR-3146-P	0.02981021
mmu-miR-721	0.029874269
mmu-miR-376c	0.030446032
hsa-miR-1179-P	0.030947356
mmu-miR-1970	0.030975459
hsa-miR-3133-P	0.031120572
hsa-miR-200c	0.031203313
hsa-miR-220a	0.031358991
mmu-miR-100	0.031556595
hsa-miR-1255b	0.031601448
hsa-miR-222MM1G/A	0.031650652
hsa-miR-885-3p	0.031822949
hsa-miR-517b	0.032138191
hsa-miR-200a	0.032181877
hsa-miR-3141	0.032551657
mmu-miR-669h-3p	0.033076965

miARN	Valor p
hsa-miR-1301	0.033141515
hsa-miR-877	0.033292052
hsa-mir-941-2	0.033355824
hsa-mir-487b-P	0.033372231
hsa-miR-4302	0.033621907
hsa-miR-99b	0.033827759
hsa-miR-1253	0.034018422
hsa-let-7a*	0.034034943
hsa-miR-34aMM2CT/TC	0.034301895
hsa-miR-3181-P	0.034366501
hsa-miR-3200	0.034397879
hsa-miR-3129-P	0.034538091
hsa-miR-93*	0.03464146
hsa-miR-548q-P	0.035140723
mmu-miR-466g	0.035388049
mmu-miR-155	0.035624947
hsa-miR-2278-P	0.03584678
hsa-miR-3065-5p	0.035885091
hsa-miR-633	0.035994294
hsa-miR-4265	0.036055664
mmu-miR-2135-P	0.036119609
hsa-miR-190	0.036305474
mmu-miR-669f	0.036533893
hsa-miR-1323	0.036541729
hsa-miR-588	0.036661363
mmu-miR-183*	0.037276389
hsa-mir-941-4	0.037411697
hsa-mir-1913	0.037527439
hsa-miR-2116*	0.037682483
hsa-miR-1178	0.037847724
mmu-miR-196a	0.038163687
mmu-miR-574-3p	0.038418252
hsa-miR-346	0.038809144
mmu-miR-1199	0.039417628
mmu-miR-681	0.039465517
hsa-miR-4292-P	0.039841449
hsa-miR-522	0.040524939
hsa-mir-611-P	0.040860413
hsa-miR-3171	0.040895673
hsa-miR-635	0.041506047
hsa-miR-1197-P	0.041944121
hsa-miR-604	0.04380685
mmu-let-7a*	0.043829675
hsa-miR-335	0.043971349
mmu-miR-466c-3p	0.044407376
mmu-miR-466i	0.044504428
hsa-miR-1297	0.04456723
mmu-miR-338-5p	0.044824503
hsa-mir-526a-2-P	0.044992512
hsa-miR-181aMM2GC/AG	0.045005369
hsa-miR-15b*	0.0452752
hsa-miR-924-P	0.045840226

Tabla 6. miARN expresado en forma diferencial entre oncosomas (derivados de MDA-MB231) y oncosomas con anticuerpo Dicer (derivados de MDA-MB231)

miARN	Cambio expresado en veces
mmu-miR-3470a-P	-68.72008593
mmu-miR-1186	-37.7790082
mmu-miR-3470b	-25.9441337

mmu-miR-1935	-21.29735527
mmu-miR-3473-P	-17.73956758
hsa-miR-665-P	-11.30652094
mmu-miR-3470a	-21.53678167
hsa-miR-1975-P	-8.378567946
mmu-miR-1195	-14.95080951
mmu-miR-1196	-41.418791
mmu-miR-669h-3p	7.716169349
mmu-miR-466l	6.182505826
mmu-miR-1954-P	-8.004541887
mmu-miR-681-P	-5.576609952
mmu-miR-467a*	7.720120341
hsa-miR-4294-P	-6.14881956
hsa-miR-718	-5.926179859
hsa-mir-1910-P	-5.828360182
hsa-miR-3188-P	-7.974527314
hsa-miR-324-5p	-5.711776077
mmu-miR-1937b-4-P	-5.520796704
mmu-miR-669d-P	6.842367137
mmu-miR-3473	-5.977639047
hsa-miR-595	-6.658387264
hsa-miR-3197	-6.118703616
hsa-miR-4256-P	4.894289461
mmu-miR-201	5.429305446
mmu-miR-689	-3.348018214
hsa-miR-4257	-4.323649906
mmu-miR-466d-3p	3.585840199
hsa-miR-923	-3.344759672
mmu-miR-1931	-4.744652197
hsa-mir-650-P	-6.161006285
mmu-miR-466g	3.874674458
mmu-miR-1191-P	-4.045803649
hsa-mir-1538	-3.744109297
hsa-miR-1246	-3.337472797
hsa-miR-124*	3.31414605
hsa-miR-4321-P	-7.691122096
mmu-miR-1946a-P	-6.219634371
hsa-miR-1972-2-P	-5.073720863
hsa-miR-3200	3.335177401
mmu-miR-1947	-7.215369611
mmu-miR-669o-P	3.389226018
mmu-miR-466e-3p	3.534048216
mmu-miR-707	3.877366764
hsa-miR-4297	-6.529597429

hsa-miR-4313	-4.609062464
mmu-miR-1935-AP	-10.94537064
mmu-miR-467g	4.667383343
mmu-miR-2133	-4.243694889
hsa-miR-923-P	-3.64025311
hsa-miR-1236	3.197494004
hsa-miR-1280	-6.234163314
mmu-miR-1937b-2-P	-5.358528363
mmu-miR-499-P	3.275110007
hsa-miR-1263-P	3.338653962
hsa-miR-466	3.265124658
hsa-mir-595-P	-3.780075724
hsa-miR-1285-1-P	-3.392089631
mmu-miR-338-5p	3.139715849
hsa-miR-3140	3.152896366
mmu-miR-2182	-4.235843782
hsa-miR-23b*	-5.32306966
hsa-mir-639-P	-7.052485203
mmu-miR-1947-P	-5.939897094
mmu-miR-22	-3.74236459
mmu-miR-1970	-3.108998272
mmu-miR-665-P	-3.597686151
hsa-miR-3065-5p	3.113930424
mmu-miR-467c-P	3.155074202
hsa-miR-1268	-2.922890303
mmu-miR-24-2*	-3.48139554
hsa-mir-1914	-3.832959976
hsa-miR-3118-5-P	2.977569863
mmu-miR-1306-P	-3.281316308
mmu-miR-669f	5.194629536
mmu-miR-466b-3p	3.438581421
hsa-miR-1268-P	-3.678227949
hsa-mir-1913	-3.946642192
mmu-miR-3470b-P	-4.037857355
mmu-miR-32	2.989834039
hsa-miR-1826-P	-4.872011411
hsa-miR-147-P	3.923947787
hsa-miR-3172-P	3.056599217
hsa-miR-801	-6.14009908
hsa-miR-941-1	-4.658601465
mmu-miR-301a-P	2.770796433
mmu-miR-669a-P	3.643950881
hsa-miR-1289	3.559525037
hsa-miR-548j	2.858203465

hsa-miR-877*	-3.015914917
hsa-miR-10a	-5.70499997
mmu-miR-181c	2.79663413
hsa-miR-3149-P	3.067063437
mmu-miR-3099*	-3.100792371
mmu-miR-705-P	-4.314489552
mmu-miR-2861	-3.008526128
hsa-miR-1976	-2.80557125
mmu-miR-1934-P	-6.614312993
hsa-miR-138-1*	2.769430194
hsa-miR-1243	2.78669354
hsa-miR-3160	-3.16046745
hsa-miR-500	2.766201976
mmu-miR-1945	-3.975181107
hsa-mir-941-4	-4.644133225
hsa-miR-4301	-16.10443714
hsa-miR-1208	-3.230411171
hsa-mir-565-A	-8.232319234
hsa-miR-1244	2.796864338
mmu-miR-669j	3.675114173
hsa-miR-4314	2.810648214
hsa-miR-502-5p	2.743400714
hsa-miR-371-5p	2.607678279
mmu-miR-10b	-3.034387515
mmu-miR-26a	-3.497092003
mmu-miR-483*	-2.743822775
hsa-mir-487b-P	4.073173842
mmu-miR-1930-P	-3.656852693
hsa-miR-1255a	2.690838416
hsa-miR-202	-3.352756633
hsa-miR-4311	-2.706852207
hsa-miR-1226*	2.753774039
mmu-miR-1943-P	2.568476663
hsa-mir-594-P	-7.693094002
hsa-miR-21	-3.331077571
mmu-miR-466a-3p	2.590518002
hsa-miR-1301-P	2.83454983
hsa-miR-638	-5.006318026
hsa-mir-320	-3.08053158
mmu-miR-667	-2.55941239
hsa-miR-1254	3.039211354
hsa-miR-1259	2.60142506
mmu-mir-1904	2.553756257
hsa-miR-320e	-3.6162361

hsa-mir-373	-9.005026193
hsa-miR-3191-P	2.777191568
mmu-miR-700	-4.536931094
hsa-mir-539-P	2.617416119
hsa-miR-4259-P	3.451286701
hsa-miR-548h	2.525655861
mmu-miR-669e-P	2.554714867
mmu-miR-207-P	-3.619675577
hsa-mir-1908-P	-3.739948569
hsa-miR-4254	-4.156361026

REFERENCIAS

- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology* 10, 619-624.
- 5 Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., and Wood, M.J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology* 29, 341-345.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., et al. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5003-5008.
- Ausubel et al., *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons Ltd, Wiley Interscience, 2003.
- Bang, G.M., and Setabutr, P. (2010). Periorbital capillary hemangiomas: indications and options for treatment. *Middle East Afr J Ophthalmol* 17, 121-128.
- 15 Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Bartels, C.L., and Tsongalis, G.J. (2009). MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clinical chemistry* 55, 623-631.
- Benitez-vieyra, S., Medina, A.M., and Cocucci, A.A. (2009). Variable selection patterns on the labellum shape of *Geoblasta pennicillata*, a sexually deceptive orchid. *J Evol Biol* 22, 2354-2362.
- 20 Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics* 35, 215-217.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
- Cocucci, E., Racchetti, G., and Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19, 43-51.
- 25 Cosacov, A. et al. New insights into the phylogenetic relationships, character evolution, and phytogeographic patterns of *Calceolaria* (Calceolariaceae). *Am J Bot* 96, 2240-2255, (2009).
- de Laurentiis, A., Gaspari, M., Palmieri, C., Falcone, C., Iaccino, E., Fiume, G., Massa, O., Masullo, M., Tuccillo, F.M., Roveda, L., et al. (2011). Mass spectrometry-based identification of the tumor antigen UN1 as the transmembrane CD43 sialoglycoprotein. *Mol Cell Proteomics* 10, Mill 007898.
- 30 Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoerovogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 273, 20121-20127.
- Fang, H., Qiu, L., Vitkin, E., Zaman, M. M., Andersson, C., Salahuddin, S., Kimerer, L. M., Cipolloni, P. B., Modell, M. D., Turner, B. S., et al. (2007). Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy. *Applied optics* 46, 1760-1769.
- 35 Filipowicz, W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 122, 17-20.
- Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T., and Oshimura, M. (2004). Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nature cell biology* 6, 784-791.
- 40 Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS one* 7, e30679.
- Gibbins, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology* 11, 1143-1149.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640.
- 45 Grelier, G., Voirin, N., Ay, A.S., Cox, D.G., Chabaud, S., Treilleux, I., Leon-Goddard, S., Rimokh, R., Mikaelian, I., Venoux, C., et al. (2009). Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype. *British journal of cancer* 101, 673-683.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell

- stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.
- Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., and Agnati, L.F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm* 117, 1-4.
- 5 Gyorgy, B., Szabo, T.G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., et al. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68, 2667-2688.
- Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO reports* 6, 961-967.
- 10 Hirata, H., Ueno, K., Shahryari, V., Tanaka, Y., Tabatabai, Z. L., Hinoda, Y., and Dahiya, R. (2012). Oncogenic miRNA-182-5p targets Smad4 and RECK in human bladder cancer. *PloS one* 7, e51056.
- Hood, J.L., San, R.S., and Wickline, S.A. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer research* 71, 3792-3801.
- 15 Ismail, N., Wang, Y., Dakhlallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T. D., Tridandapani, S., et al. (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 121, 984-995.
- Itzkan, I., Qiu, L., Fang, H., Zaman, M. M., Vitkin, E., Ghiran, I. C., Salahuddin, S., Modell, M., Andersson, C., Kimerer, L. M., et al. (2007). Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy monitors organelles in live cells with no exogenous labels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17255-17260.
- 20 Kahlert, C., and Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 91, 431-437.
- Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., et al. (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer science* 96, 111-115.
- 25 Khairkar, P.H., Bang, G.M., Singh, A.B., and Tiple, P.G. (2010). Possible cross-sensitivity between sertraline and paroxetine in a panic disorder patient. *Indian J Pharmacol* 42, 110-111.
- King, H.W., Michael, M.Z., and Gleadle, J.M. (2012). Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 12, 421.
- 30 Kogure, T., Lin, W. L., Yan, I. K., Braconi, C., and Patel, T. (2011). Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* 54, 1237-1248.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., and Ochiya, T. (2013). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *The Journal of biological chemistry* 288, 10849-10859.
- 35 Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature genetics* 39, 673-677.
- Kumar, S., Ansari, F.A., and Scaria, V. (2009). Prediction of viral microRNA precursors based on human microRNA precursor sequence and structural features. *Viro J* 6, 129.
- 40 Lee, T.H., D'Asti, E., Magnus, N., Al-Nedawi, K., Meehan, B., and Rak, J. (2011). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol* 33, 455-467.
- Li, L., Zhu, D., Huang, L., Zhang, J., Bian, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, C. Y., and Zen, K. (2012). Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PloS one* 7, e46957.
- Liu, C. G., Calin, G. A., Volinia, S. & Croce, C. M. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc* 3, 563-578, (2008).
- 45 Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., et al. (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PloS one* 4, e5219.
- 50 Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Luga, V., Zhang, L., Vitoria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., and Wrana, J.L. (2012). Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration. *Cell* 151, 1542-1556.
- 55 Luzio, J.P., Parkinson, M.D., Gray, S.R., and Bright, N.A. (2009). The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochemical Society transactions* 37, 1019-1021.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449, 682-688.
- MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., and Doudna, J. A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 512-517.
- 60 Maehama, T. (2007). PTEN: its deregulation and tumorigenesis. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30, 1624-1627.
- Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & development* 19, 2979-2990.
- Mao, X., Sun, Y., and Tang, J. (2013). Serum miR-21 is a diagnostic and prognostic marker of primary central nervous system lymphoma. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*.
- 65

- Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., et al. (2010). A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 141, 1195-1207.
- Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics* 73, 1907-1920.
- 5 Mavel, S., Thery, I., and Gueffier, A. (2002). Synthesis of imidazo[2,1-a]phthalazines, potential inhibitors of p38 MAP kinase. Prediction of binding affinities of protein ligands. *Arch Pharm (Weinheim)* 335, 7-14.
- McCready, J., Sims, J. D., Chan, D., and Jay, D. G. (2010). Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC cancer* 10, 294.
- 10 Melo, S., Villanueva, A., Moutinho, C., Davalos, V., Spizzo, R., Ivan, C., Rossi, S., Setien, F., Casanovas, O., Simo-Riudalbas, L., et al. (2011). Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4394-4399.
- Melo, S.A., Moutinho, C., Roper, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., et al. (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer cell* 18, 303-315.
- 15 Melo, S.A., Roper, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., et al. (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nature genetics* 41, 365-370.
- Merritt, W.M., Lin, Y.G., Han, L.Y., Kamat, A.A., Spannuth, W.A., Schmandt, R., Urbauer, D., Pennacchio, L.A., Cheng, J.F., Nick, A.M., et al. (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 359, 2641-2650.
- 20 Min, M., Bang, G.S., Lee, H., and Yu, B.C. (2010). A photoswitchable methylene-spaced fluorinated aryl azobenzene monolayer grafted on silicon. *Chem Commun (Camb)* 46, 5232-5234.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., Bernad, A., and Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications* 2, 282.
- 25 Miyata, Y. (2005). Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents. *Current pharmaceutical design* 11, 1131-1138.
- Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756-766.
- 30 Narayanan, A., Iordanskiy, S., Das, R., Van Duyne, R., Santos, S., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Dalby, E., Iglesias-Ussel, M., et al. (2013). Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA. *The Journal of biological chemistry* 288, 20014-20033.
- 35 Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G.A. (2009). MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nature reviews Cancer* 9, 293-302.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology* 12, 19-30; sup pp 11-13.
- 40 Ozen, M., Creighton, C.J., Ozdemir, M., and Ittmann, M. (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 27, 1788-1793.
- Pant, S., Hilton, H., and Burczynski, M.E. (2012). The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical pharmacology* 83, 1484-1494.
- 45 Park, H.J., Bang, G., Lee, B.R., Kim, H.O., and Lee, P.H. (2011). Neuroprotective effect of human mesenchymal stem cells in an animal model of double toxin-induced multiple system atrophy parkinsonism. *Cell Transplant* 20, 827-835.
- Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Wurdinger, T., and Middeldorp, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 6328-6333.
- 50 Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18, 883-891.
- Razi, M., and Futter, C. E. (2006). Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Molecular biology of the cell* 17, 3469-3483.
- 55 Roccaro, A. M., Sacco, A., Maiso, P., Azab, A. K., Tai, Y. T., Reagan, M., Azab, F., Flores, L. M., Campigotto, F., Weller, E., et al. (2013). BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *The Journal of clinical investigation*.
- Rothstein, D. M. et al. Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models. *J Immunol* 166, 322-329 (2001).
- 60 Sambrook et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 20083-20090.
- Schmittgen, T.D., Jiang, J., Liu, Q., and Yang, L. (2004). A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic acids research* 32, e43.
- 65 Shen, B., Fang, Y., Wu, N., and Gould, S.J. (2011a). Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. *The Journal of biological chemistry* 286, 44162-44176.

- Shen, B., Wu, N., Yang, J.M., and Gould, S.J. (2011b). Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *The Journal of biological chemistry* 286, 14383-14395.
- Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y. B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S. O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W. C., Chen, C. H., et al. (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature* 5 497, 383-387.
- Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Ingmundson, A., Homer, S.M., Cicchetti, G., Allen, P.G., Pypaert, M., Cunningham, J.M., and Mothes, W. (2003). Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* 4, 785-801.
- Shi, W., Oshlack, A., and Smyth, G.K. (2010). Optimizing the noise versus bias trade-off for Illumina whole genome expression BeadChips. *Nucleic acids research* 38, e204.
- Shin, H. W., Morinaga, N., Noda, M., and Nakayama, K. (2004). BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. *Molecular biology of the cell* 15, 5283-5294.
- Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 15 21, 575-581.
- Simpson, R.J., Jensen, S.S., and Lim, J.W. (2008). Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 8, 4083-4099.
- Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Estevés, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology* 10, 1470-1476.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 30, 106-114.
- Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 110, 13-21.
- Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2011). Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol* 33, 441-454.
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al]* Chapter 3, Unit 3 22.
- Thery, C. et al. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3, 1156-1162, 30 (2002).
- Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-579.
- Thery, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 biology reports* 3, 15.
- Thery, M., and Casas, J. (2002). Predator and prey views of spider camouflage. *Nature* 415, 133.
- Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M., and Goodall, G. J. (2013). On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. *PLoS one* 8, e55214.
- Tse, J.C., and Kalluri, R. (2011). Waking up dormant tumors. *Breast cancer research : BCR* 13, 310.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research* 39, 7223-7233.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* 9, 654-659.
- van Balkom, B. W., de Jong, O. G., Smits, M., Brummelman, J., den Ouden, K., de Bree, P. M., van Eijndhoven, M. A., Pegtel, D. M., Stoorvogel, W., Wurdinger, T., and Verhaar, M. C. (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood* 121, 3997-4006, S3991-3915.
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., and Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* 13, 423-433.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., et al. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2257-2261.
- Welch, D.R. (1997). Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clinical & experimental metastasis* 15, 272-306.
- Wiesen, J.L., and Tomasi, T.B. (2009). Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol* 46, 1222-1228.
- Yan, L. X., Huang, X. F., Shao, Q., Huang, M. Y., Deng, L., Wu, Q. L., Zeng, Y. X., and Shao, J. Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 14, 2348-2360.
- Yan, L.X., Wu, Q.N., Zhang, Y., Li, Y.Y., Liao, D.Z., Hou, J.H., Fu, J., Zeng, M.S., Yun, J.P., Wu, Q.L., et al. (2011). Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. *Breast cancer research : BCR* 13, R2.
- Yang, C., and Robbins, P.D. (2011). The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clin Dev Immunol* 2011, 842849.
- Yang, X., Meng, S., Jiang, H., Zhu, C., and Wu, W. (2011). Exosomes derived from immature bone marrow dendritic cells induce tolerogenicity of intestinal transplantation in rats. *J Surg Res* 171, 826-832.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17, 3011-3016.

Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M. N., Lutgens, E., et al. (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science signaling* 2, ra81.

- 5 Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., et al. (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular cell* 39, 133-144.

REIVINDICACIONES

1. Una terapia anticancerígena para uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende:
 - (a) medir en una muestra biológica del sujeto el nivel de:
 - (i) Dicer en una fracción de exosoma de la muestra; y/o
 - (ii) actividad de procesamiento de Dicer de un miARN primario o miARN precursor en una fracción de exosoma de la muestra;
 - (b) identificar al sujeto que tiene o que no tiene un biomarcador de cáncer comparando el nivel de Dicer o actividad de procesamiento de Dicer en la muestra del sujeto con el nivel de Dicer o actividad de procesamiento de Dicer en una muestra de referencia; y
 - (c) administrar un agente anticancerígeno al sujeto que tiene niveles aumentados de Dicer o actividad de procesamiento de Dicer en relación con la muestra de referencia.
2. La terapia anticancerígena para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la terapia anticancerígena es una quimioterapia, una radioterapia, una terapia hormonal, una terapia dirigida, o una inmunoterapia.
3. La terapia anticancerígena para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la muestra es:
 - (i) esencialmente libre de células, o
 - (ii) una muestra de linfa, saliva, orina o plasma.
4. La terapia anticancerígena para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además purificar una fracción de exosoma de la muestra o aumentar la producción de una fracción de exosoma de la muestra.
5. La terapia anticancerígena para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de tráquea, cáncer de cerebro, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer cervical, cáncer de testículo, cáncer de colon, cáncer de recto o cáncer de piel.
6. La terapia anticancerígena para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el cáncer es un cáncer de mama.
7. La terapia anticancerígena para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además:
 - (i) medir el nivel de uno o más miARN(s) seleccionados de los miARNs proporcionados en la Tabla 5 en una fracción de exosoma de la muestra; o
 - (ii) medir el nivel de AGO2 o TRBP.
8. La terapia anticancerígena para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además medir el nivel de un miARN precursor que comprende medir el nivel de un precursor de uno de los miARN(s) de la Tabla 5.
9. La terapia anticancerígena para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el sujeto ha sido tratado previamente por un cáncer, o en la que al sujeto se le ha extirpado previamente un tumor quirúrgicamente.

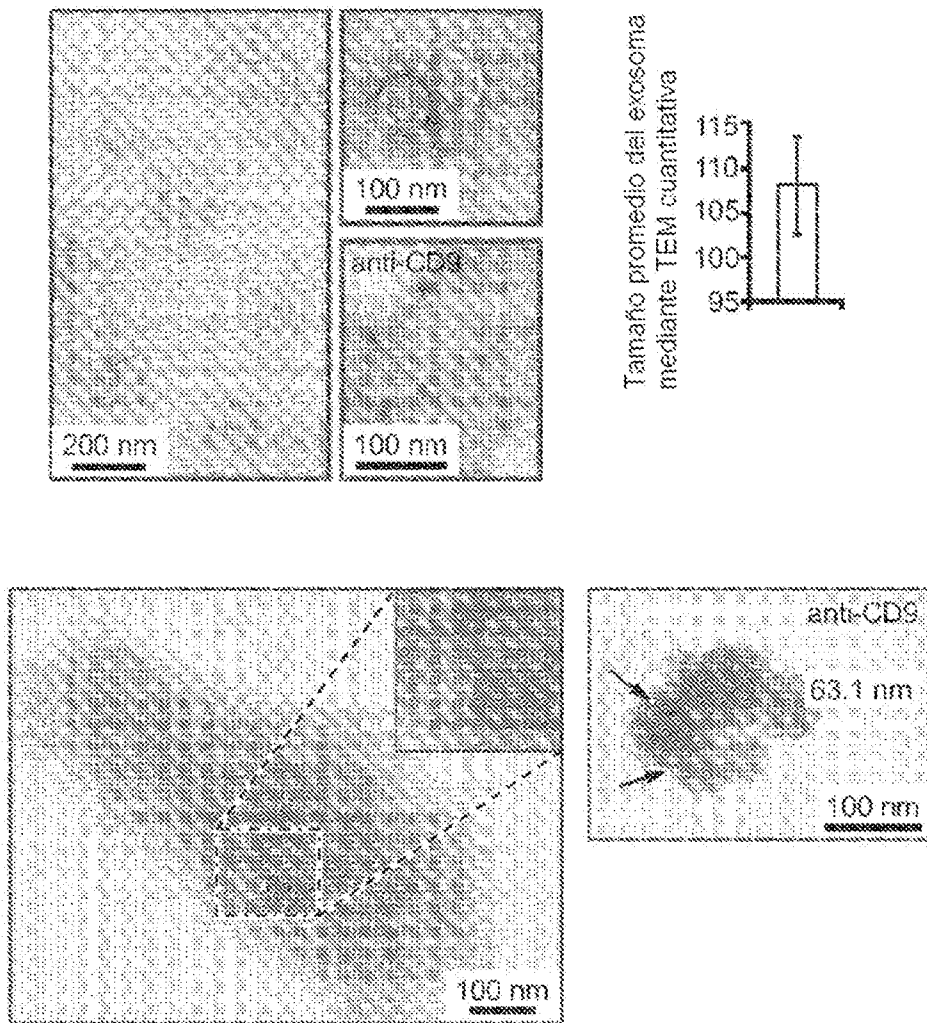


FIG.1A

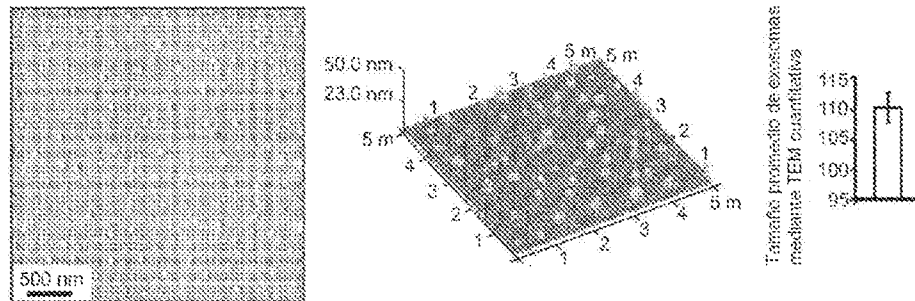


FIG.1B

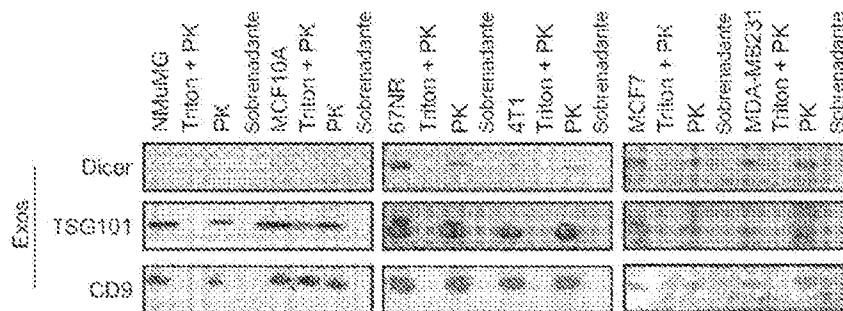


FIG.1C

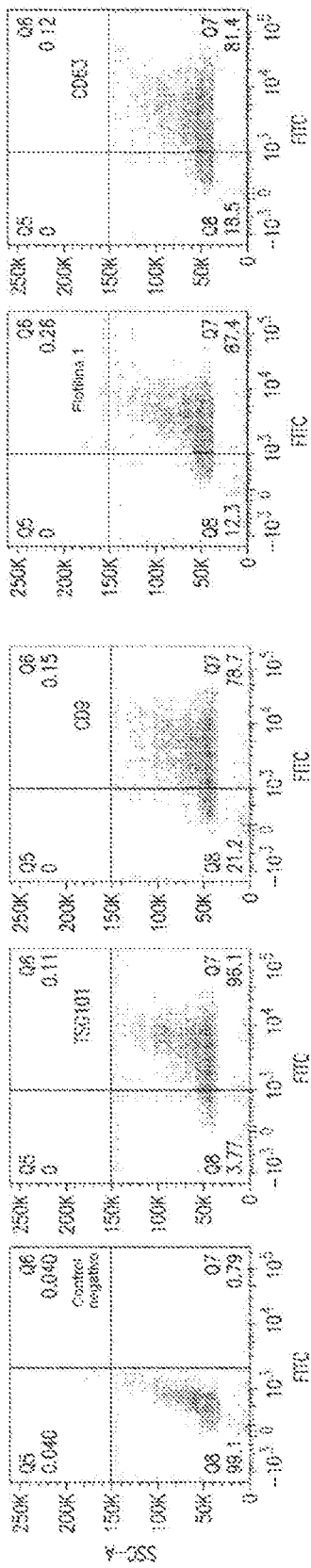


FIG.1D

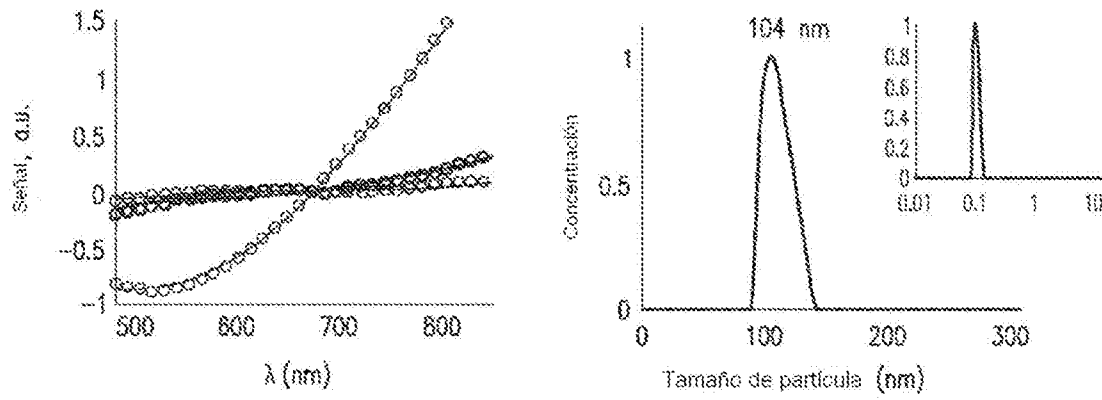


FIG.1E

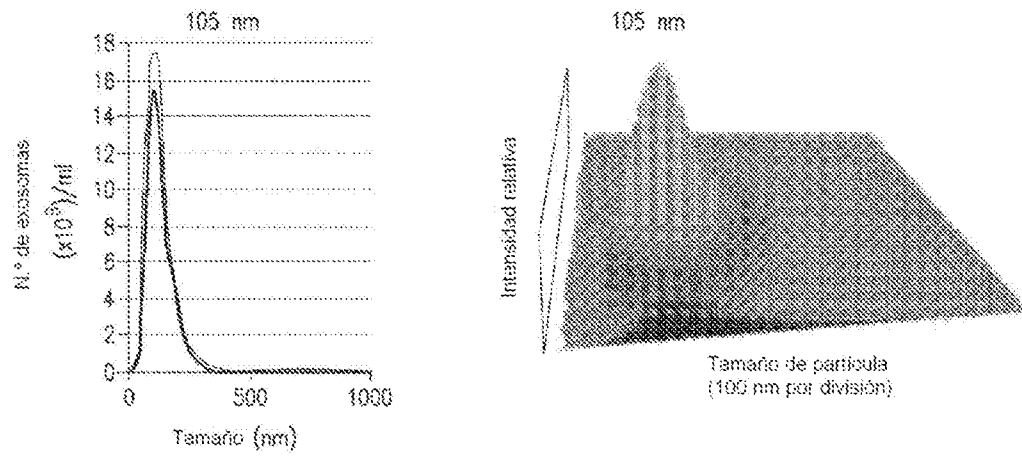


FIG.1F

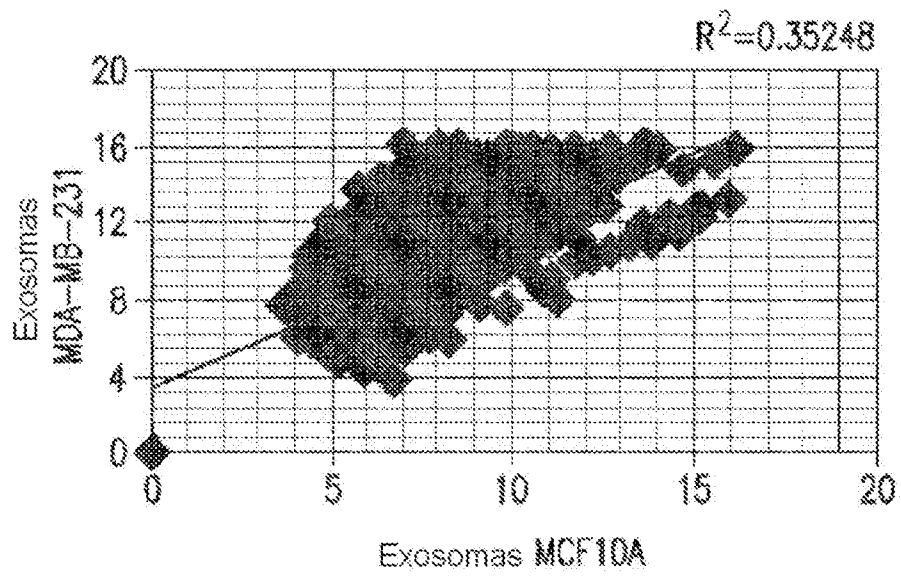


FIG.2A

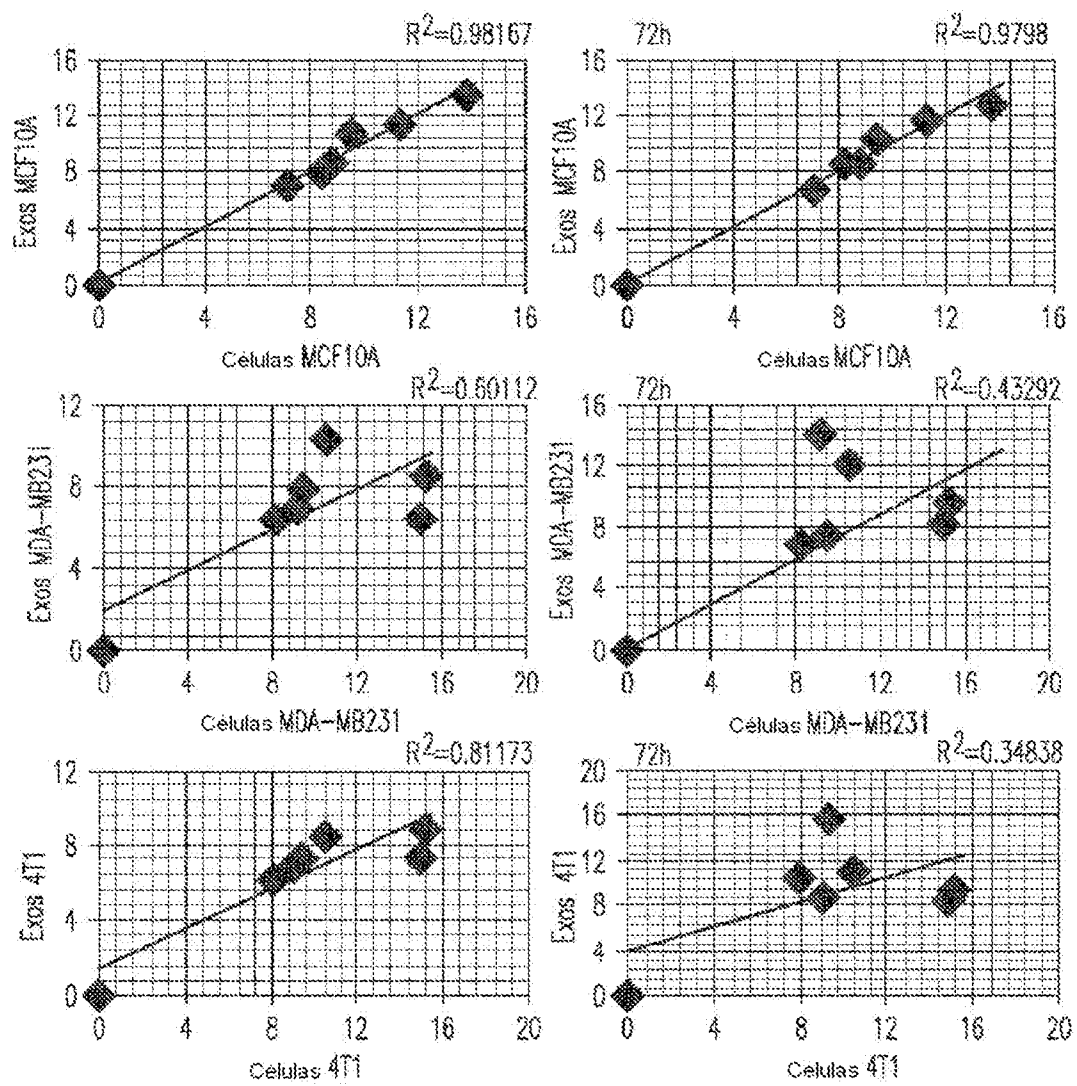


FIG.2B

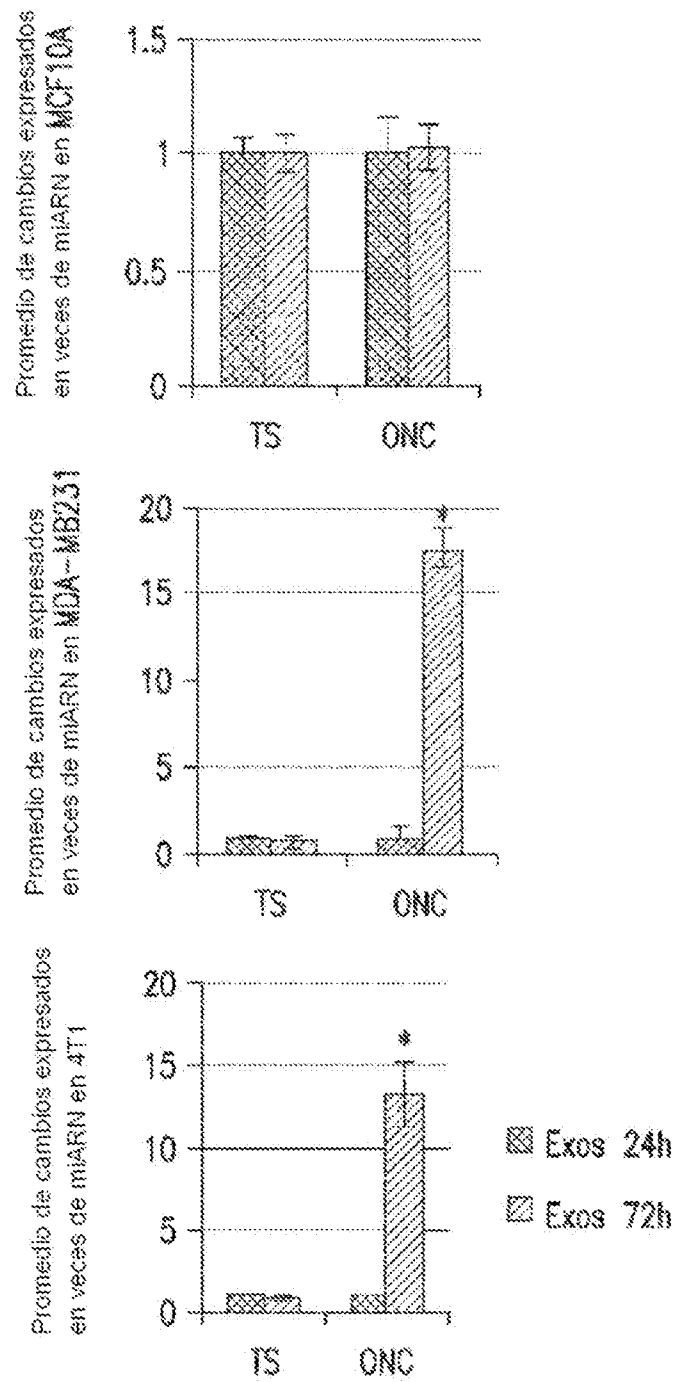


FIG.2C

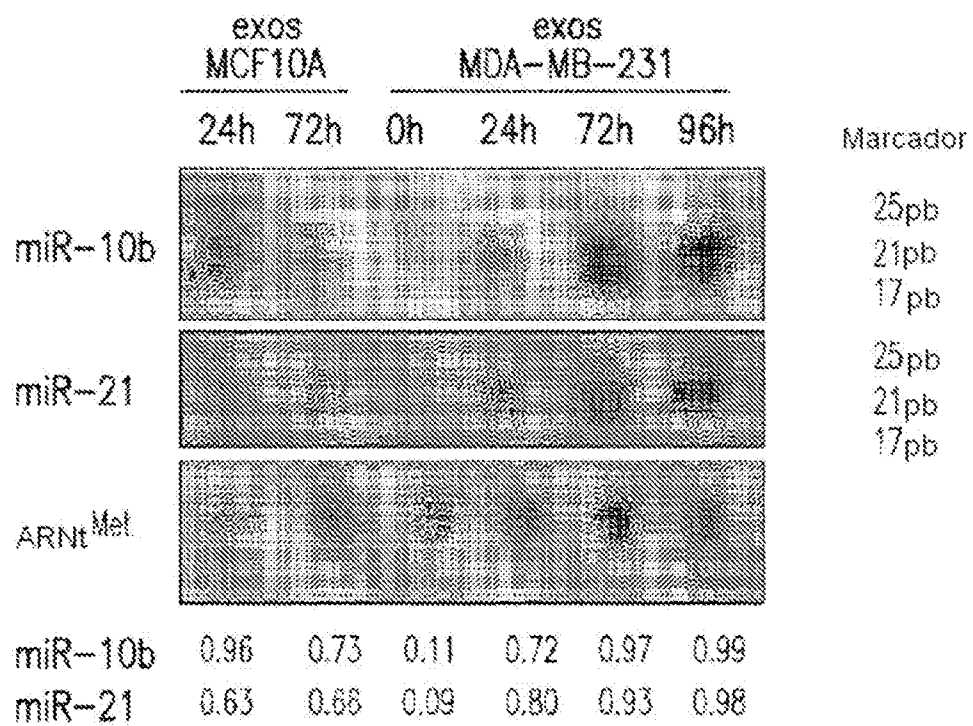


FIG.2D

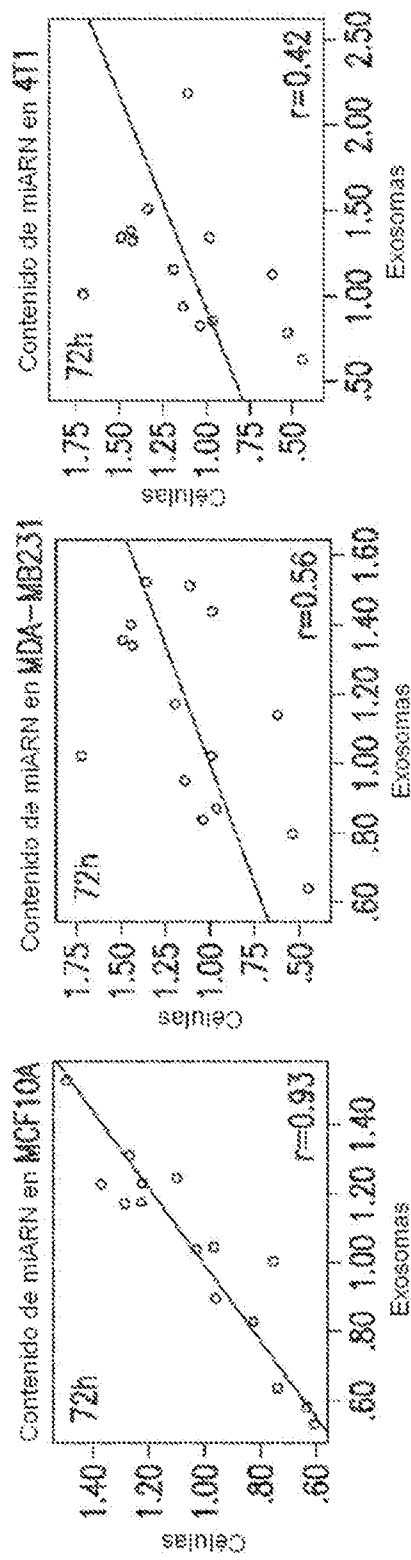


FIG. 2E

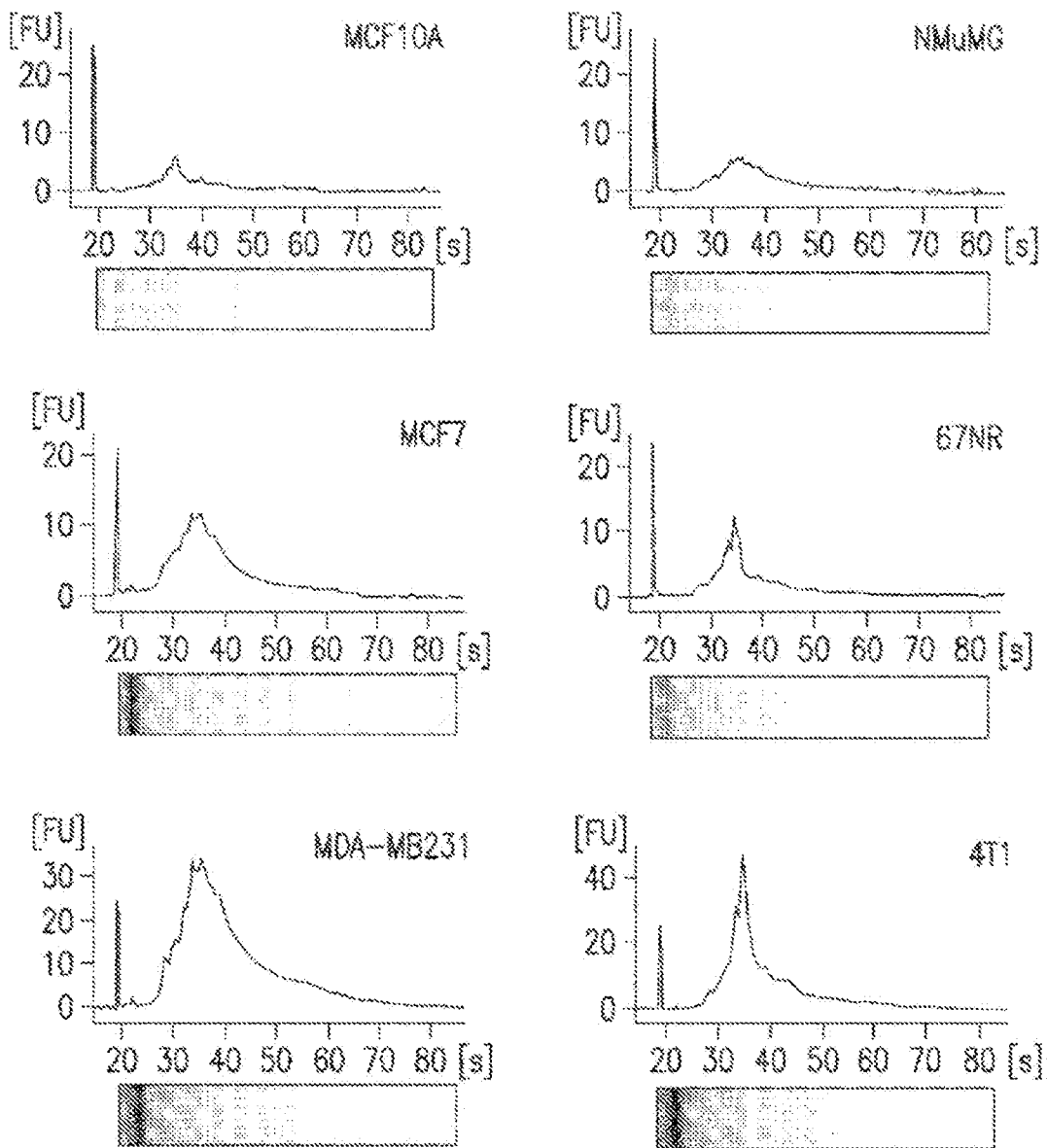


FIG.2F

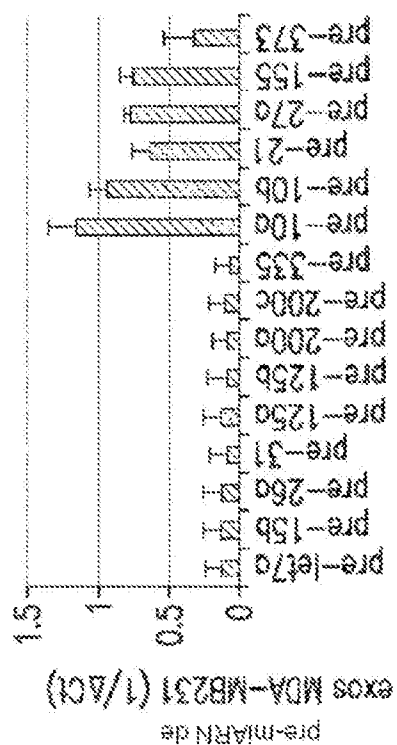


FIG. 3A

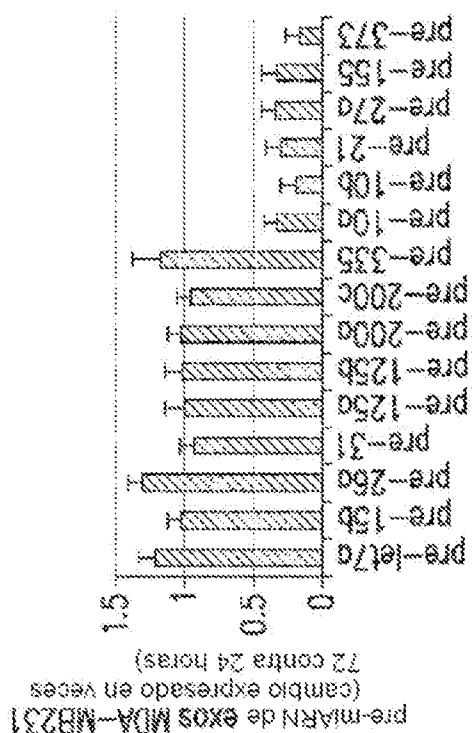
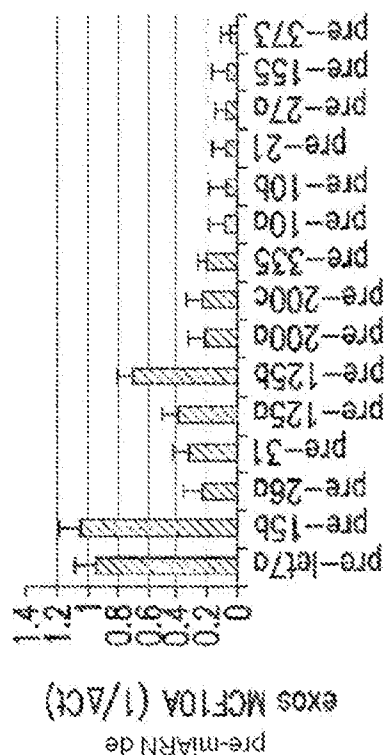
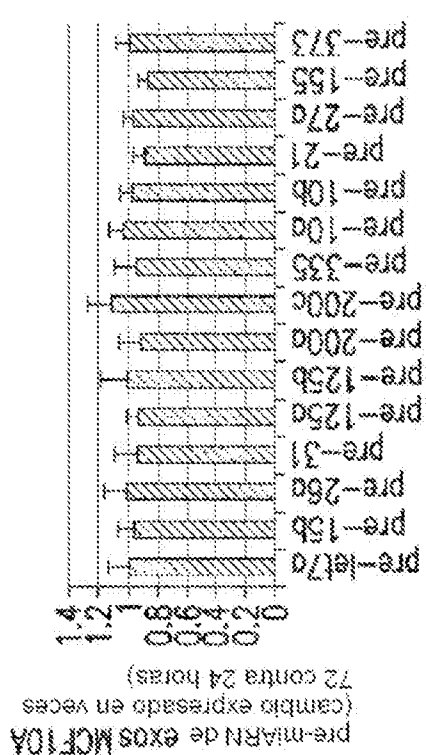


FIG. 3B



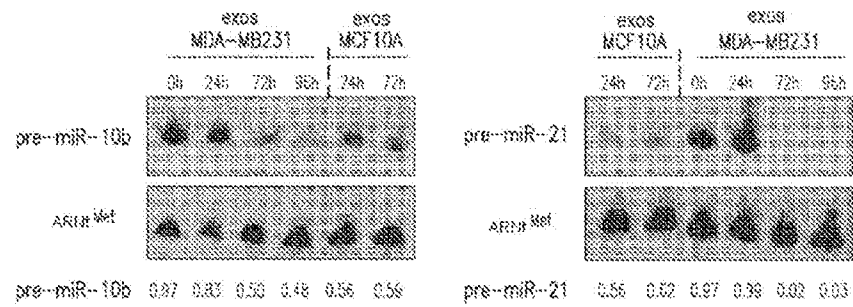


FIG.3C

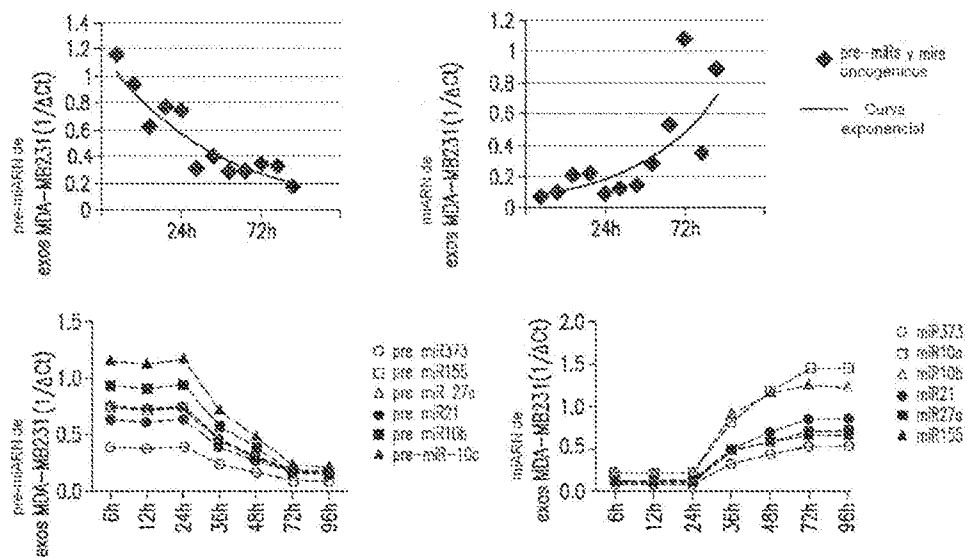


FIG.3D

□ pre-let7a
 □ pre-miR15b
 □ pre-miR26a
 □ pre-miR31
 □ pre-miR125a
 □ pre-miR125b
 □ pre-miR200a
 □ pre-miR200c
 □ pre-miR335
 □ pre-miR10a
 □ pre-miR10b
 □ pre-miR21
 □ pre-miR27a
 □ pre-miR155
 □ pre-miR373

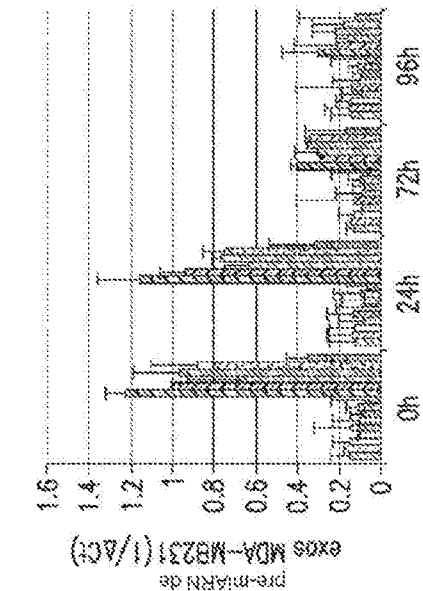
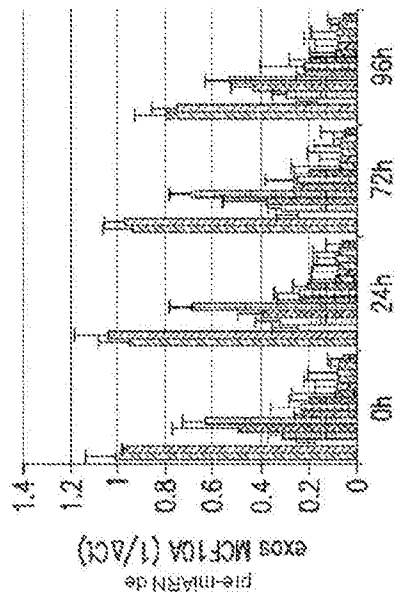


FIG.3E



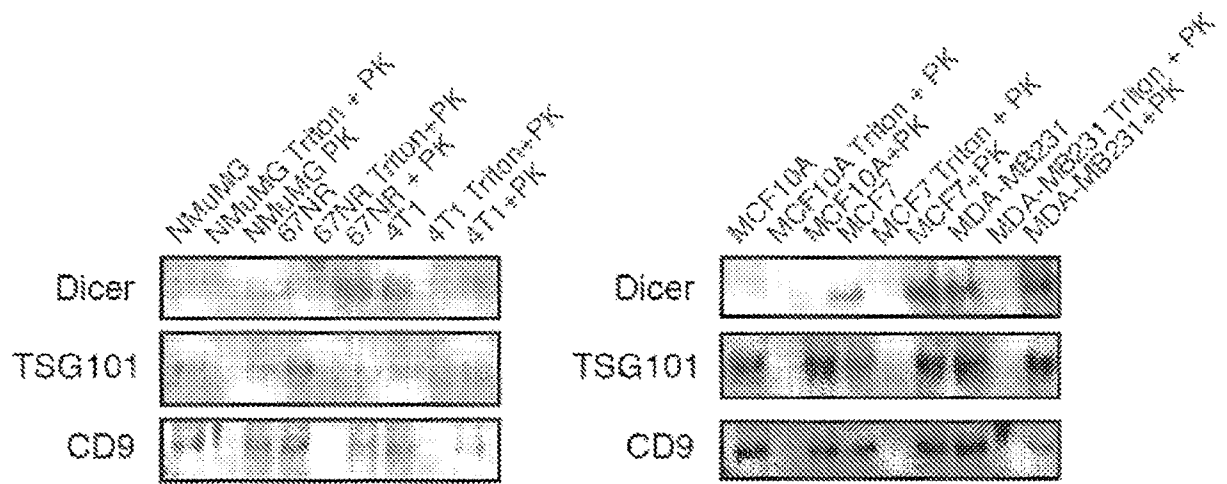


FIG. 4A

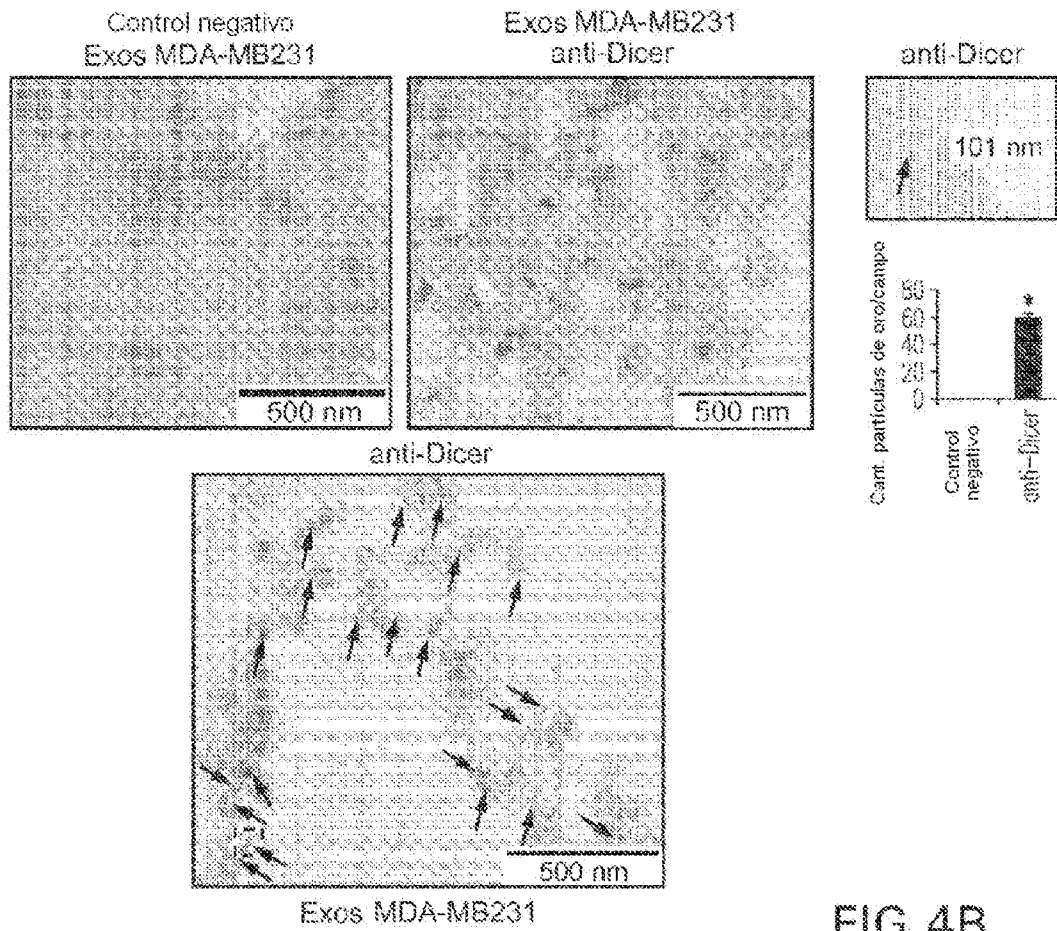


FIG.4B

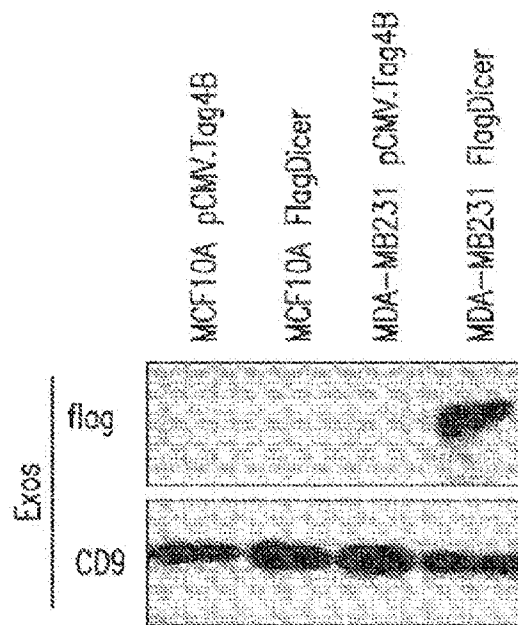


FIG.4C

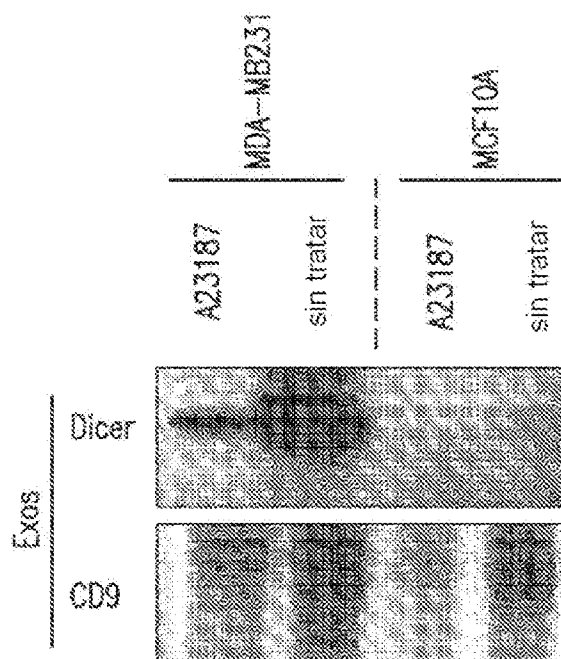


FIG.4D

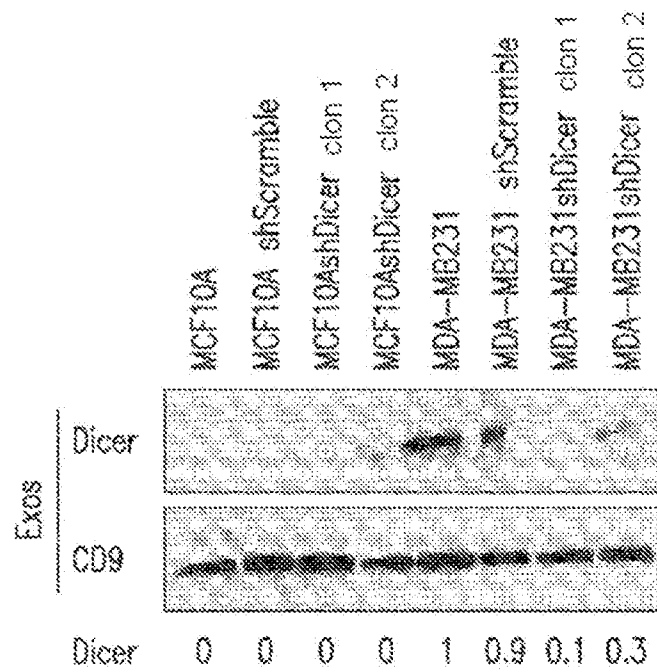


FIG.4E

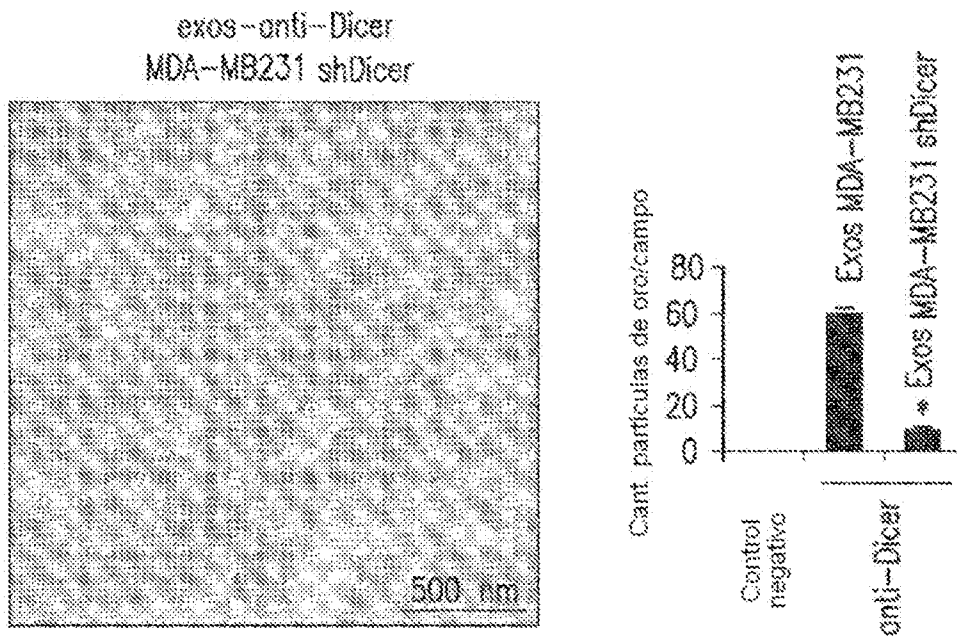


FIG.4F

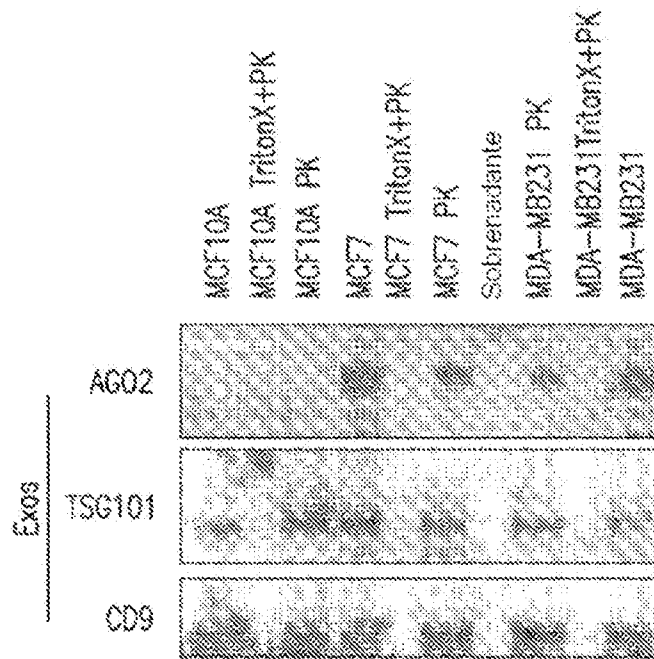


FIG. 4G

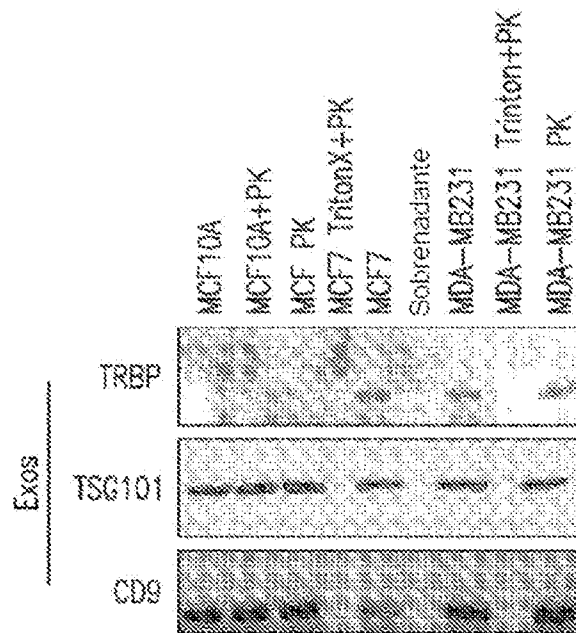


FIG. 4H

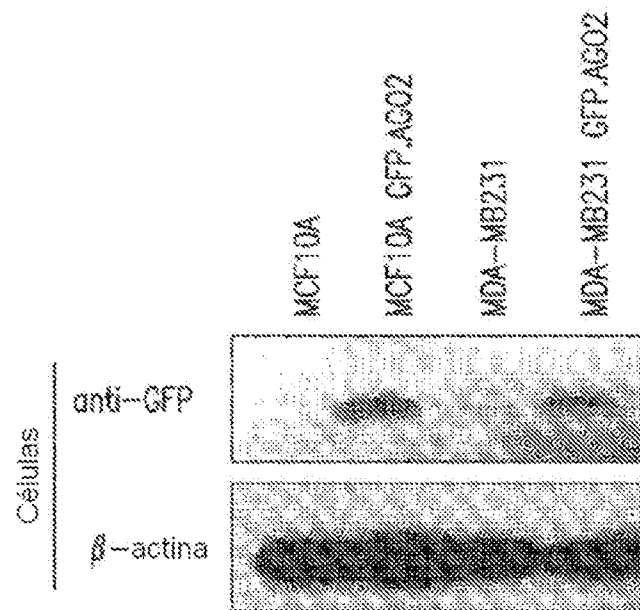


FIG.4I

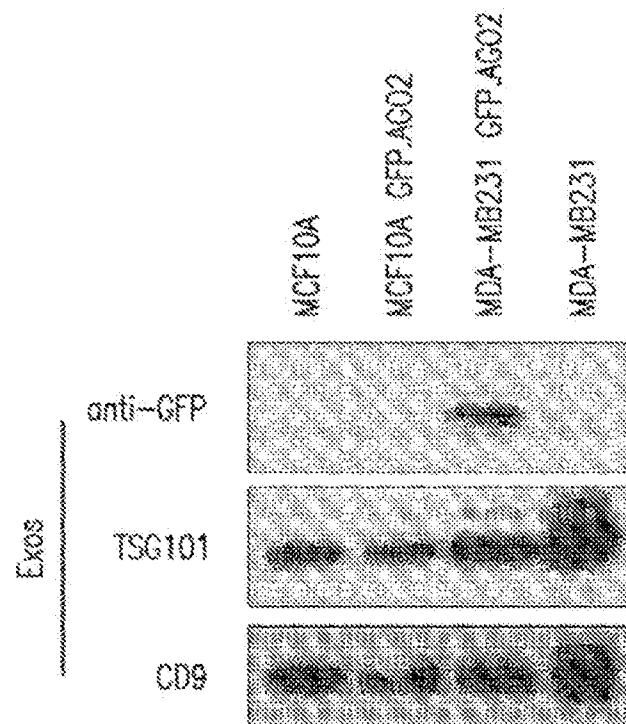


FIG.4J

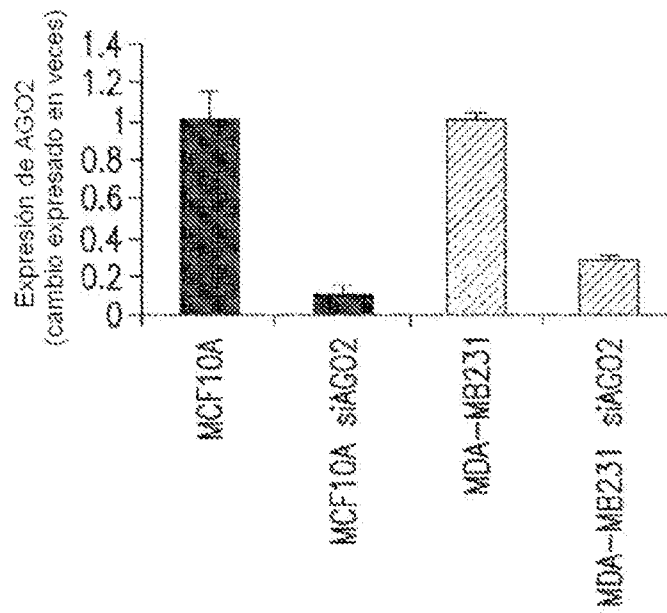


FIG.4K

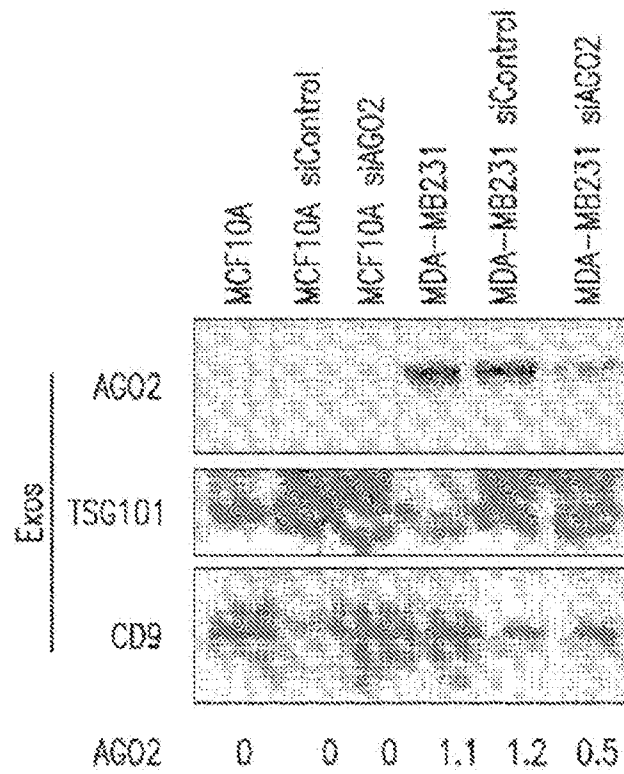


FIG.4L

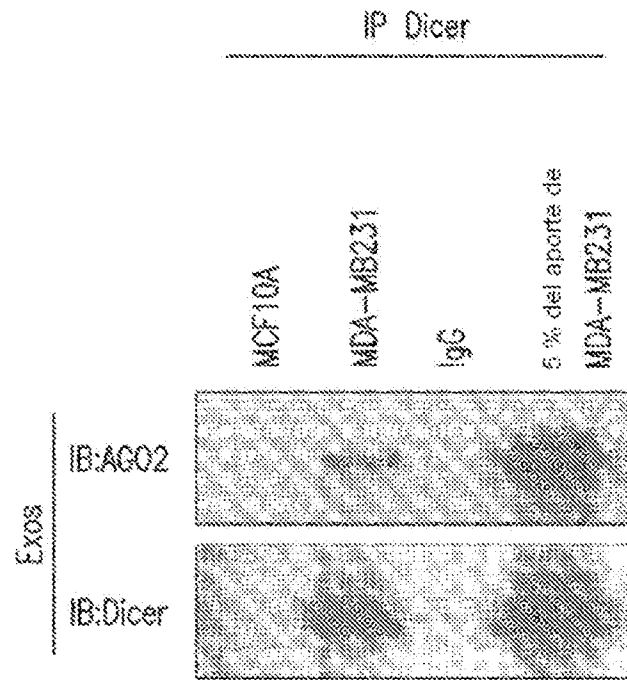


FIG. 4M

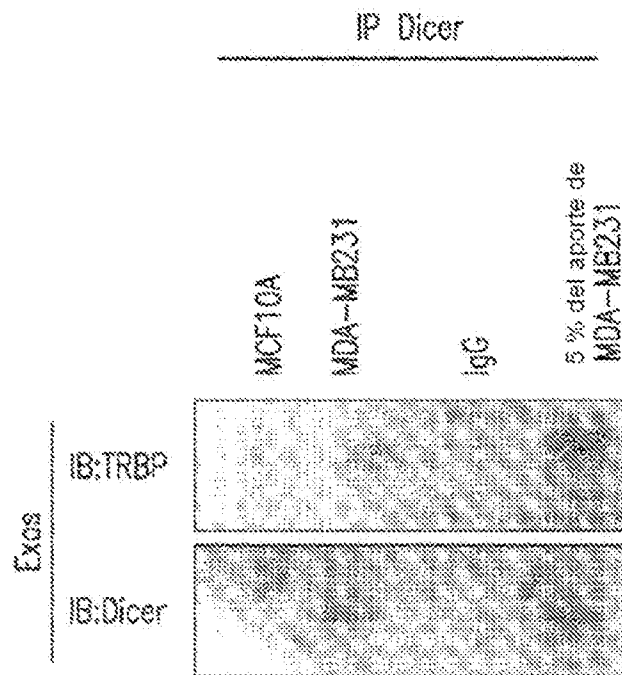


FIG. 4N

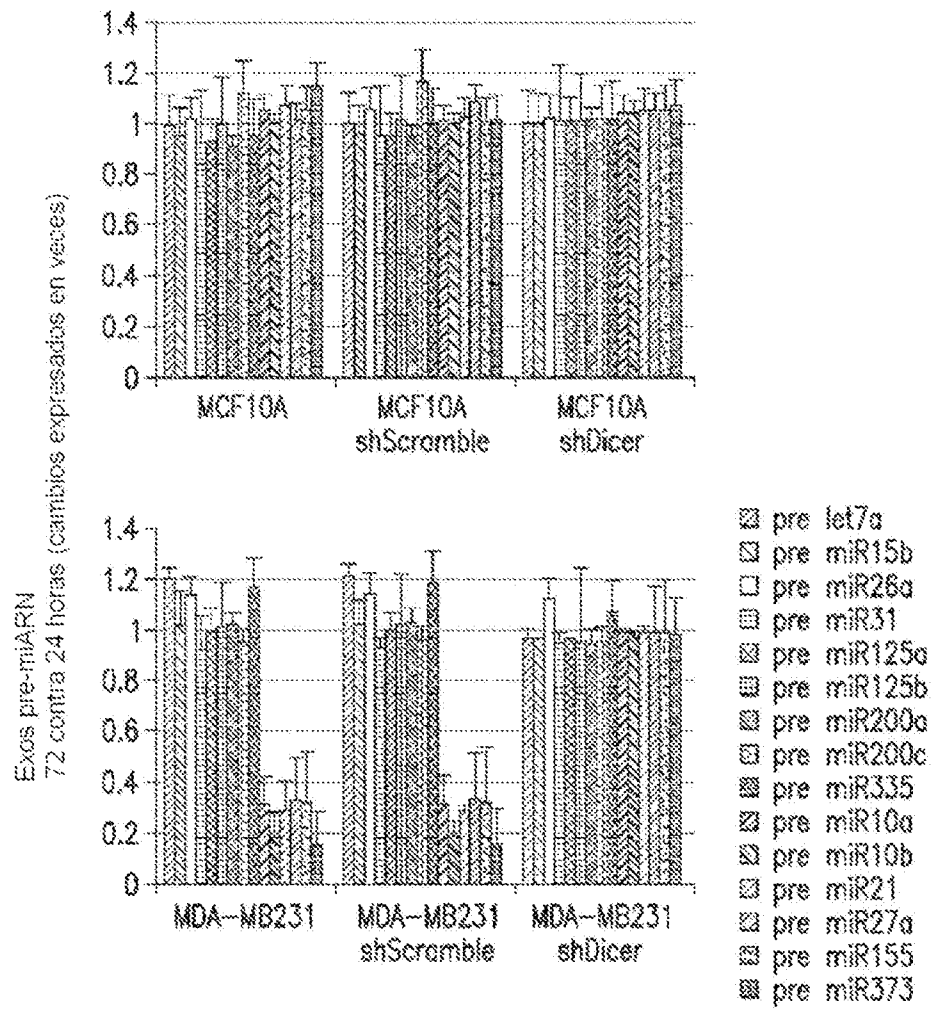


FIG.5A

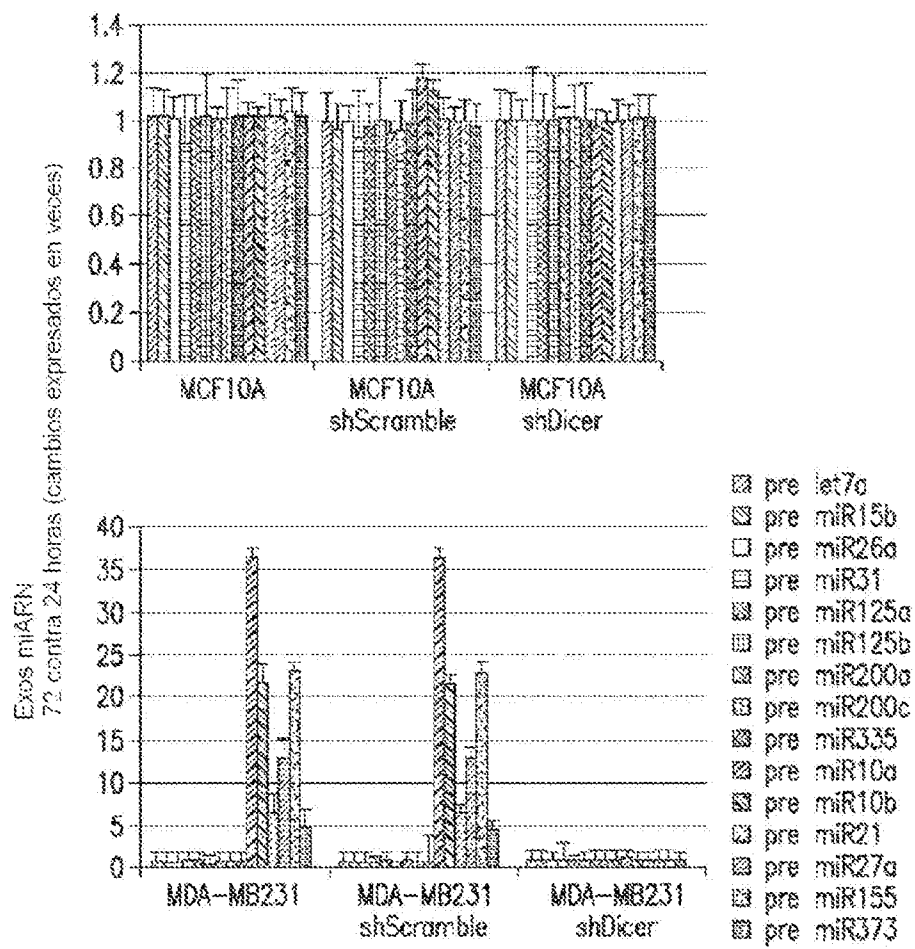


FIG.5B

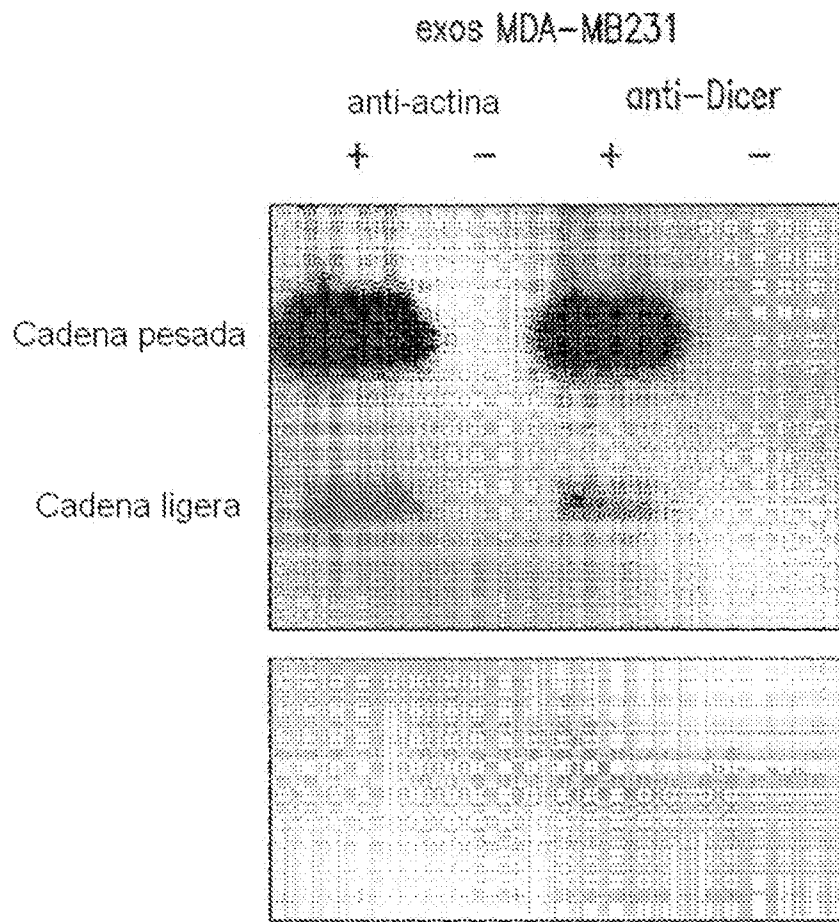


FIG.5C

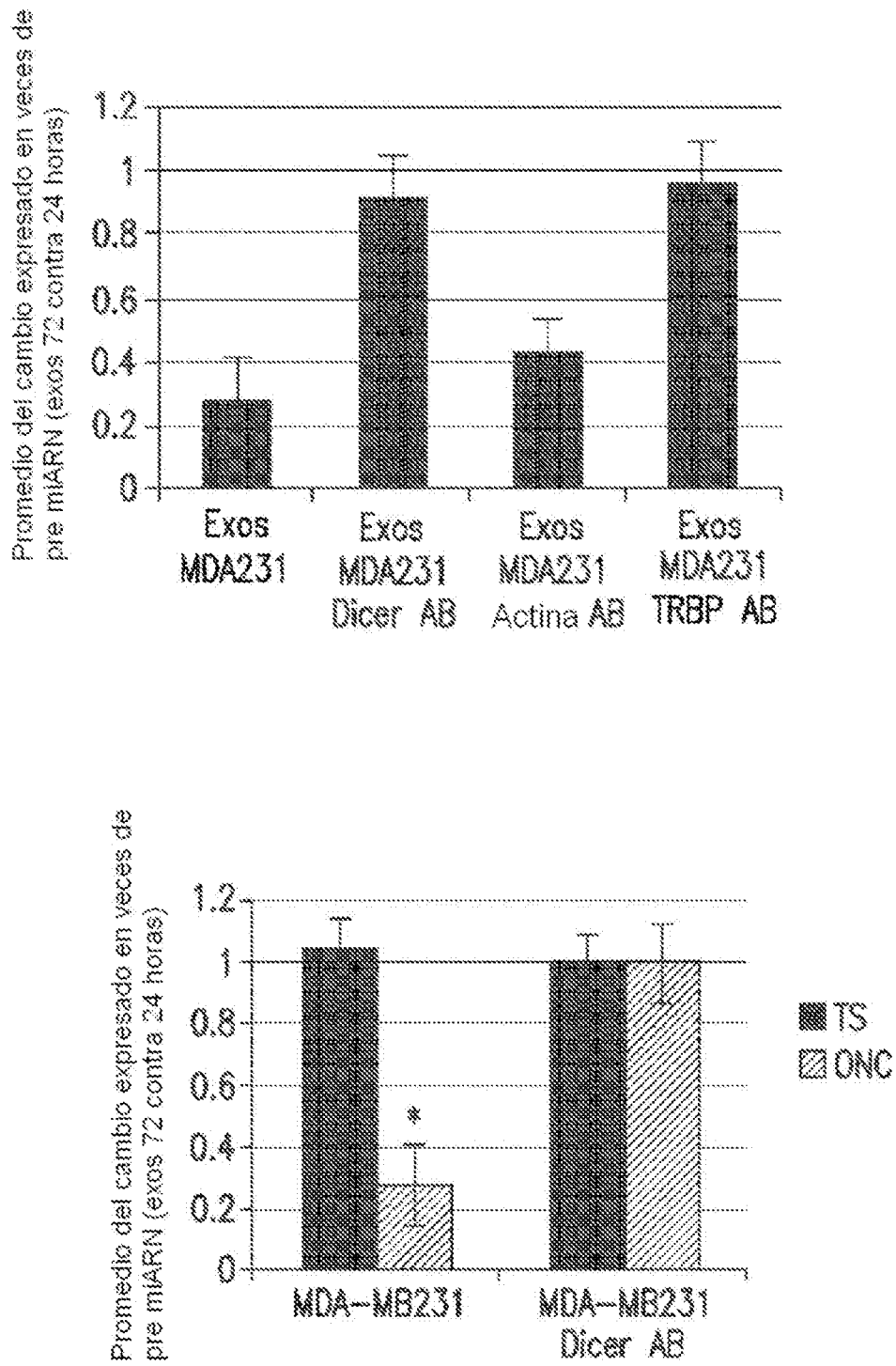
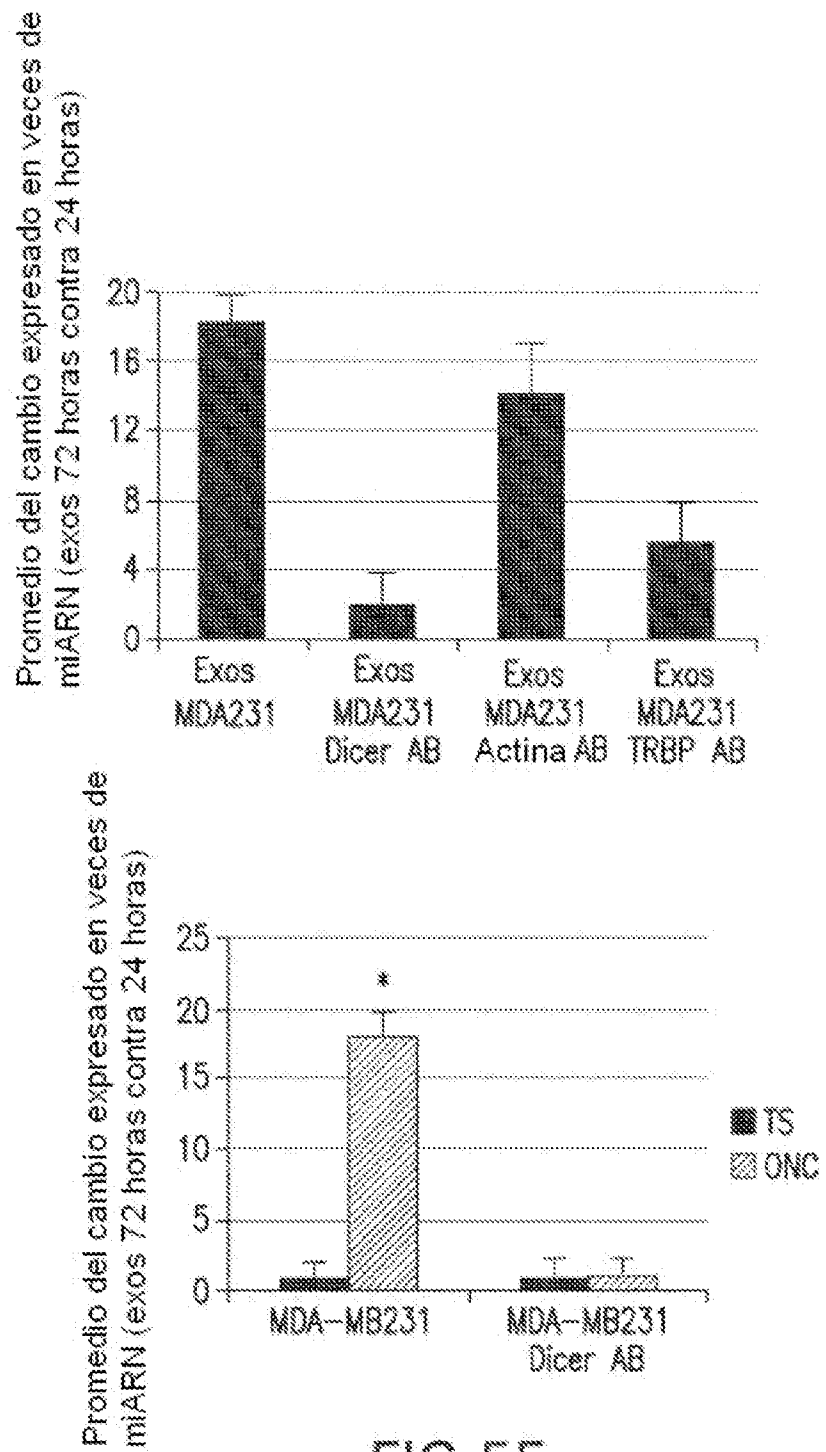


FIG.5D



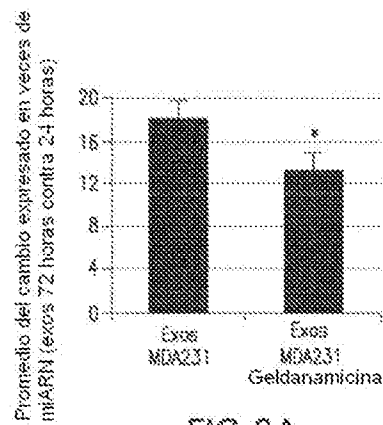


FIG.6A

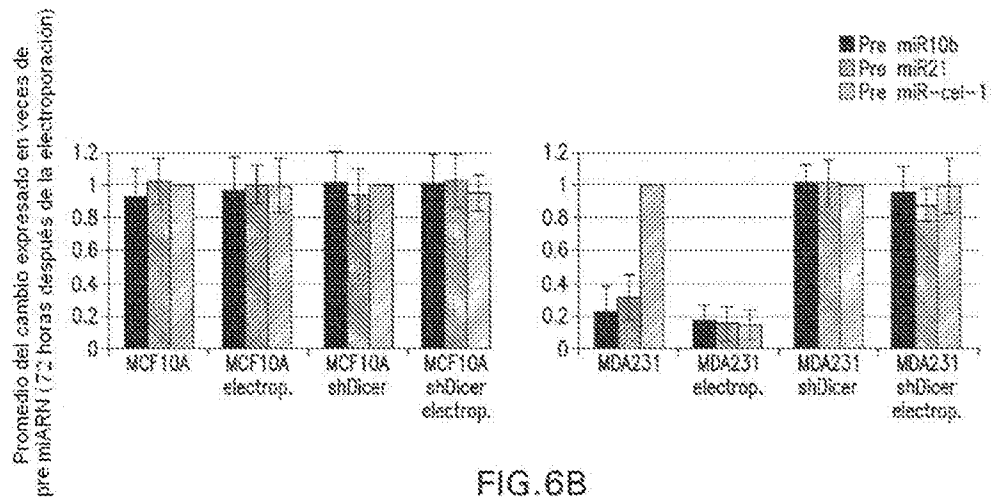


FIG.6B

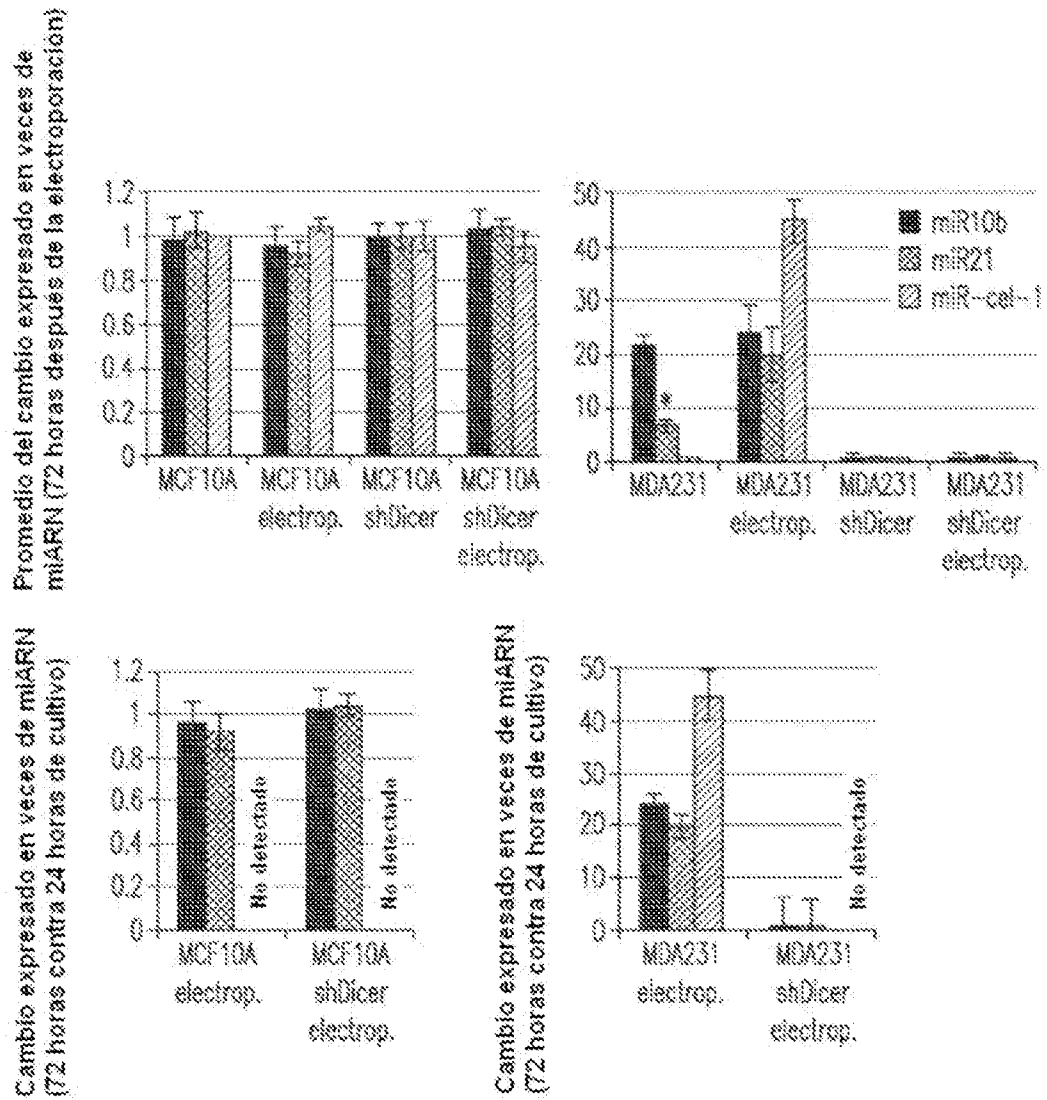
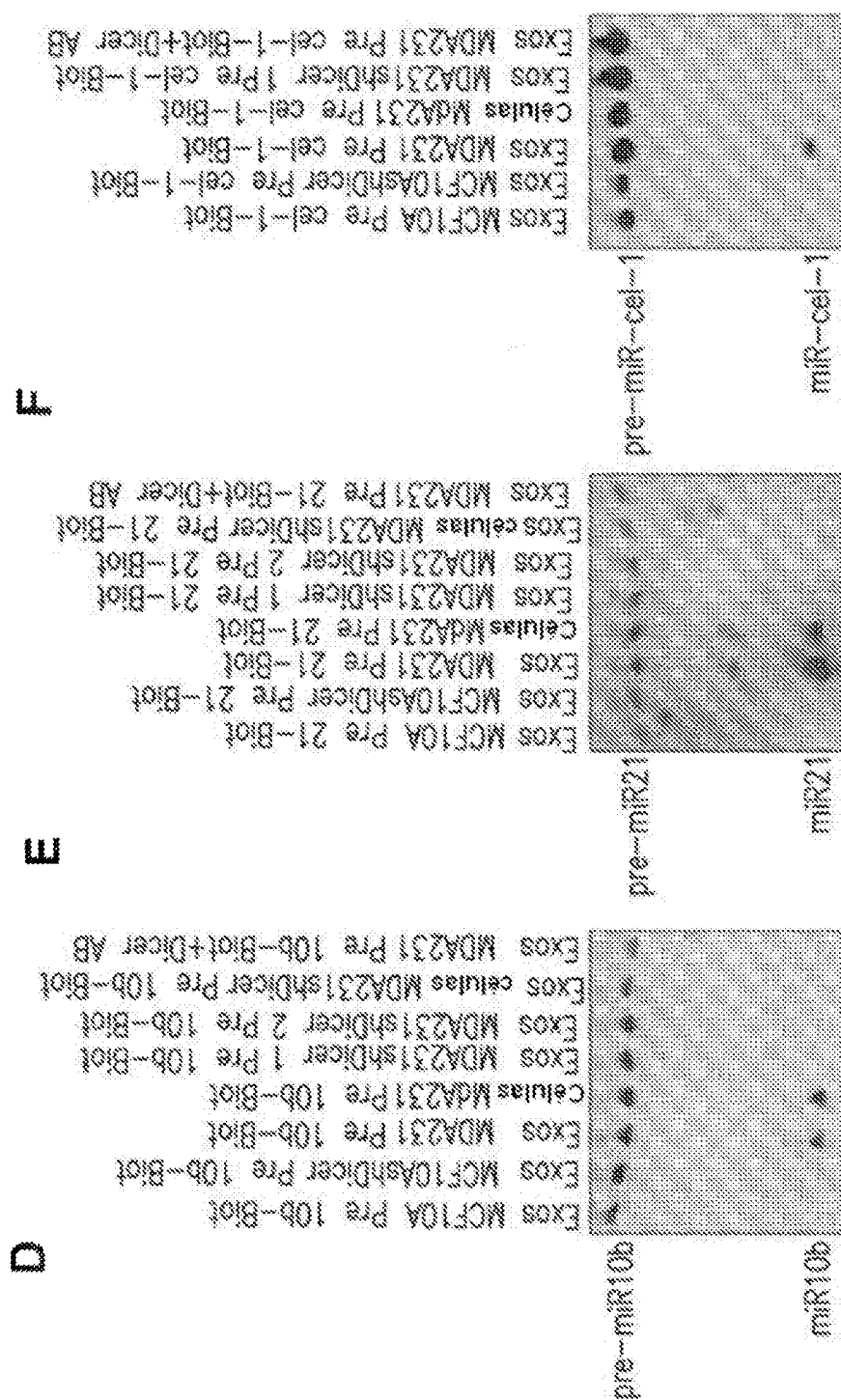


FIG. 6C



FIGs. 6D-F

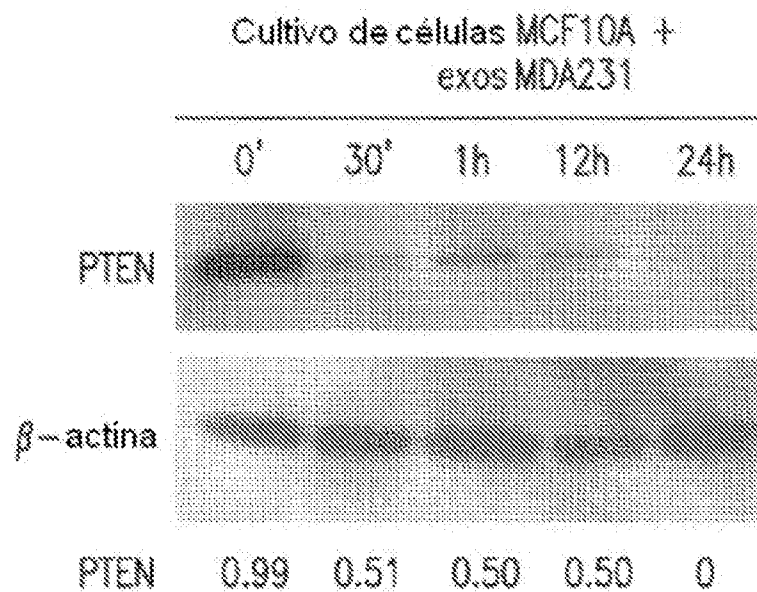


FIG.7A

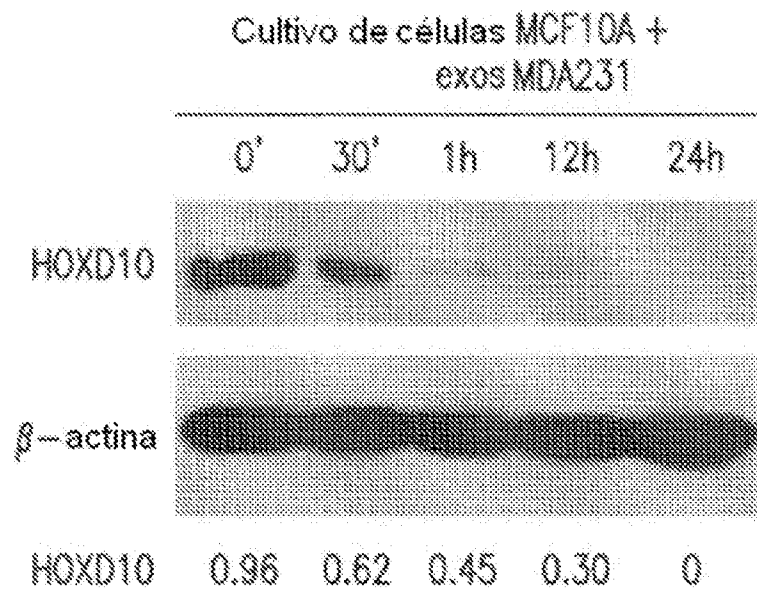


FIG.7B

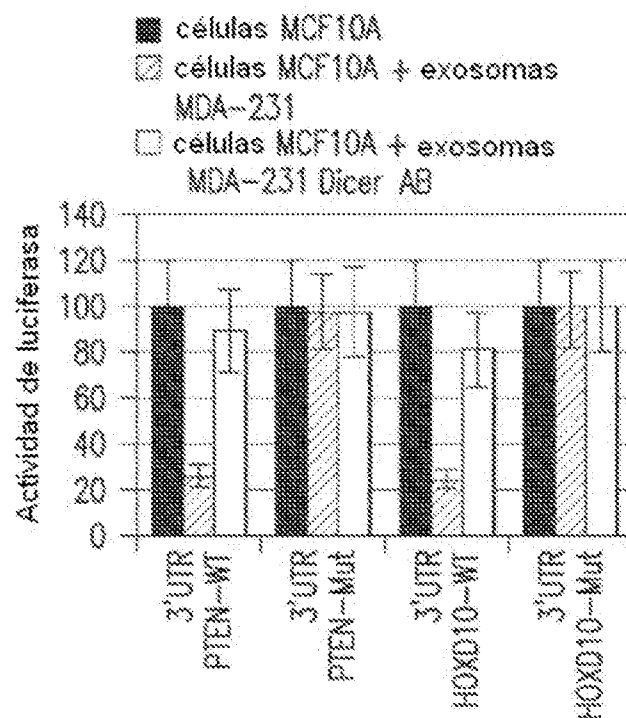


FIG. 7C

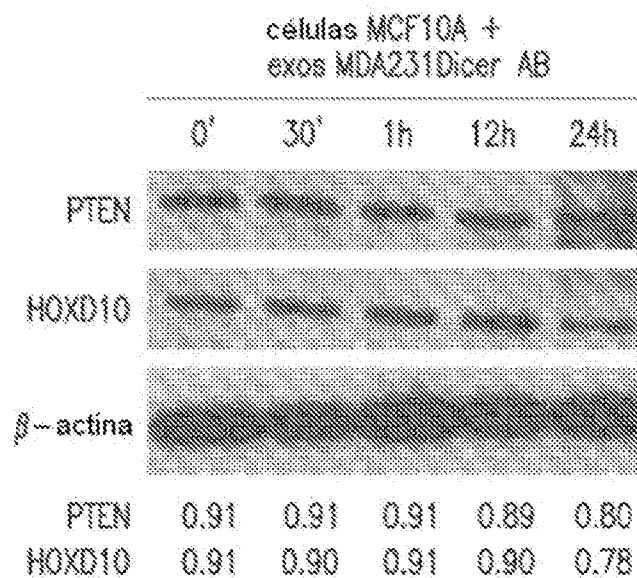


FIG. 7D

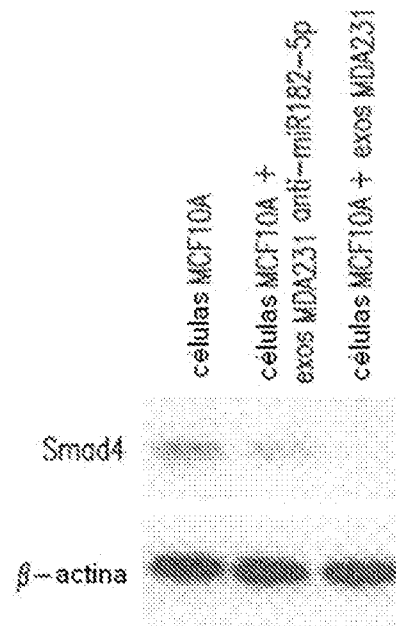


FIG.7E

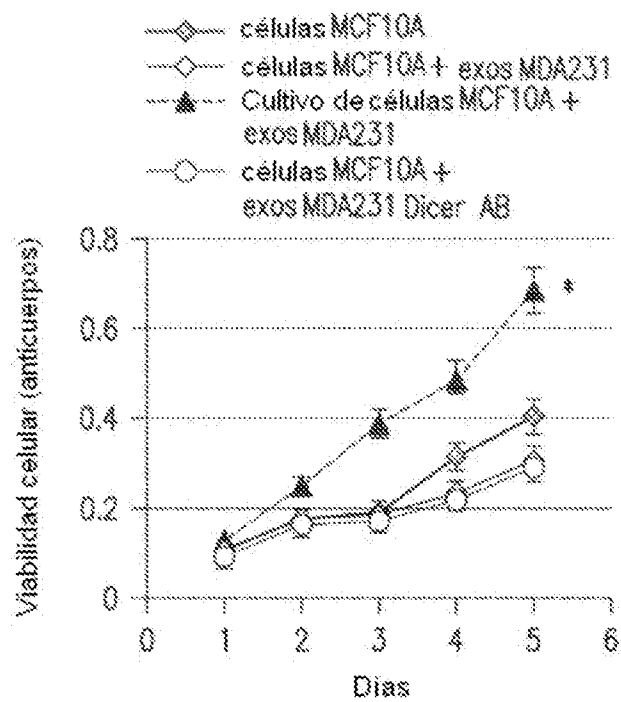


FIG.7F

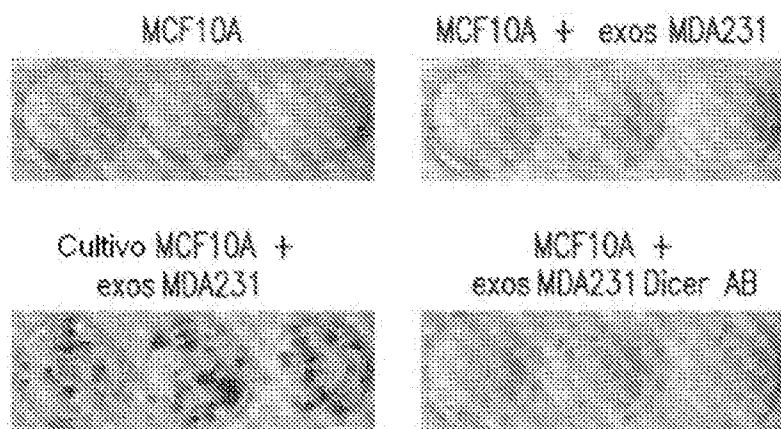


FIG.7G

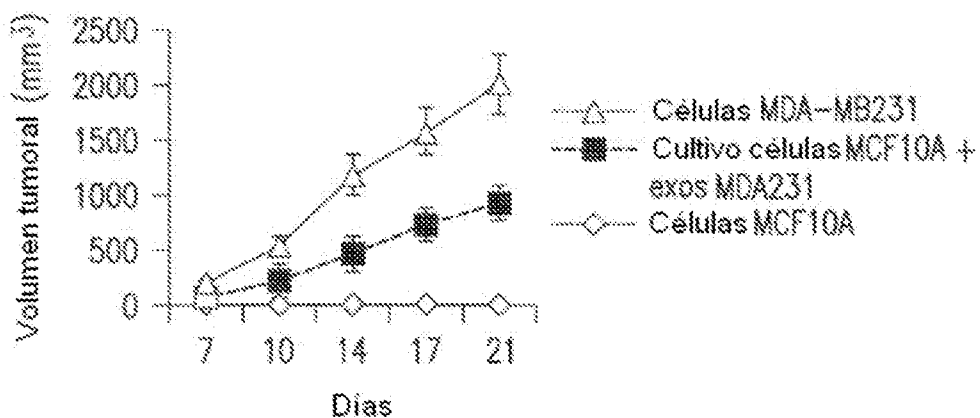
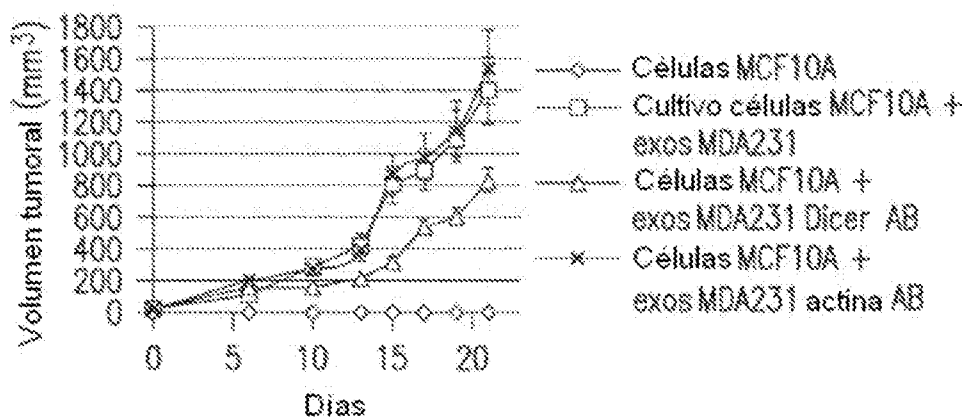


FIG.7H

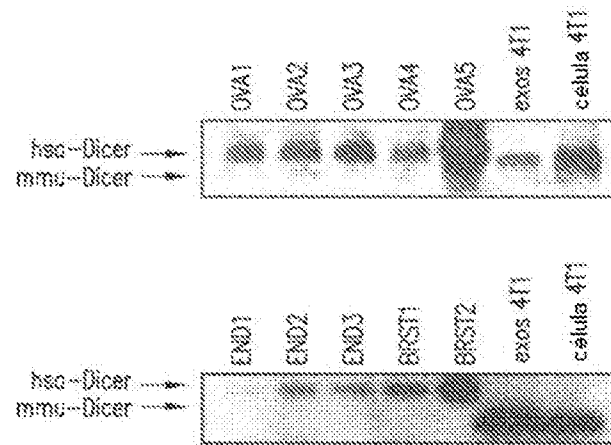


FIG.8A

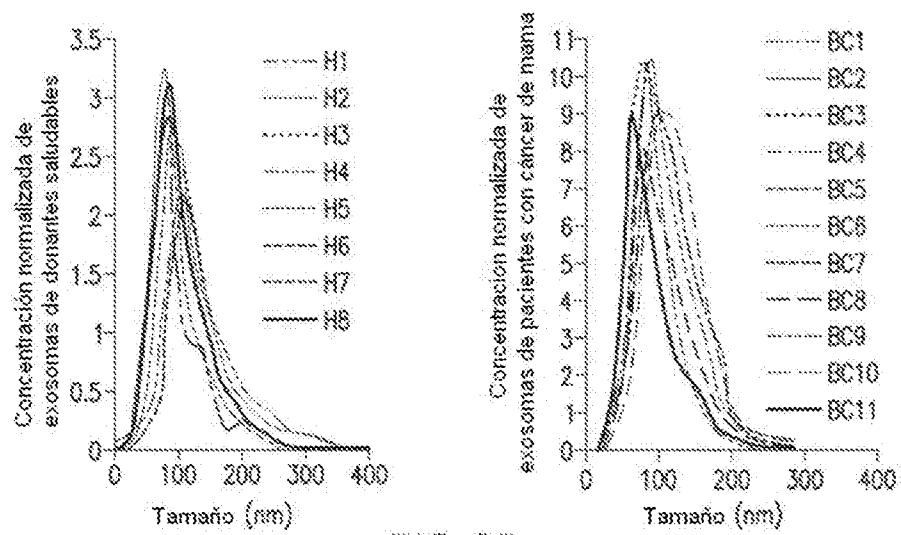
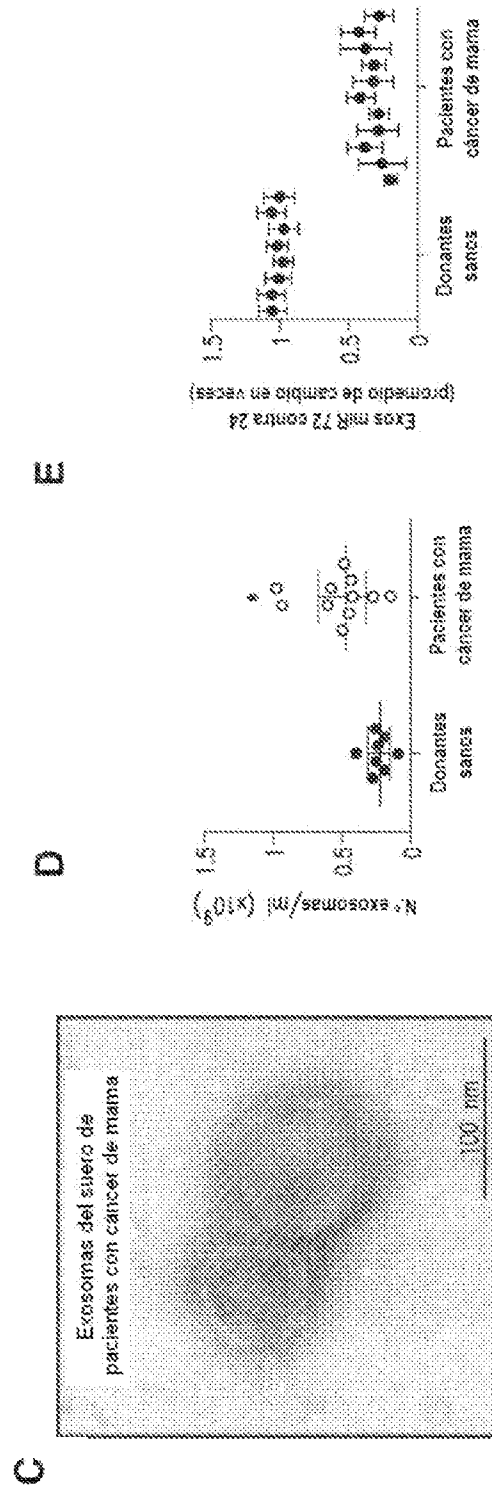
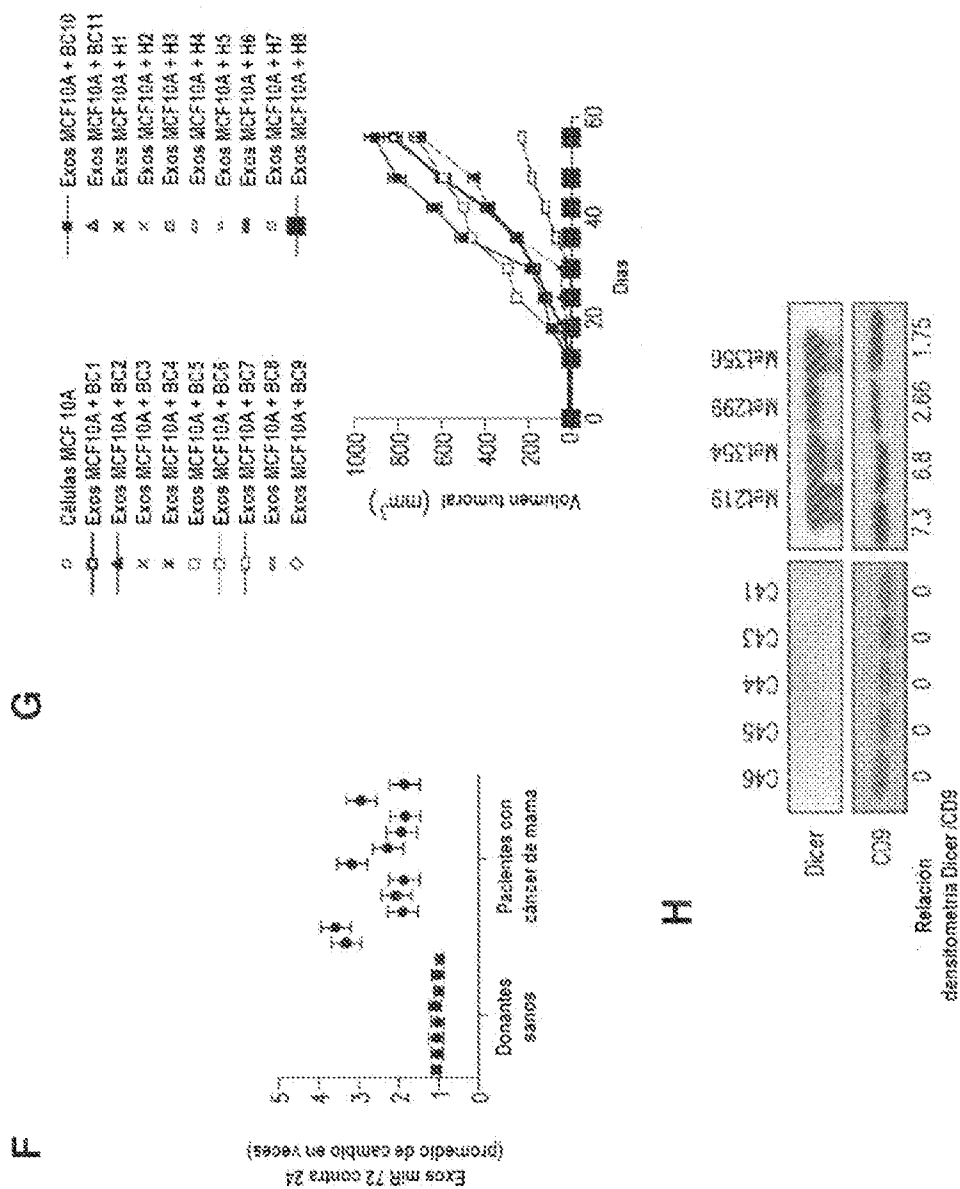


FIG.8B



FIGs. 8C-E



FIGS. 8F-H

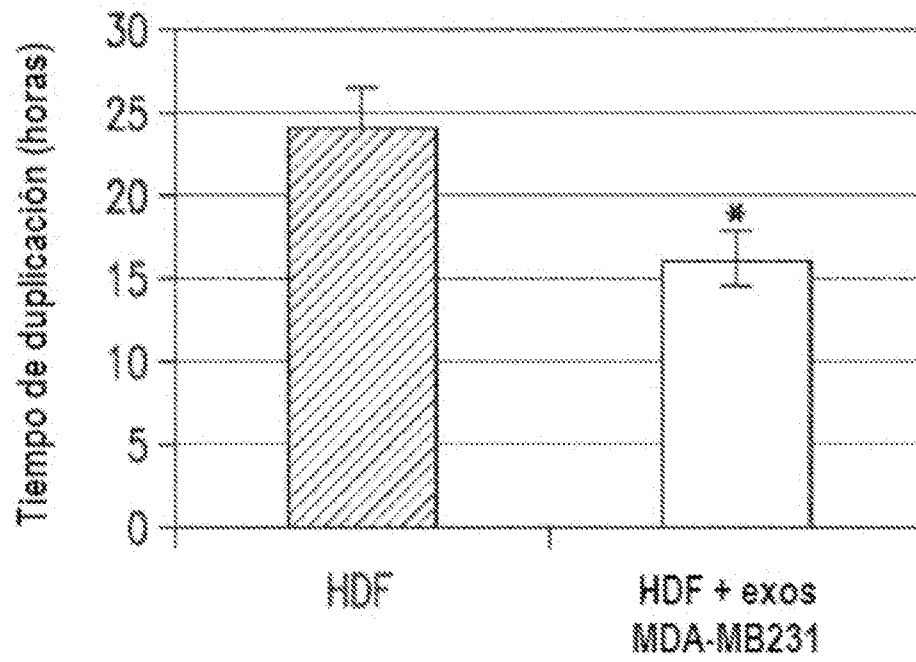


FIG.8I

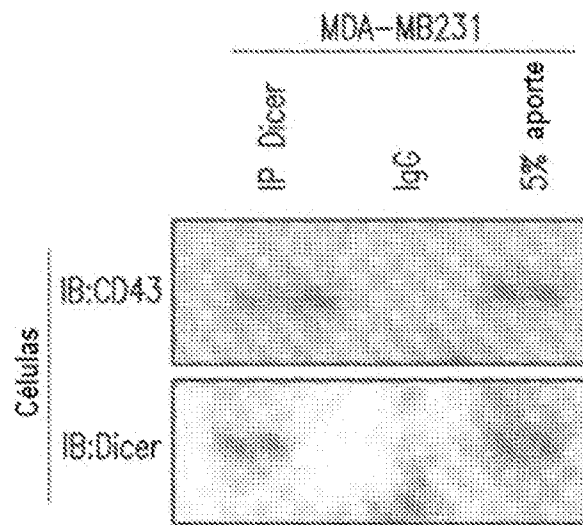


FIG.9A

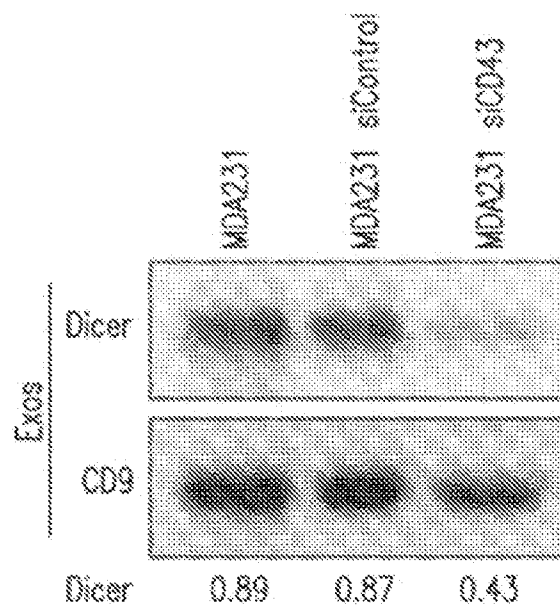


FIG.9B

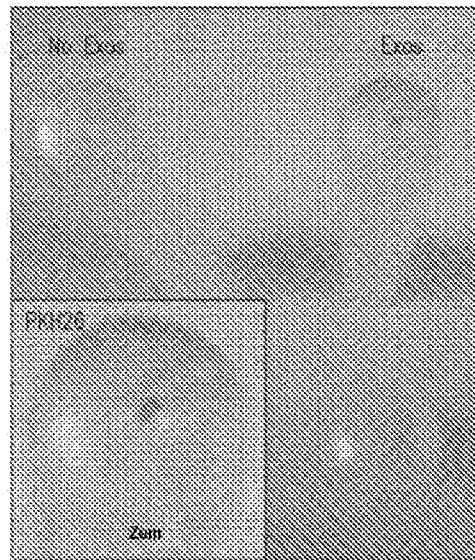


FIG. 10A

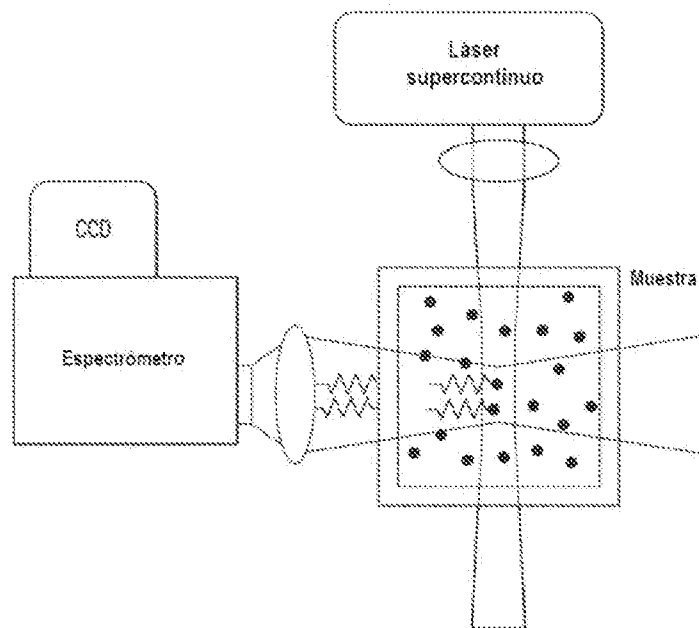


FIG. 10B

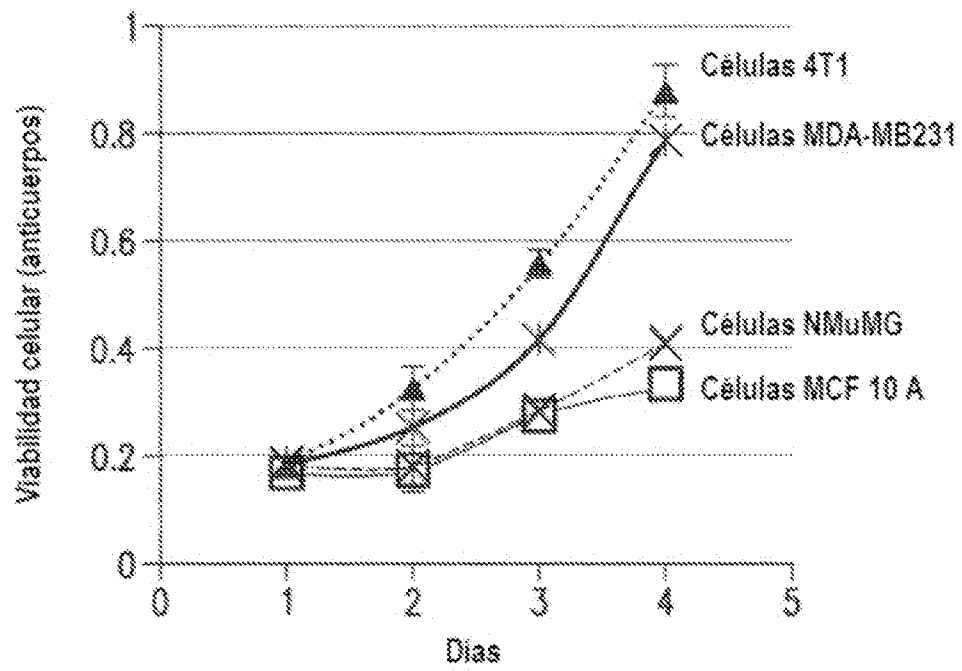


FIG.10C

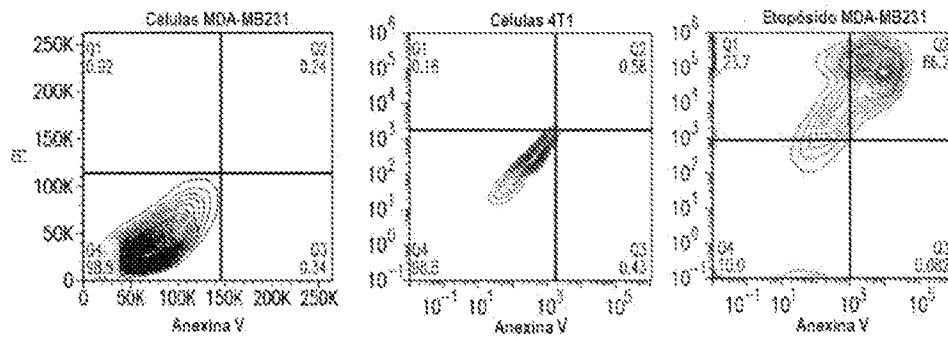


FIG.10D

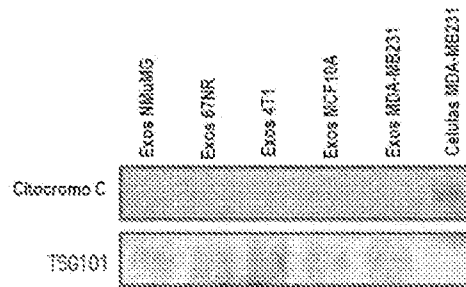


FIG.10E

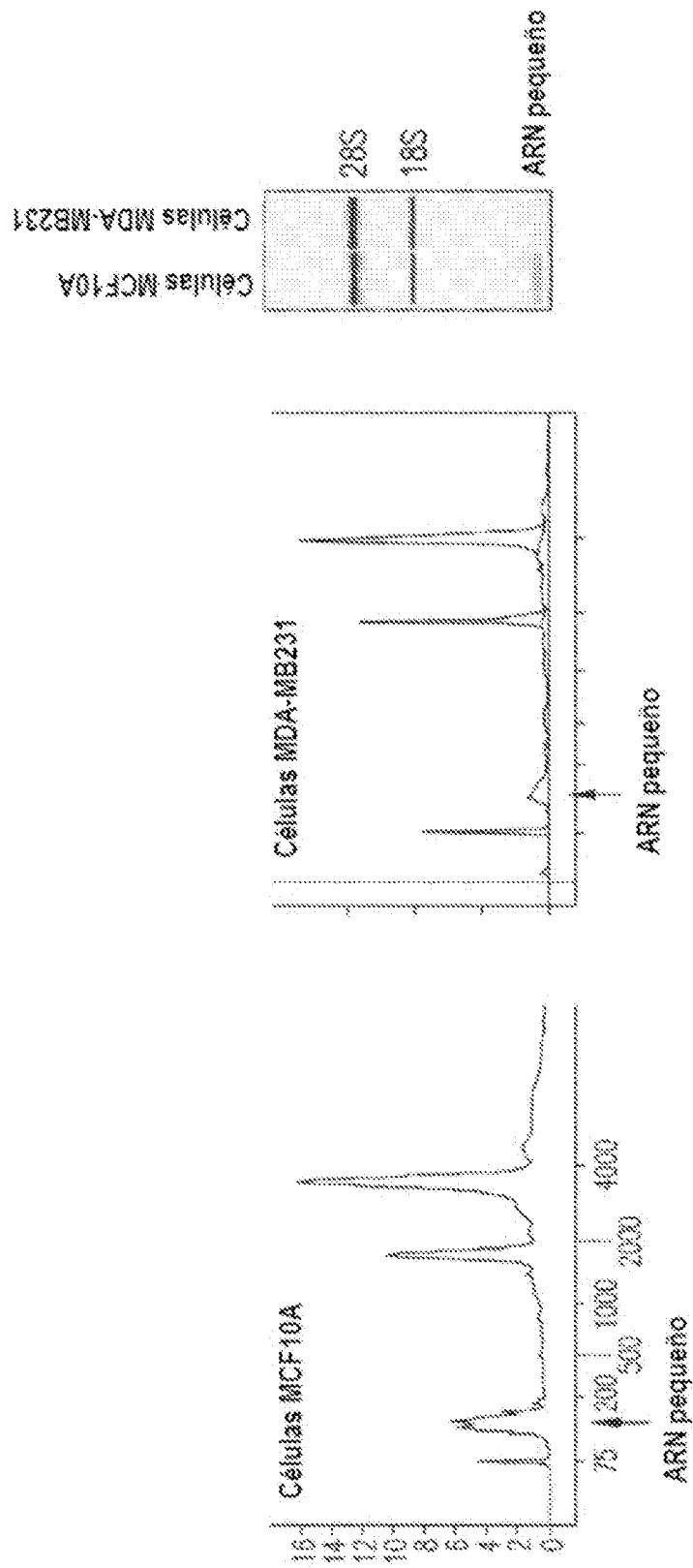


FIG. 11A

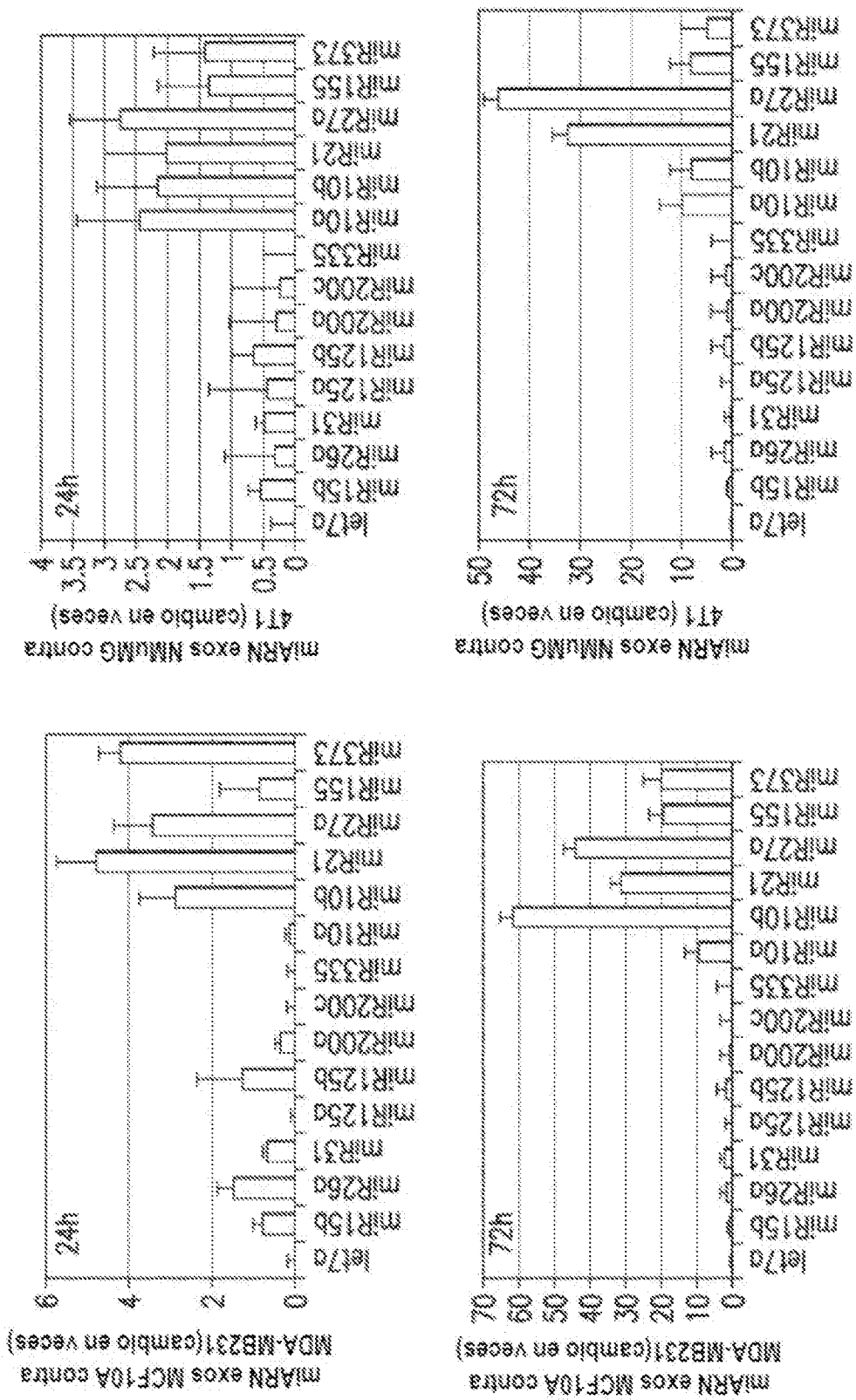


FIG.11B

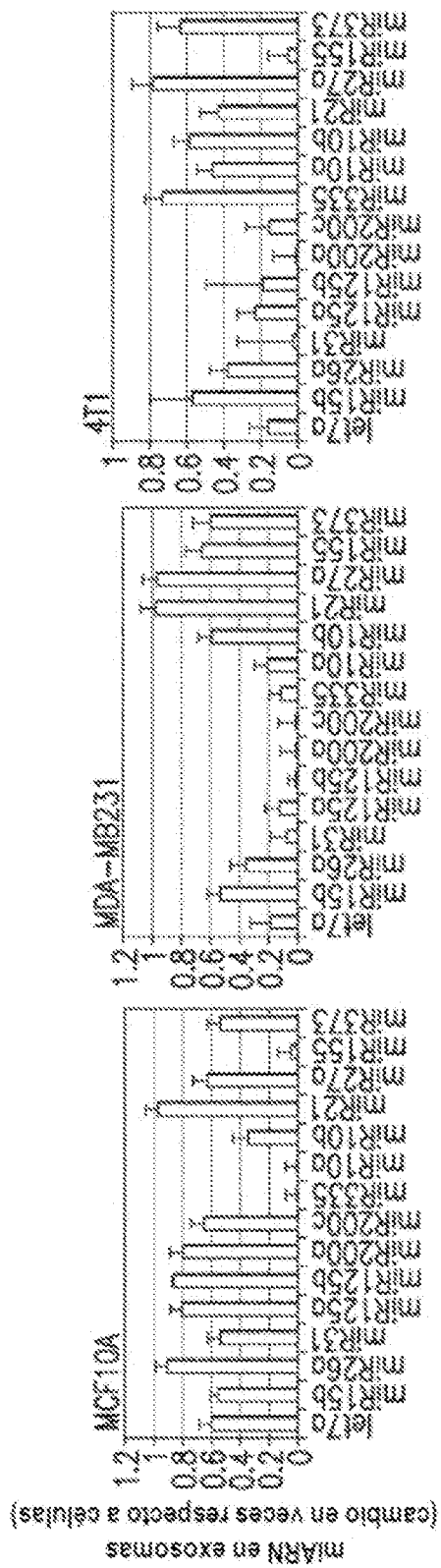
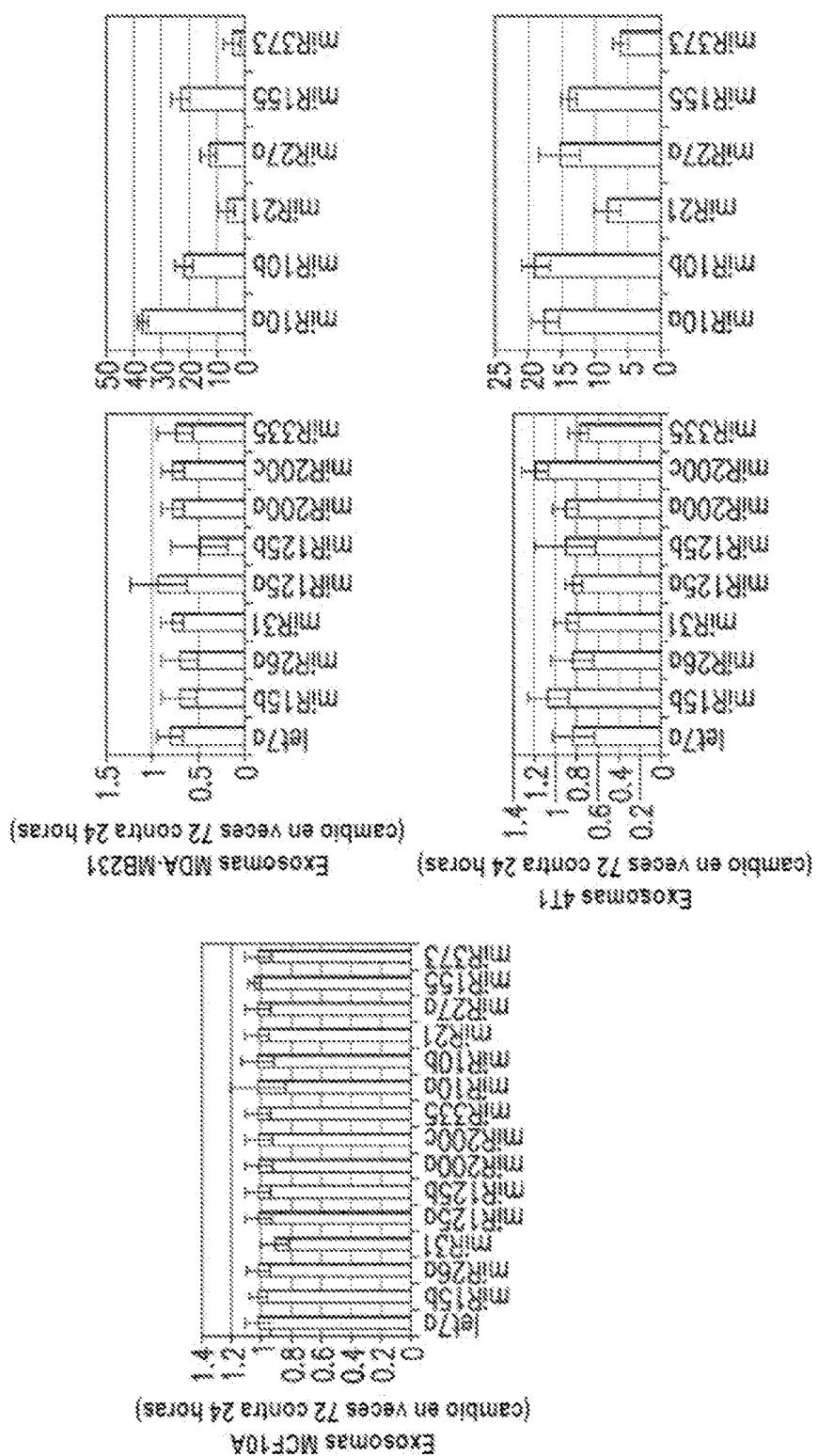


FIG.11C



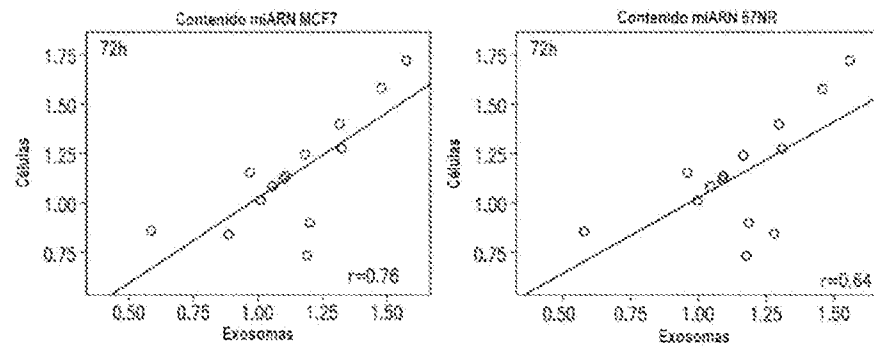


FIG.11E

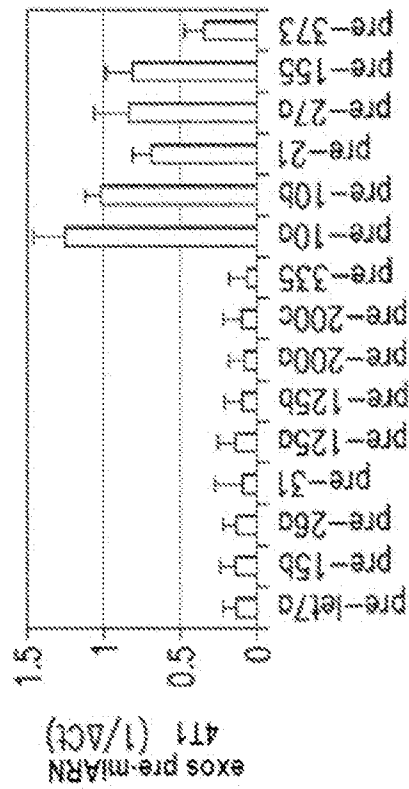


FIG.12A

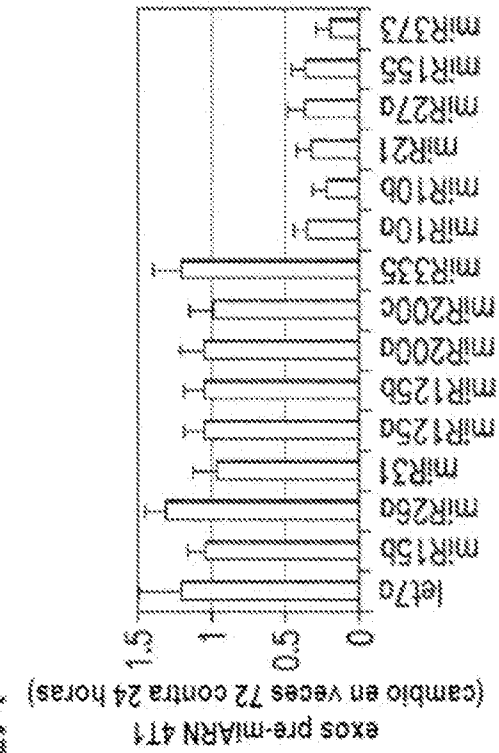
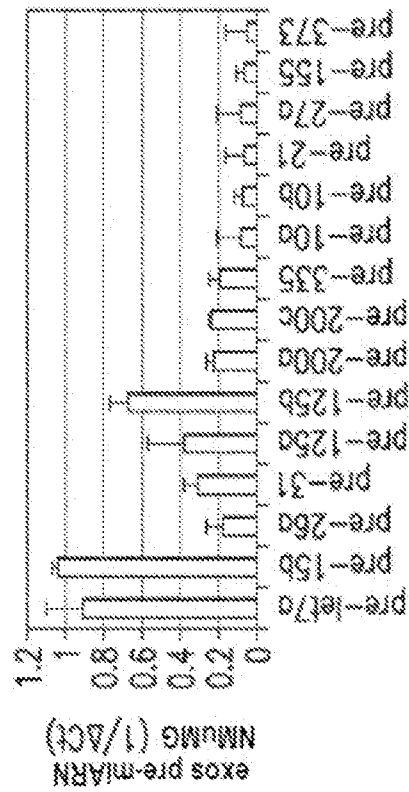
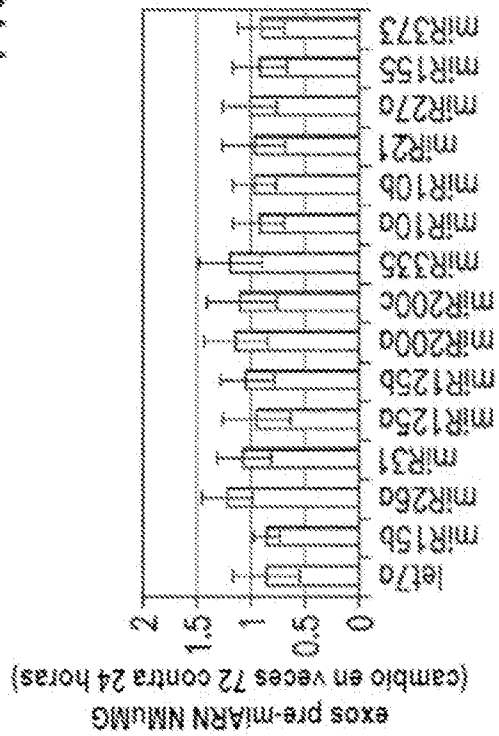
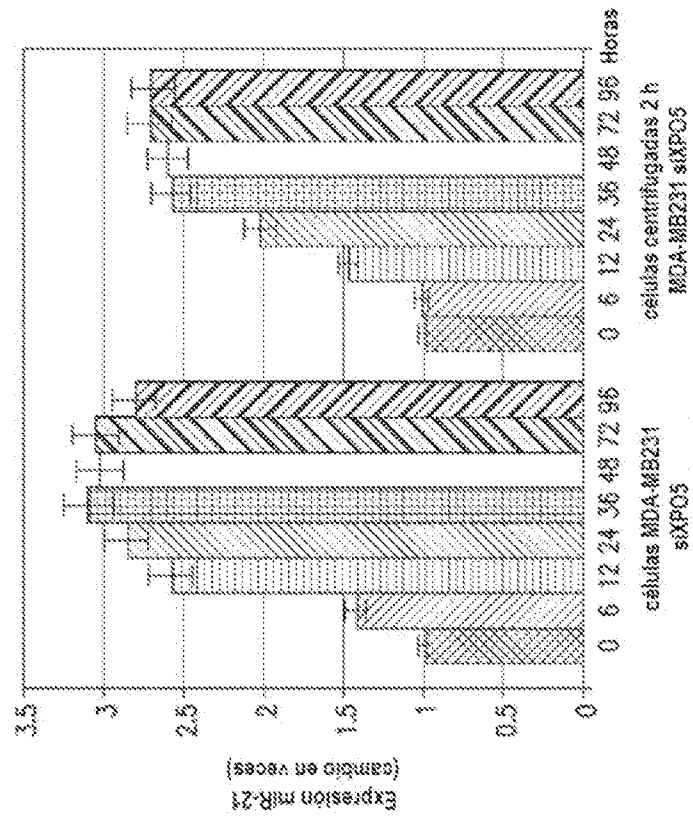


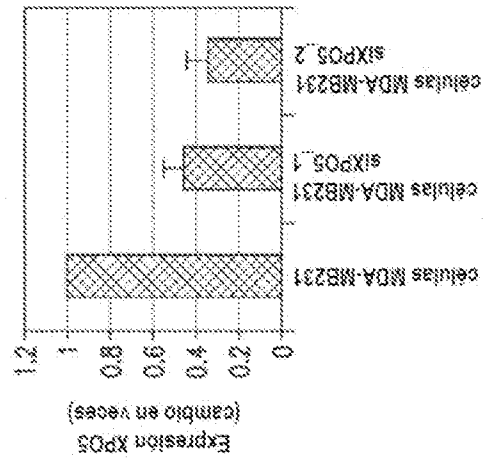
FIG.12B



D



C



FIGs. 12C-D

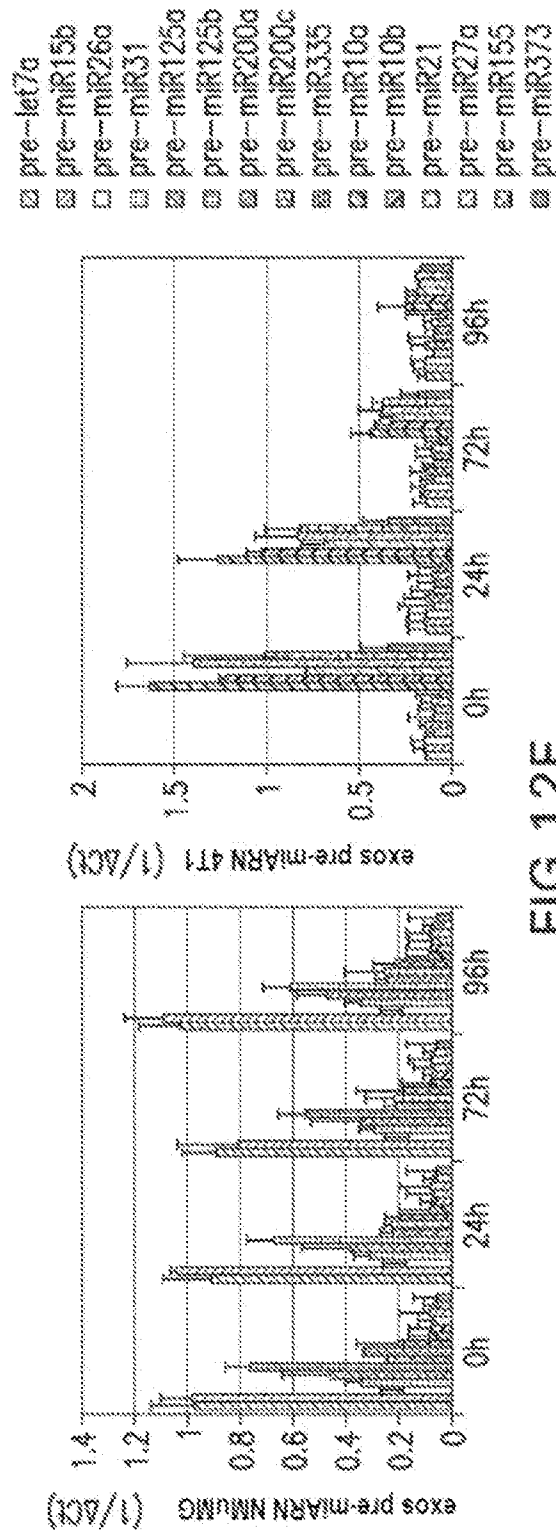


FIG. 12E

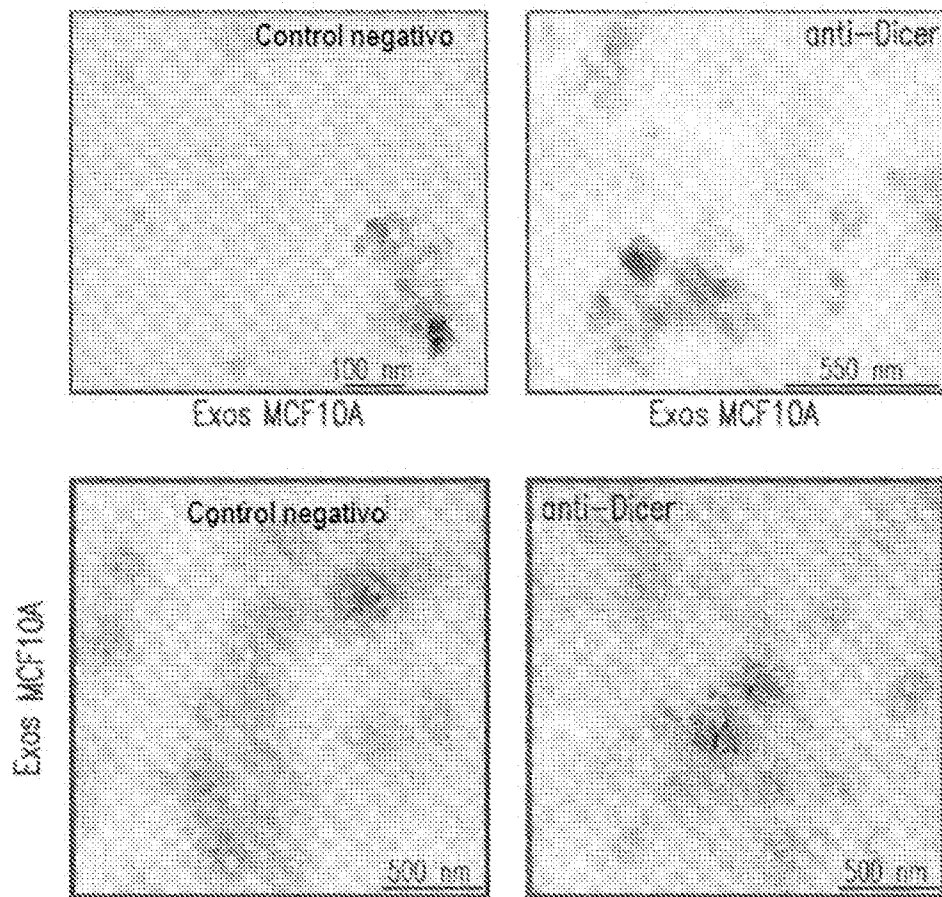
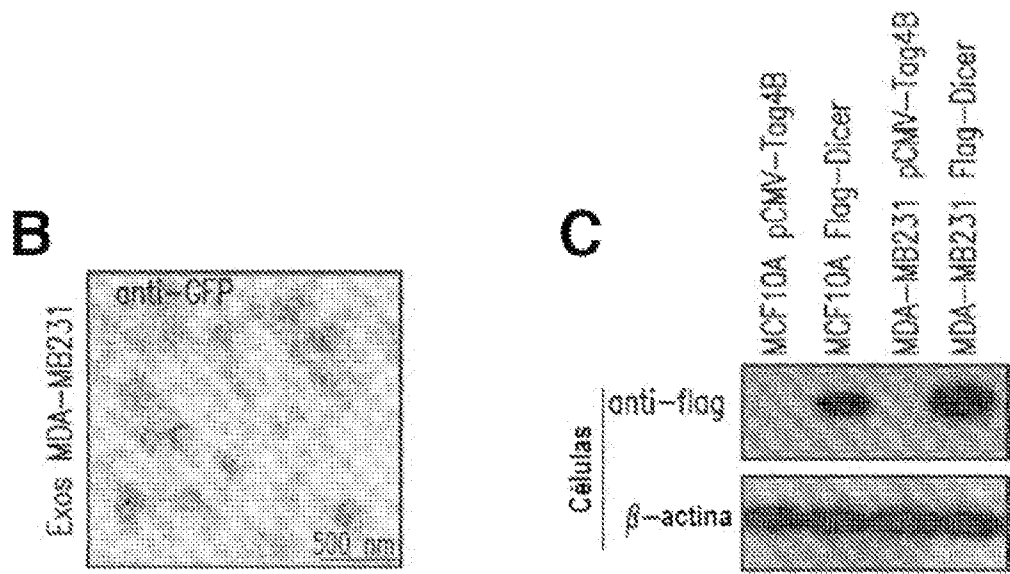
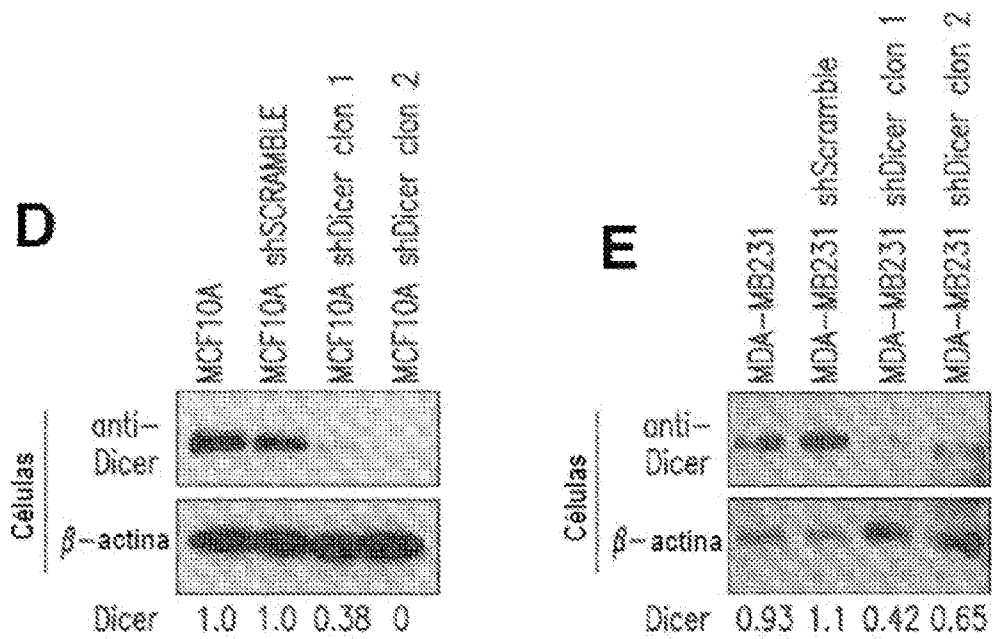


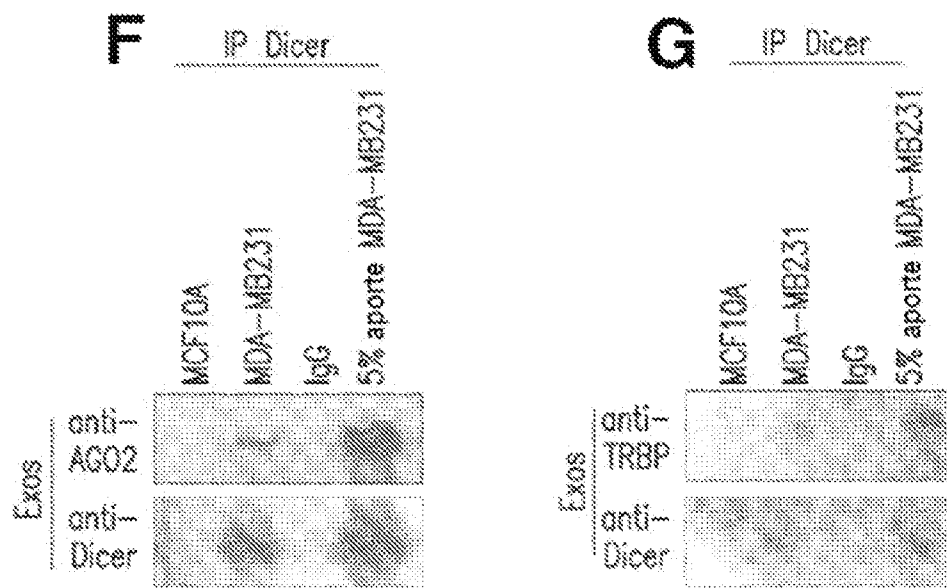
FIG.13A



FIGs. 13B-C



FIGs. 13D-E



FIGs. 13F-G

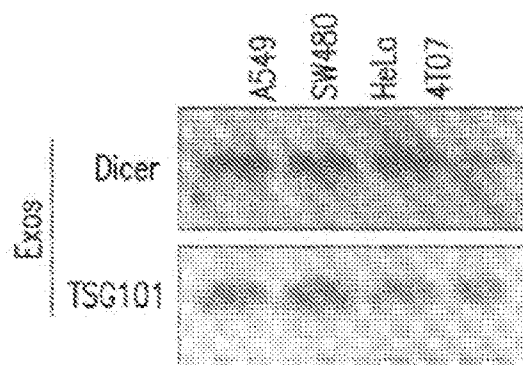


FIG. 13H

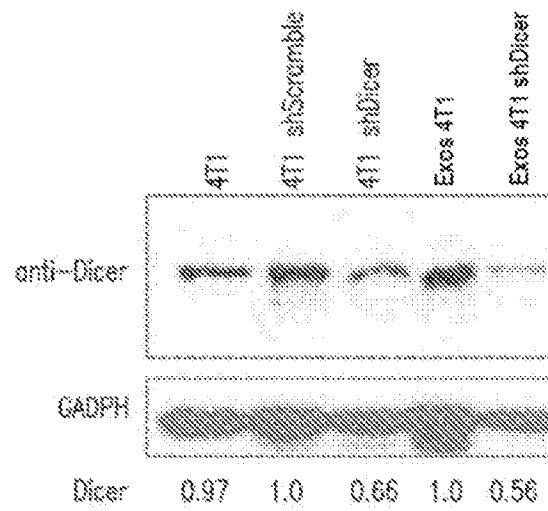


FIG. 14A

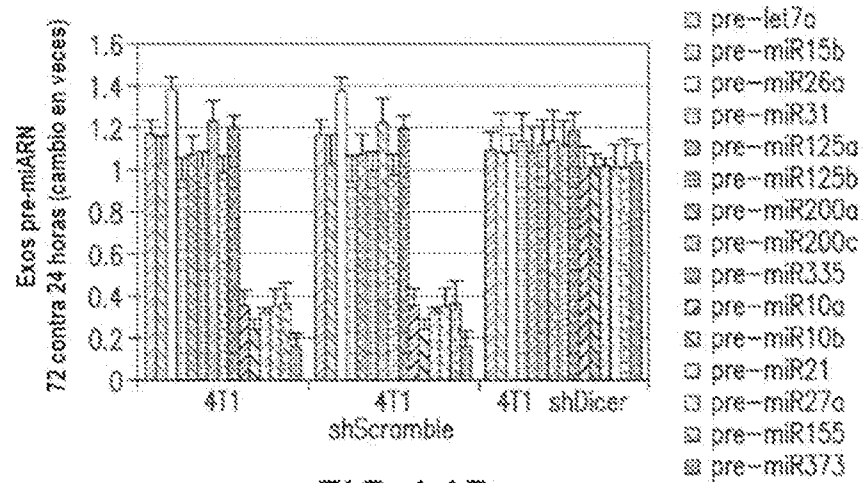
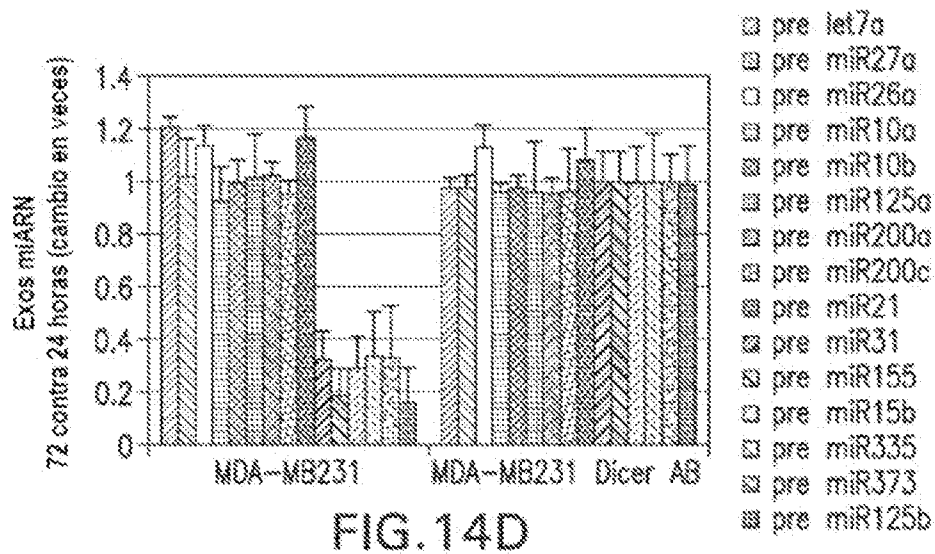
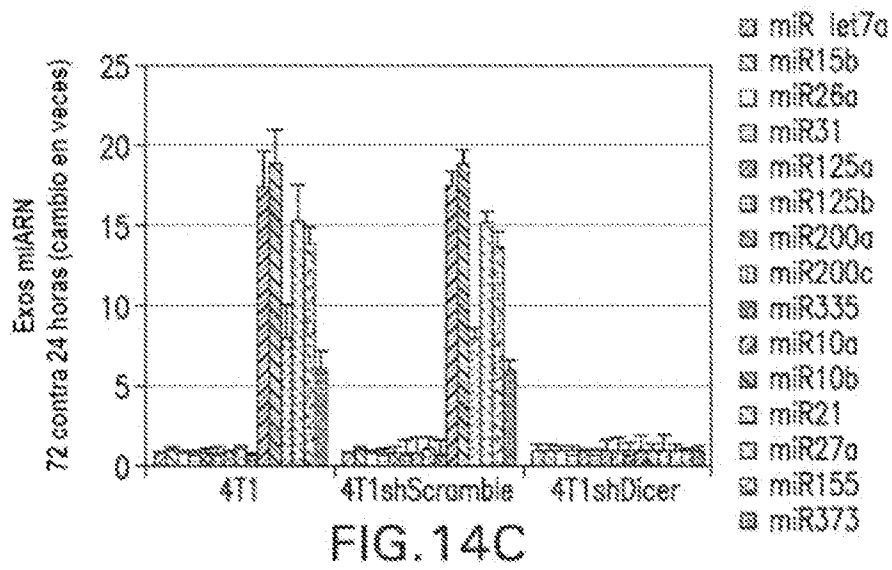
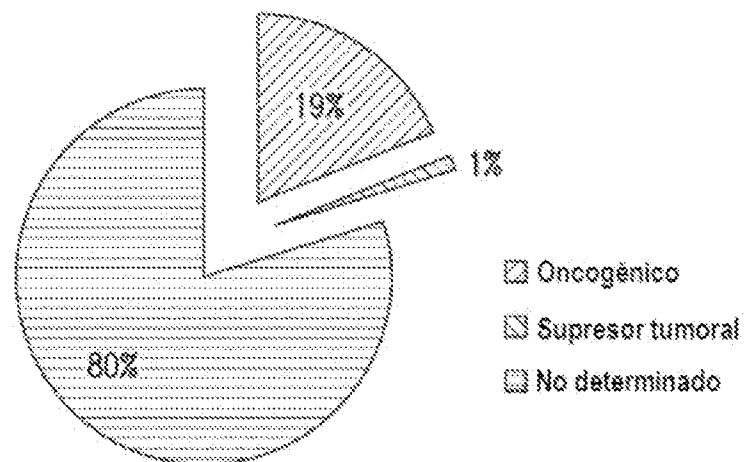
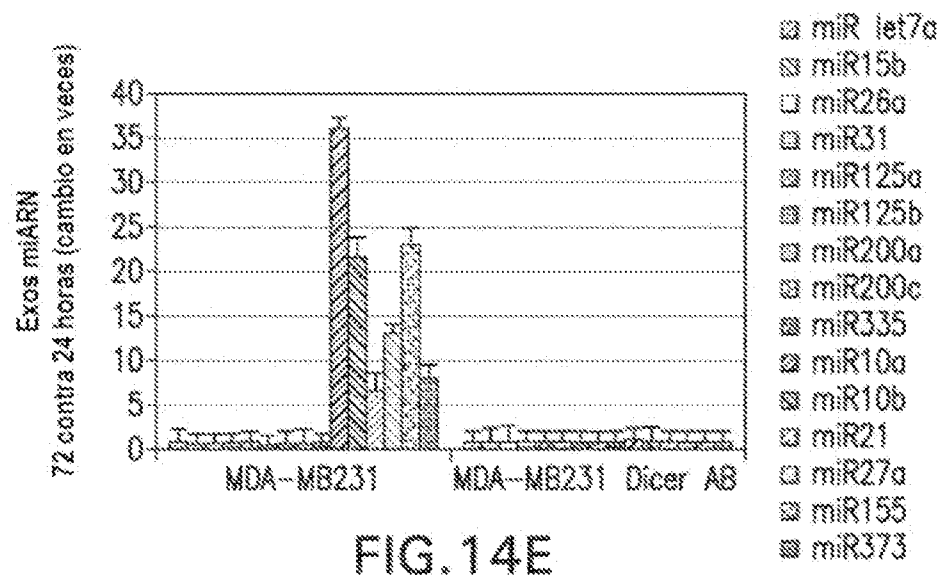


FIG. 14B





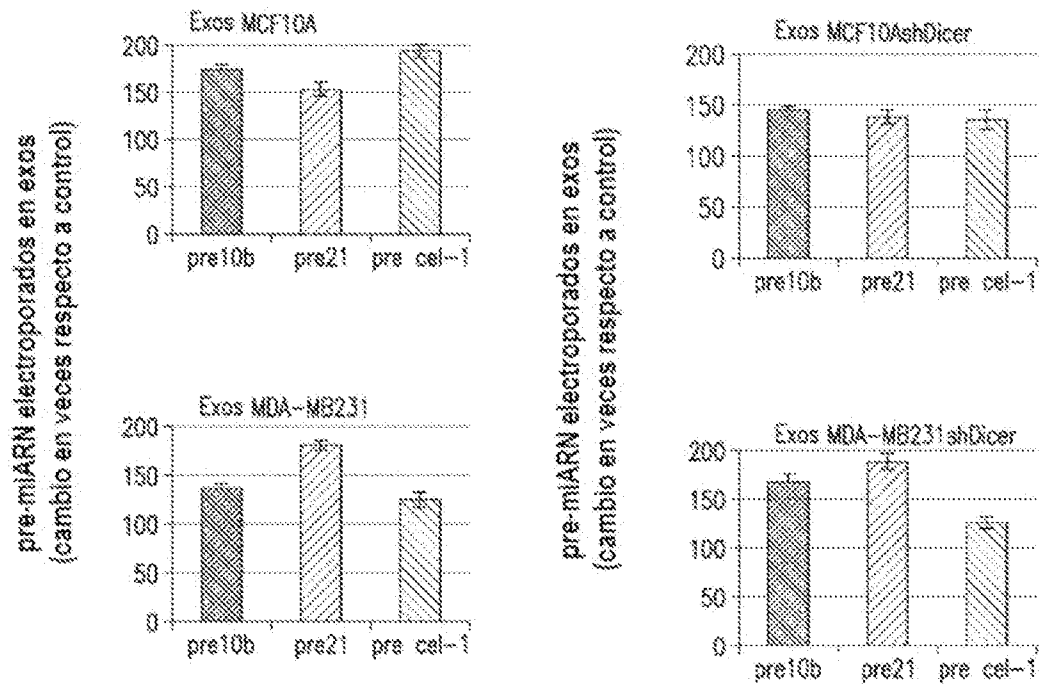


FIG. 15A

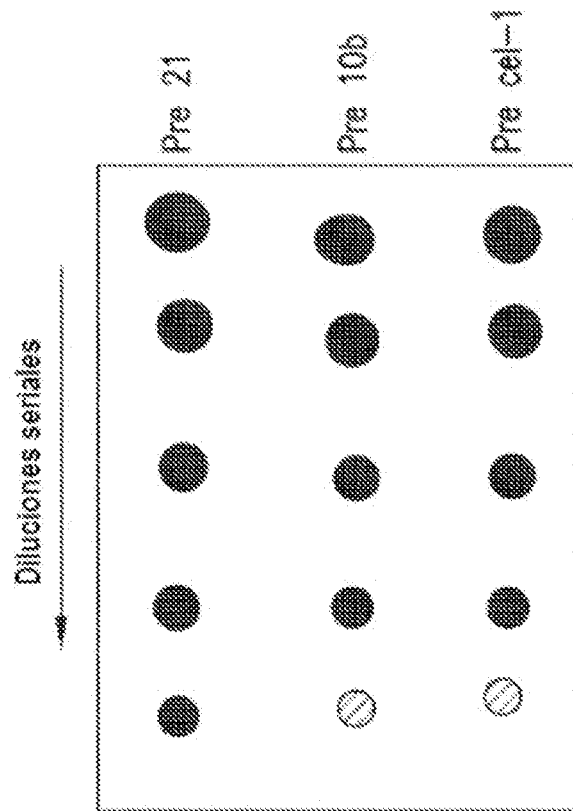


FIG. 15B

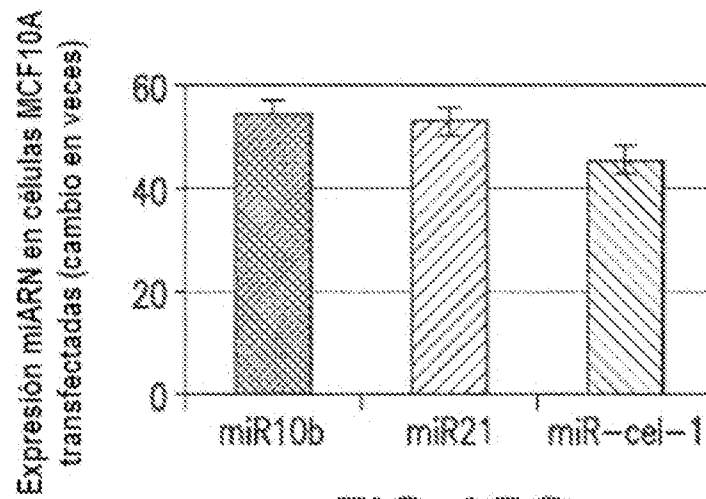


FIG. 15C

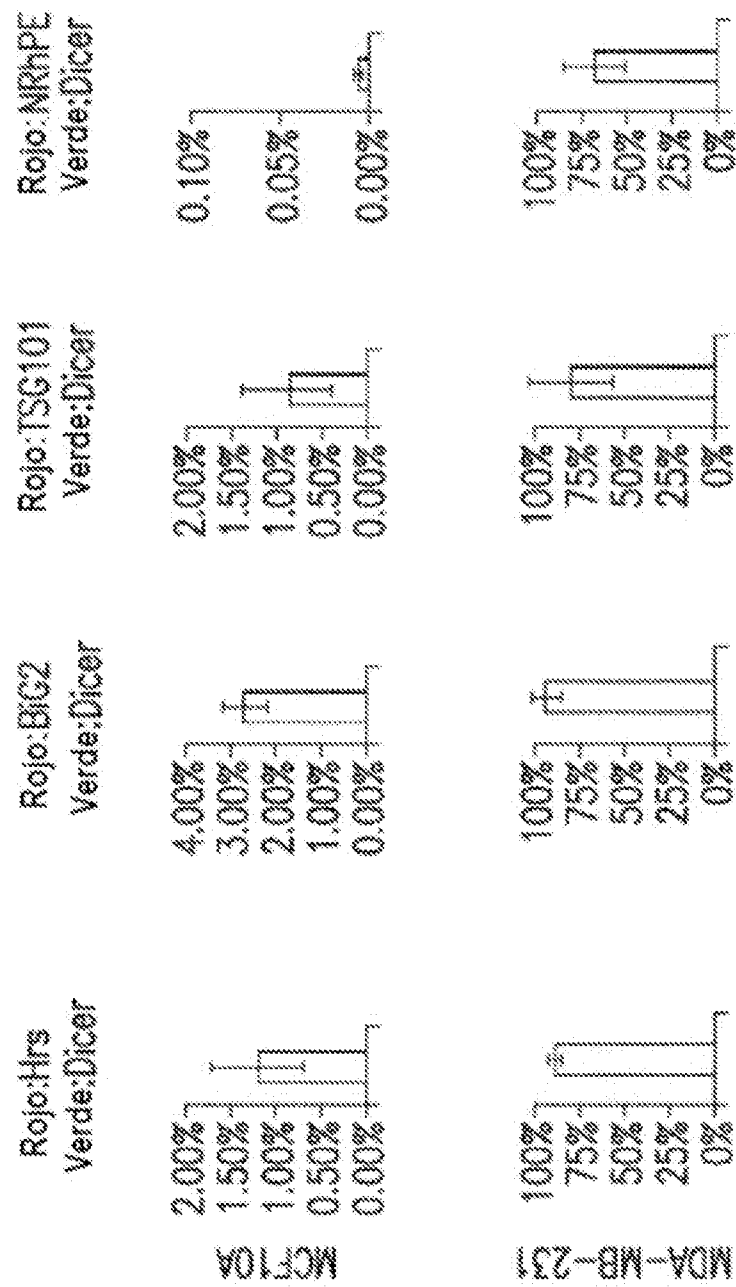


FIG. 16A

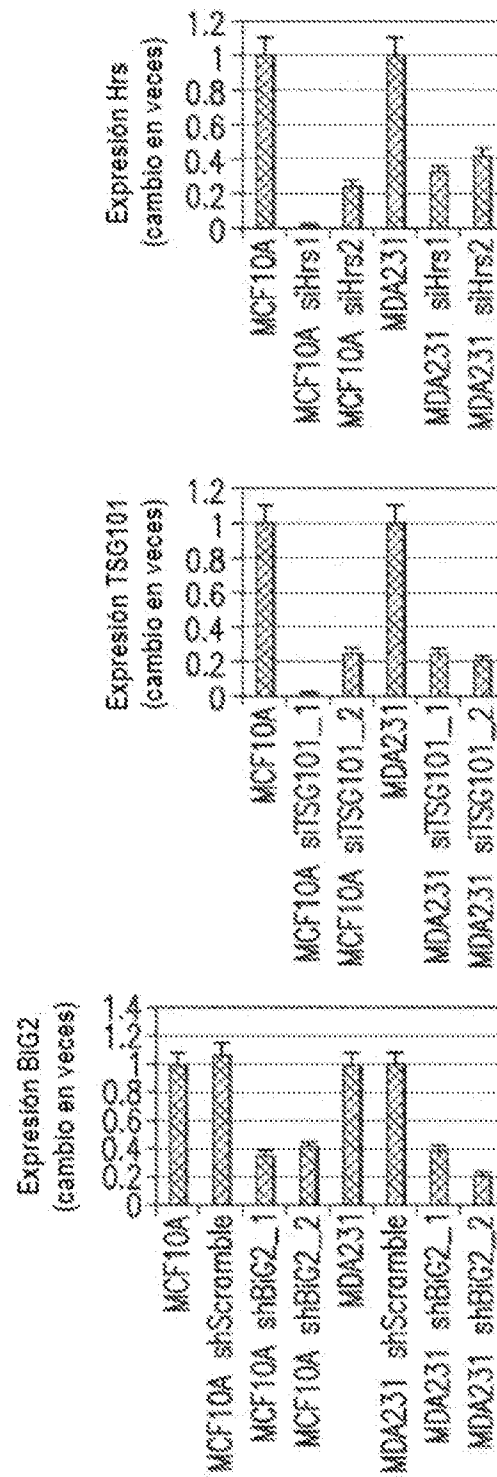
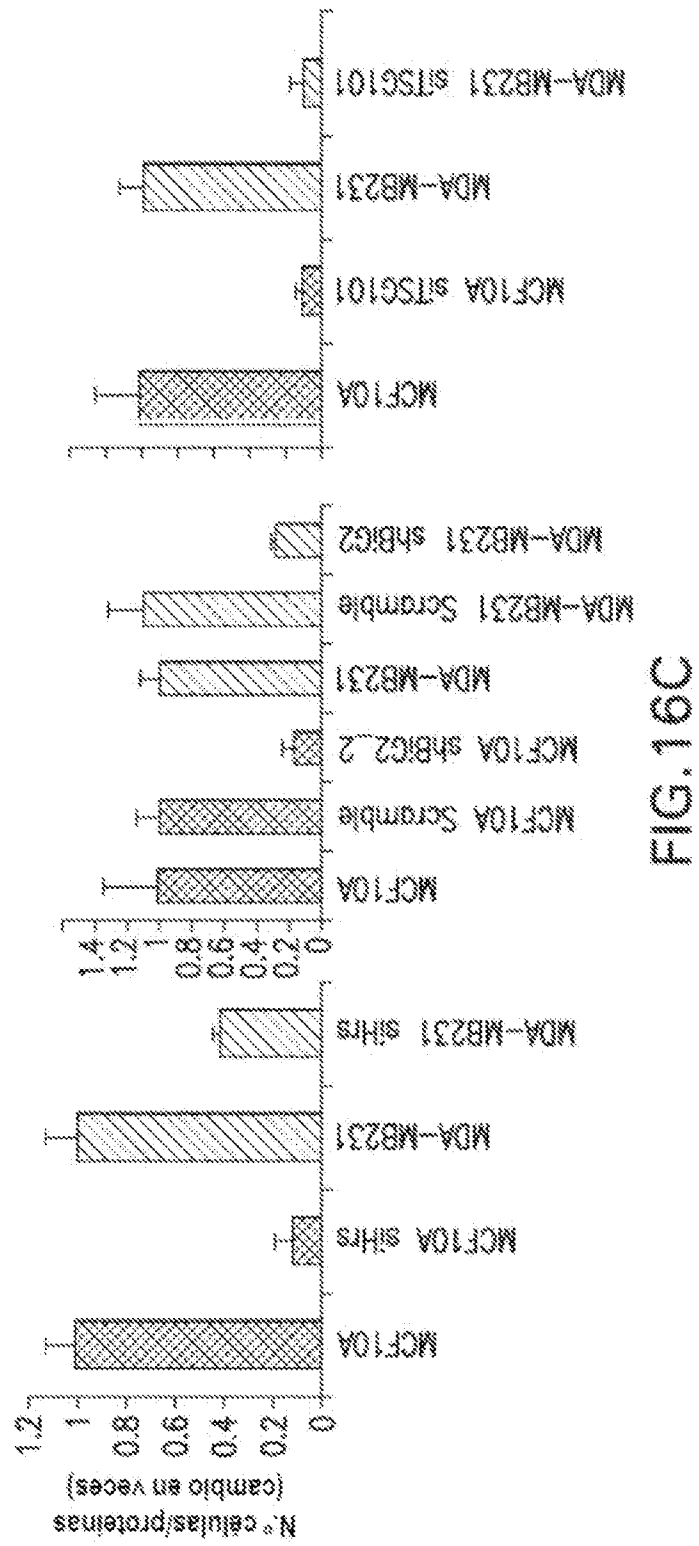


FIG. 16B



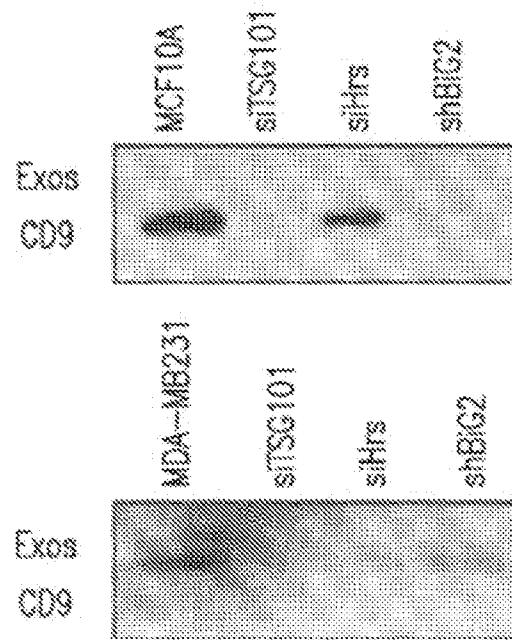


FIG.16D

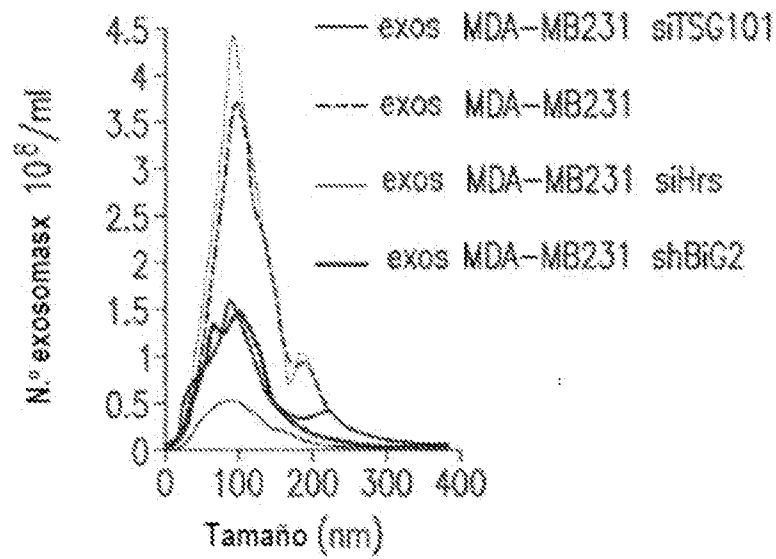


FIG.16E

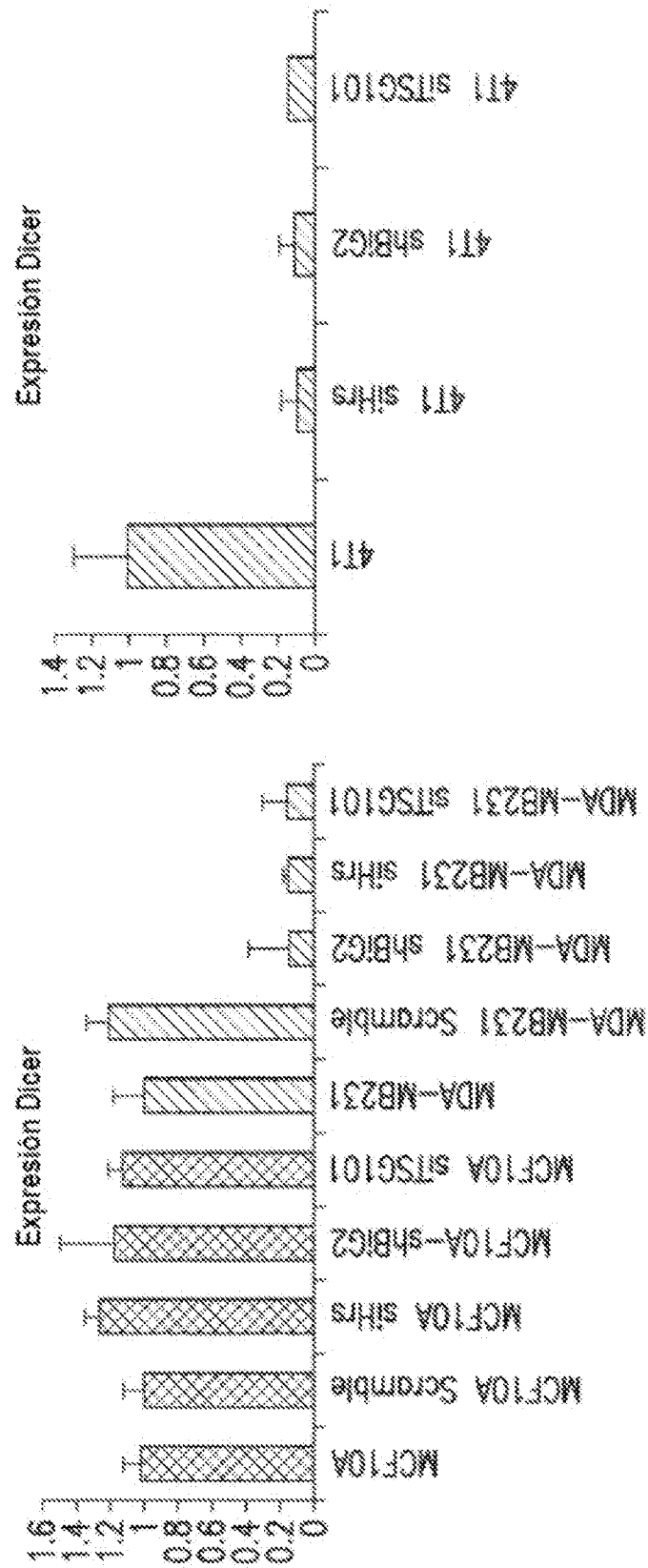


FIG. 16F

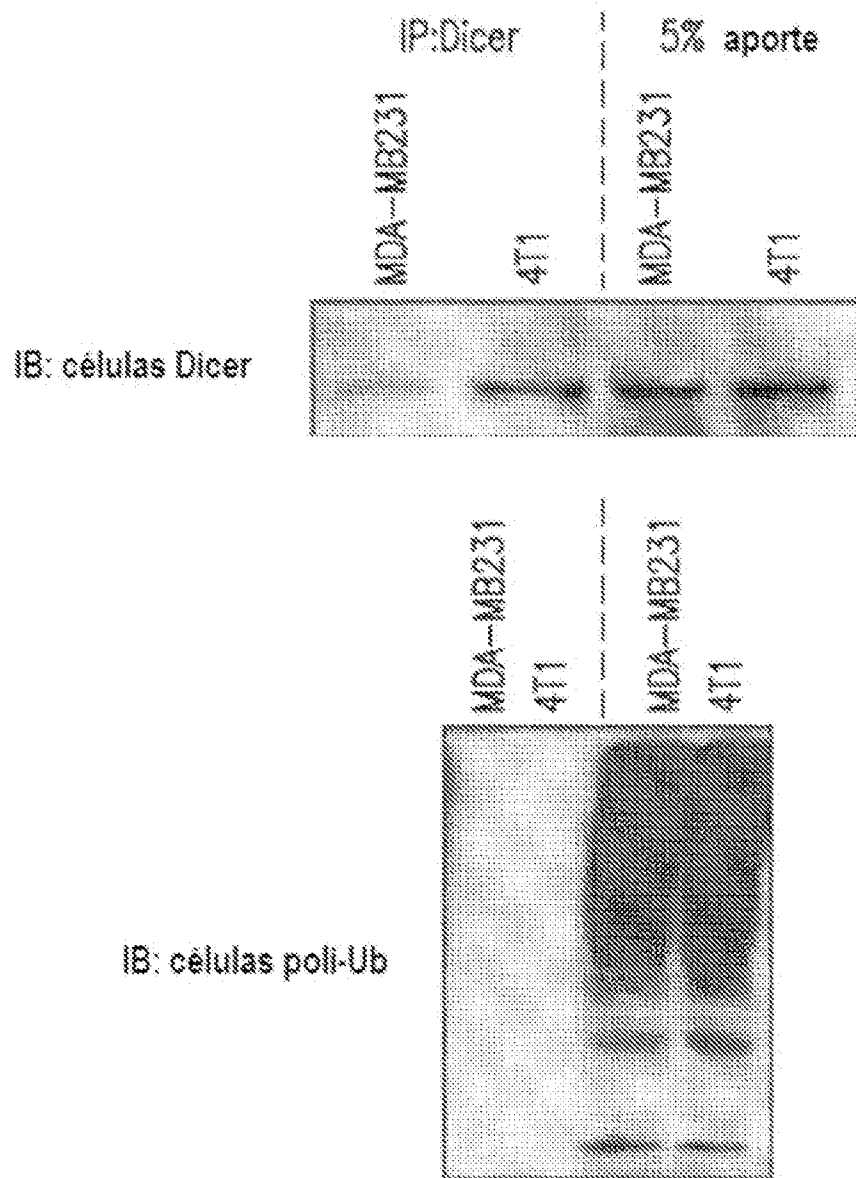
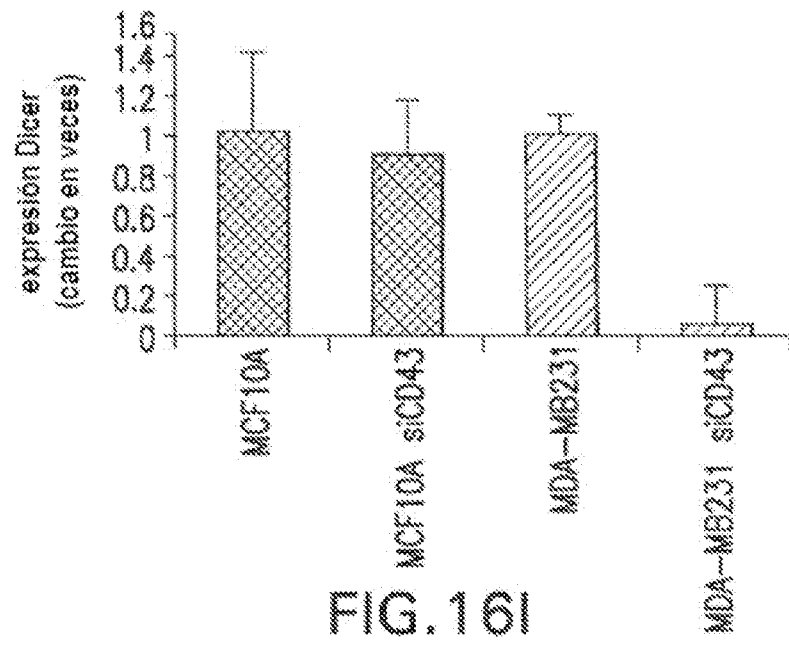
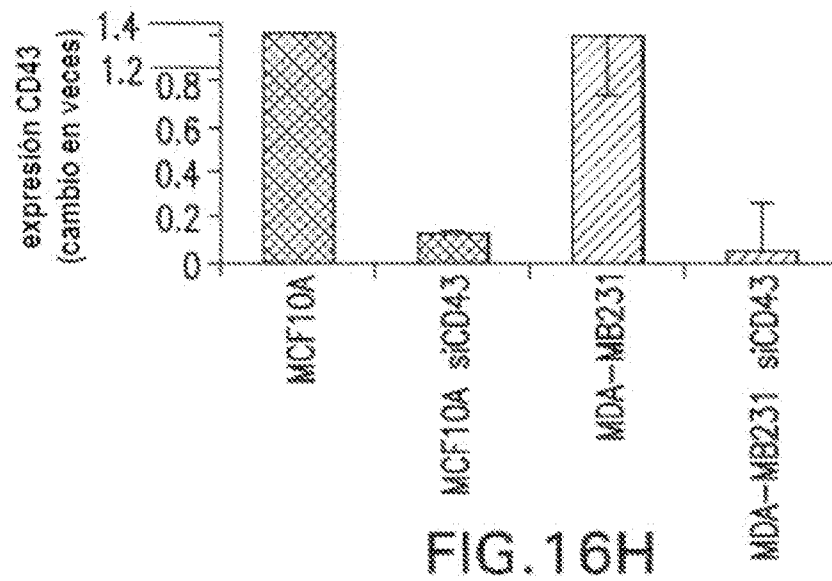


FIG.16G



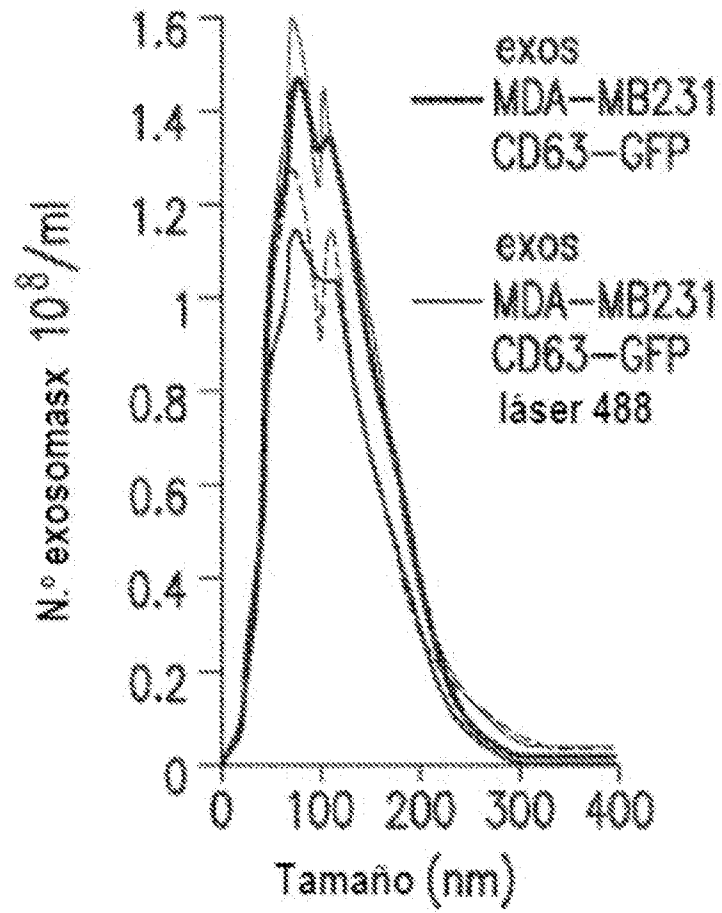


FIG.17A

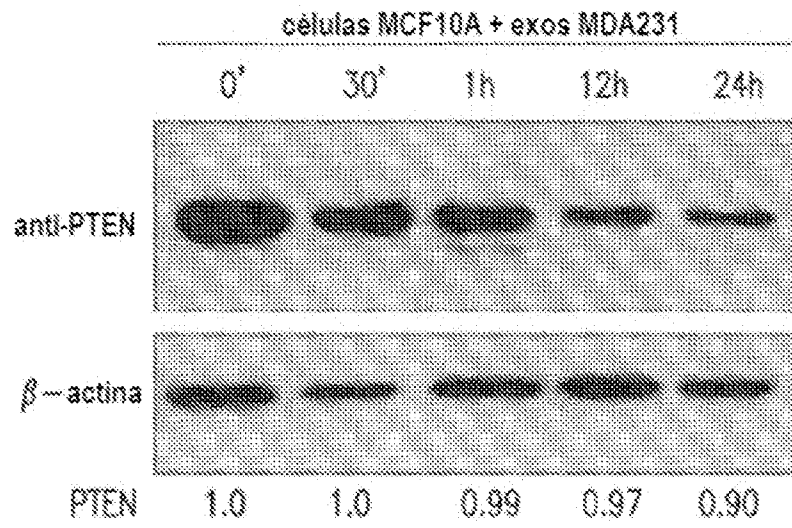


FIG.17B

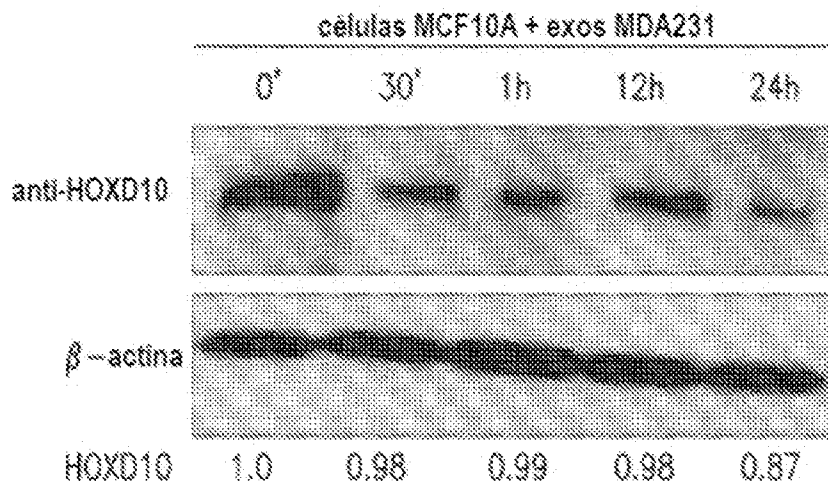


FIG.17C

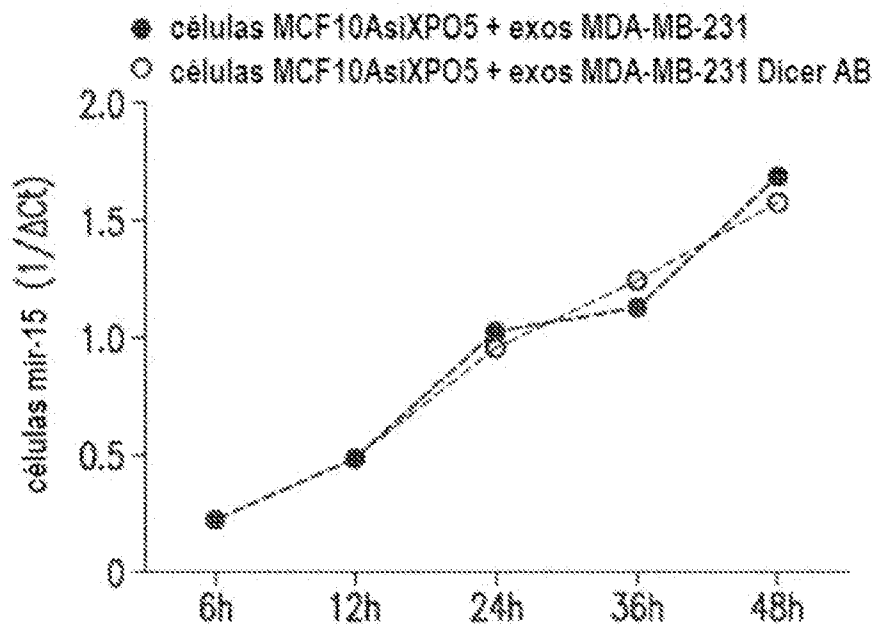


FIG.17D

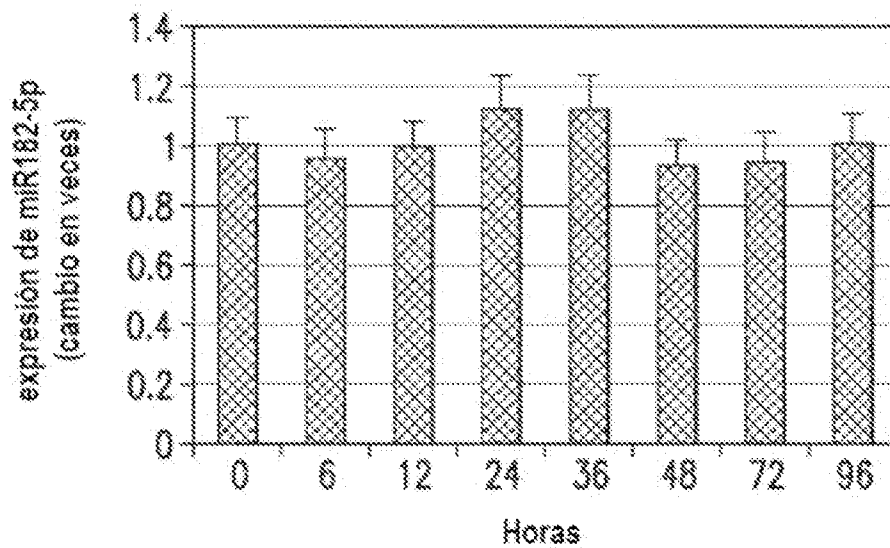


FIG.17E

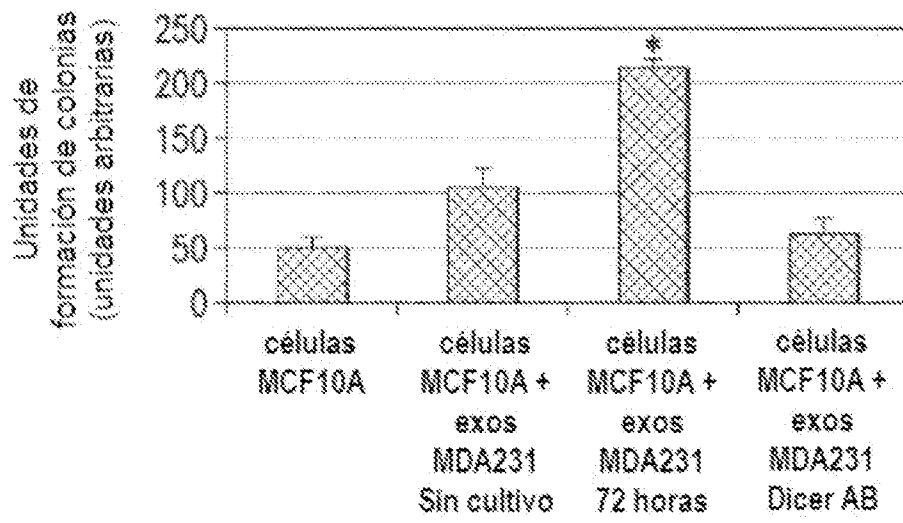


FIG.17F

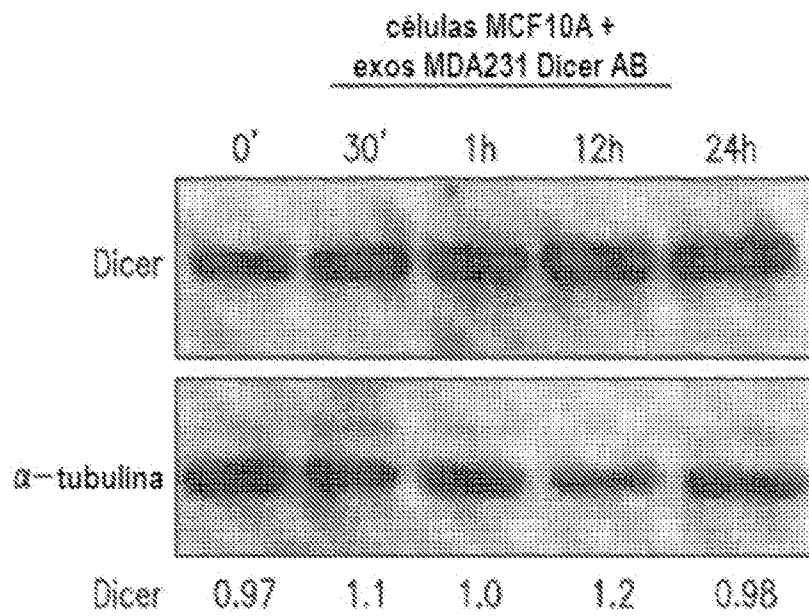
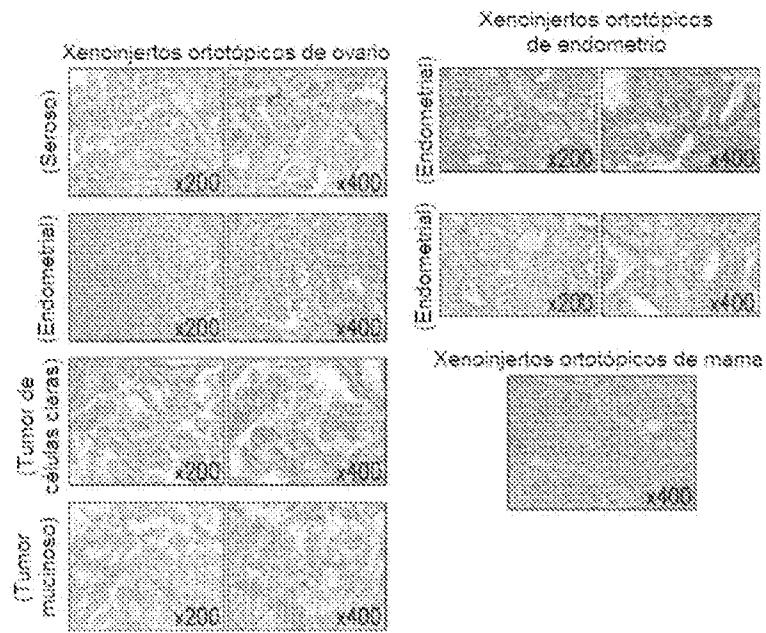
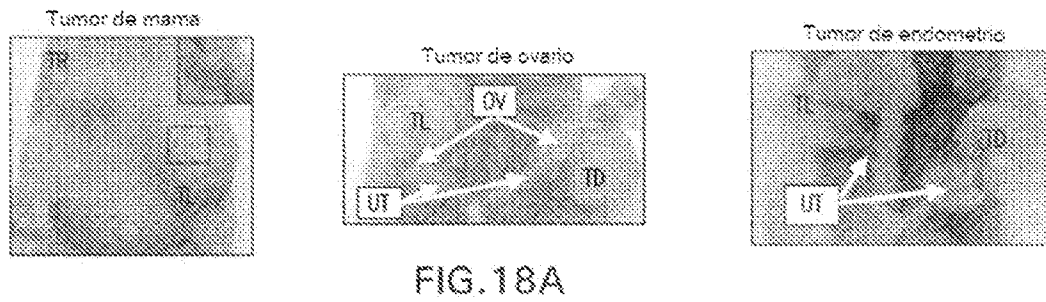
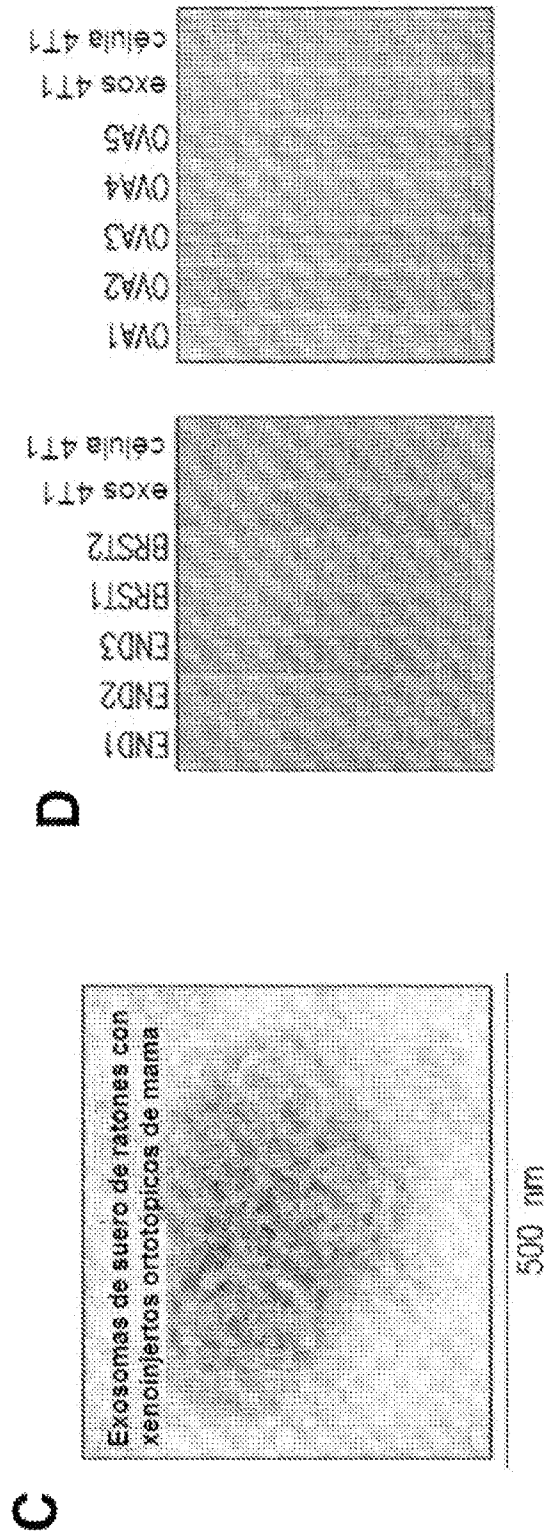


FIG.17G





FIGs. 18C-D