República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015023275-2 B1

(22) Data do Depósito: 14/03/2014

(45) Data de Concessão: 21/06/2022

(54) Título: MÉTODO IN VITRO DE DETECÇÃO DE BIOMARCADOR DE CÂNCER

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68; C12N 15/11; A61K 48/00.

(30) Prioridade Unionista: 15/03/2013 US 61/791,301.

(73) Titular(es): BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM; BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC..

(72) Inventor(es): RAGHU KALLURI; SONIA MELO.

(86) Pedido PCT: PCT US2014027541 de 14/03/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/152622 de 25/09/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 14/09/2015

(57) Resumo: MÉTODO IN VITRO DE DETECÇÃO DE BIOMARCADOR DE CÂNCER E COMPOSIÇÃO Métodos para diagnóstico e tratamento do câncer pelo uso de exossomos compreendendo miRNAs e seus precursores. Por exemplo, em alguns aspectos, um câncer pode ser diagnosti-cado ou avaliado pela determinação do teor de miRNA de exossomos em uma amostra de um sujeito ou através da detecção de processamento de miRNA em exossomos.

MÉTODO IN VITRO DE DETECÇÃO DE BIOMARCADOR DE CÂNCER

[0001] O presente pedido reivindica o benefício de prioridade do pedido provisório dos Estados Unidos nº de série 61/791.301, depositado em 15 de março de 2013, cujo conteúdo é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[0002] A invenção foi feita com apoio do governo sob n º s de concessão. EB003472, EB006462, CA135444, CA125550, CA155370, CA151925, DK081576 e DK055001, concedidos pelo National Institutes of Health e Grant n º s. EFRI-1240410, CBET-0922876 e CBET-1144025, concedido pela National Science Foundation. O governo tem certos direitos na invenção.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

1. Campo da Invenção

[0003] A presente invenção se relaciona geralmente ao campo da biologia molecular, oncologia e medicina. Mais particularmente, diz respeito a métodos para detecção de câncer por seu conteúdo exclusivo de exossomo e métodos para terapias melhoradas baseadas em RNA.

2. Descrição do Estado da Técnica Relacionado

[0004] Todas as células se comunicam com o seu ambiente circundante por várias vias, incluindo fatores de crescimento, citocinas, hormônios, quimiocinas, proteínas limitadas por membranas e lipídios. Exossomos são capazes de mediar tais comunicações e alcançar este objetivo por longas distâncias ((Mathivanan *et al.*, 2010; Kahlert e Kalluri, 2013). Comunicação por meio de exossomos pode provavelmente superar as limitações associadas com estabilidade e difusão de fatores de crescimento/citocinas/quimiocinas/hormônios (Mathivanan *et al.*, 2010). Exossomos são nano-vesículas de 30-140 nm em tamanho, que contêm proteínas, mRNA e microRNAs (miRNAs) protegidos por uma bicamada lipídica (Cocucci *et al.*, 2009; Simonsand Raposo, 2009; Simpson *et al.*,

2008; Thery *et al.*, 2002). Vários estudos recentes demonstraram que os exossomos são secretados por vários tipos de células, incluindo as células cancerosas, células-tronco, células do sistema imunológico e neurônios (Simpson *et al.*, 2008; Thery, 2001). É notado que as células cancerosas secretam mais exossomos do que as células normais (Taylor e Gercel-Taylor, 2011). Além disso, os exossomos estão em maior número na circulação de pacientes com câncer se comparados a indivíduos normais (Logozzi et al, 2009; Taylor e Gercel-Taylor, 2008); no entanto, um papel funcional permanece desconhecido. Evidências recentes sugerem que os exossomos podem desempenhar um papel importante na progressão do câncer e metástase (Luga *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011).

[0005] A ideia de que os exossomos mediam a transferência de RNAs e miRNAs entre células aumenta ainda mais a complexidade da comunicação célula a célula no corpo. RNAi é um processo biológico natural dentro de células vivas que participa no controle da expressão genética e atividade. Inicialmente, pensava-se que os miRNAs eram contidos apenas dentro de exossomos (Valadi *et al.*, 2007). Desde então, vários relatórios confirmaram a existência de miRNAs em corpos apoptóticos (Zernecke *et al*, 2009), lipoproteínas de alta e baixa densidade (Vickers *et al*, 2011) (HDL/LDL), grandes vesículas extracelulares, denominadas microvesículas e estão associadas com AGO2 (Arroyo *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012;Turchinovich *et al.*, 2011).. No entanto, um relatório recente sugere que a maioria dos miRNAs detectados na saliva e soro humano estão concentrados principalmente dentro dos exossomos (Gallo *et al*, 2012). A presença de miRNAs em exossomos oferece a possibilidade de regular a expressão gênica de células em locais distantes (Guescini *et al.*, 2010; Valadi *et al.*,2007; Mittelbrunn *et al.*, 2011; van Balkom *et al.*, 2013). Através do seu regulação de tradução do mRNA, miRNAs coordenam a expressão de conjuntos inteiros de genes e moldam o transcriptoma do

organismo (Bartel, 2009).

[0006] miRNAs são enriquecidos em exossomos derivados de vários tipos de células diferentes (Valadi *et al*, 2007). Eles são pequenos RNAs não-codificantes de 18-24 nucleotídeos (nt) de comprimento que controlam a expressão genética pós transcrição. Eles são sintetizados por ações sequenciais de endonucleases de Drosha e Dicer e carregados para o RISC (sigla em inglês para 'RNA induced silencing complex' - complexo silenciador induzido por RNA) para atingir mRNAs (Bartel, 2009; Maniataki e Mourelatos, 2005).. Nos camundongos nocaute para Dicer, falha na biossíntese do miRNA resulta em letalidade devido a proliferação e diferenciação de células tronco embrionárias defeituosas (Bernstein *et al.*,2003; Fukagawa *et al.*, 2004).

[0007] MicroRNAs operam por meio de interação de sequência específica e emparelhamento do RISC associado ao miRNA (composto por proteínas Dicer, TRBP e AGO2) com os mRNAs alvo (Bartel, 2009). Esta ação consequentemente inibe a tradução e/ou provoca a desestabilização do mRNA (Filipowicz, 2005). O grau de complementaridade entre o miRNA e seu mRNA alvo dita o processo do silenciamento do mRNA, seja por meio de desestabilização/degradação do mRNA ou por meio da inibição da tradução (Ambros, 2004; Bartel, 2009). Se a complementação completa é encontrada entre a sequência de miRNA e o mRNA alvo, o complexo RISC atua para clivar o mRNA ligado para degradação (Ambros, 2004; Bartel, 2009). Se complementação absoluta não é encontrada, como na maioria dos casos de miRNAs em células animais, a tradução é impedida de alcançar o silenciamento genético (Ambros, 2004; Bartel, 2009).

[0008] Para um miRNA ser funcional e alcançar o silenciamento genético eficiente mediado por miRNA, deve ser complexado com proteínas Dicer RLC (complexo RISCloading) TRBP e AGO2. Dentro do RLC, Dicer e TRBP são necessários para processar miRNAs precursores (pre-miRNAs), após eles emergirem do núcleo por meio de exportina-5, para gerar os

miRNAs e associar à AGO2. AGO2 ligada ao miRNA maduro constitui o RISC mínimo e posteriormente pode se dissociar de Dicer e TRBP (Chendrimada *et al.*, 2005;Gregory *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2005; MacRae *et al.*, 2008;Maniataki and Mourelatos, 2005; Melo *et al.*, 2009) Por si mesmos, miRNAs de fita única incorporam RISC muito mal e, portanto, não podem ser eficientemente conduzidos ao seu alvo mRNA para regulação pós-transcricional (Tang, 2005; Thomson *et al*, 2013).

[0009] siRNAs sintéticos (de fita dupla) causam deterioração de mRNA por meio de emparelhamento de base perfeita com seus mRNAs alvo (Ambros, 2004; Bartel, 2009). Tais siRNAs são carregados diretamente para as proteínas RISC Dicer, TRBP e AGO2 devido à sua natureza de fita dupla (Tang, 2005). Um miRNA de fita única não pode incorporar em RISC e, portanto, não pode ser direcionado ao seu mRNA alvo para inibição de tradução ou degradação (Tang, 2005).

[0010] Alguns relatórios sugeriram que os miRNAs contido nos exossomos podem influenciar a expressão genética em células alvo (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), mas uma pergunta permanece sobre como eficientes são estes miRNAs no silenciamento de mRNA se eles não são incorporados ao RISC como pre-miRNAs para reconhecimento apropriado de mRNA e eficiente contenção de tradução. Enquanto miRNAs maduros (de fita única) não podem se associar com RISC de células alvo, pre-miRNAs de exossomos podem, em certa medida, induzir silenciamento genético por cooptação das proteínas RISC das células alvo. No entanto, tal processo é altamente ineficiente e lento devido ao potencial estado saturado de proteínas envolvidas na via de biogênese de miRNA das células alvo. Um relatório recente mostrou a presença de Drosha e Dicer nos exossomos da cultura de célula sobrenadante de células infectadas pelo HIV-1 e soros de pacientes com HIV (Narayanan *et al.*, 2013). Adicionalmente, um outro estudo mostrou co

fracionamento de Dicer, TRBP e AGO2 em endossomos/MVB (corpo multivesicular) tardios (Shen *et al.*, 2013).

RESUMO DA INVENÇÃO

[0011] Exossomos secretados pelas células cancerígenas são exclusivos em relação aos exossomos não-cancerosos, os exossomos cancerosos compreendendo um repertório exclusivo de miRNAs, bem como RNA ativo processando complexos RISC. Tais complexos RNA-RISC encapsulados também podem ser utilizados para biogênese de miRNA independente de célula e silenciamento de mRNA altamente eficiente nas células alvo.

[0012] Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um método de detecção de um biomarcador de câncer em um indivíduo compreendendo (a) obtenção de uma amostra biológica do indivíduo; (b) medição do nível de (i) um ou mais miRNA(s) selecionado(s) a partir dos miRNAs fornecidos na Tabela 5 em uma fração do exossomo da amostra; (ii) um precursor miRNA ; (iii) uma proteína RISC em uma fração do exossomo da amostra; ou (iv) uma atividade de processamento de miRNA (*por exemplo,* miRNA primário e/ou atividade de processamento do precursor-miRNA) em uma fração do exossomo da amostra; e (c) identificação do indivíduo tendo ou não ter um biomarcador de câncer baseado no nível medido do(s) referido(s) miRNA(s), precursor miRNA, proteína RISC ou atividade de processamento de miRNA. Em alguns aspectos, o método compreende a medição do nível pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de tais miRNAs. Em mais aspectos, o método compreende a medição do nível das proteínas AGO2, TRBP ou DICER.

[0013] Em alguns aspectos, a amostra biológica é essencialmente livre de células. Por exemplo, a amostra pode ter menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 célula(s). Em um aspecto, a amostra biológica não contém células. Em certos aspectos, a amostra biológica pode ser uma amostra de linfa, saliva, urina ou sangue (*por exemplo,* plasma). Em um outro aspecto,

o método pode compreender adicionalmente a purificação de uma fração do exossomo da amostra e/ou o aumento da produção de uma fração do exossomo da amostra.

[0014] Em aspectos particulares, o câncer é câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cabeça a pescoço, câncer de próstata, câncer de esôfago, câncer de traqueia, câncer no cérebro, câncer de fígado, câncer renal, câncer de estômago, câncer de cabeça e pescoço, câncer pancreático, câncer de ovário, câncer de útero, câncer cervical, câncer de testículos, câncer de cólon, câncer retal ou câncer de pele. Em certos aspectos, o câncer é um câncer de mama. Em um aspecto, o indivíduo passou por um tratamento de câncer anteriormente ou teve um tumor cirurgicamente removido anteriormente.

[0015] Em alguns aspectos, identificação do indivíduo como tendo ou não um biomarcador de câncer compreende adicionalmente a correlação do(s) nível(is) de miRNA medidos, nível de precursor miRNA, nível RISC ou atividade de processamento de miRNA com um risco para câncer. Em um outro aspecto, identificação do indivíduo como tendo ou não um biomarcador de câncer compreende adicionalmente a correlação do(s) nível(is) de miRNA medidos, nível de precursor miRNA, nível RISC ou atividade de processamento de miRNA usando um algoritmo. Em alguns casos, uma análise pode ser realizada por um computador.

[0016] Em determinados aspectos, o método das modalidades compreende adicionalmente a medição do nível de (i) (i) um ou mais miRNA(s) selecionado(s) a partir dos miRNAs fornecidos na Tabela 5 em uma fração do exossomo da amostra; (ii) um precursor miRNA ; (iii) uma proteína RISC em uma fração do exossomo da amostra e uma amostra de referência; ou (iv) uma atividade de processamento de miRNA em uma fração do exossomo da amostra e uma amostra de referência; e (c) identificação do indivíduo tendo ou não ter um biomarcador de câncer pela comparação do nível de miRNA(s), um precursor miRNA, atividade de

processamento RISC ou miRNA na amostra do indivíduo ao nível de miRNA(s), um precursor miRNA, atividade de processamento RISC miRNA na amostra de referência.

[0017] Em alguns aspectos, medir os níveis de proteína RISC compreende a realização de um Western blot, um ELISA ou vinculação a um arranjo de anticorpo. Em outros aspectos, medição de níveis de miRNA compreende a medição de níveis de miRNA processados. Em alguns casos, medição de níveis de miRNA compreende realização de RT-PCR, Nothern blot ou um arranjo de hibridização.

[0018] Em alguns aspectos, o método compreende adicionalmente o relato se o sujeito tem ou não tem um biomarcador de câncer. Relatórios podem compreender a preparação de um relatório escrito, oral ou eletrônico. Por exemplo, o relatório pode ser fornecido ao paciente, um médico, um hospital ou uma companhia de seguros.

[0019] Em uma outra modalidade, a presente divulgação fornece um método para tratamento de um indivíduo compreendendo a seleção de um indivíduo identificado como tendo um biomarcador de câncer em conformidade com as modalidades e administração de uma terapia anticâncer ao indivíduo. Por exemplo, o método pode compreender (a) obtenção do nível de (i) um ou mais miRNA(s) selecionado(s) a partir dos miRNAs fornecidos na Tabela 5; (ii) um precursor miRNA ; (ii) uma proteína RISC; ou (iii) uma atividade de processamento de miRNA em uma fração do exossomo da amostra do sujeito; (b) seleção de um indivíduo com biomarcador de câncer baseado no nível de tal miRNA(s), precursor miRNA, proteína RISC ou atividade de processamento de miRNA; e (c) tratamento do indivíduo selecionado com uma terapia anti câncer. Em certos aspectos, a terapia anticâncer é uma quimioterapia, uma radioterapia, uma terapia hormonal, uma terapia-alvo, uma imunoterapia ou um tratamento cirúrgico.

[0020] Em uma modalidade adicional, a presente divulgação fornece

um método de seleção de um indivíduo para um procedimento diagnóstico compreendendo (a) obtenção do nível de (i) um ou mais miRNA(s) selecionado(s) a partir dos miRNAs fornecidos na Tabela 5; (ii) nível de precursor miRNA ; (ii) uma proteína RISC; ou (iii) uma atividade de processamento de miRNA em uma fração do exossomo da amostra do sujeito; (b) seleção de um indivíduo com biomarcador de câncer baseado no nível de tal miRNA(s), proteína RISC ou atividade de processamento de miRNA; e (c) execução de uma procedimento diagnóstico no indivíduo. Em um aspecto, o procedimento diagnóstico compreende diagnósticos por imagem. A imagem pode ser uma imagem de biópsia, raios-x, tomografia, ressonância magnética ou PET.

[0021] Ainda em uma outra modalidade, a presente divulgação fornece um meio concreto legível por computador compreendendo um código legível por computador que, quando executado por um computador, faz com que o computador execute operações que compreendem (a) recebimento de informações correspondentes a um nível de (i) um ou mais miRNA(s) selecionado(s) a partir dos miRNAs fornecidos na Tabela 5 em uma fração do exossomo da amostra; (ii) um precursor miRNA ; (iii) uma proteína RISC; ou (iv) uma atividade de processamento de miRNA em uma fração do exossomo da amostra do indivíduo; e (b) determinação de um nível relativo de uma ou mais de tal miRNAs, um precursor miRNA, proteínas RISC ou uma atividade de processamento de miRNA comparada a um nível de referência, em que o nível alterado comparado a um nível de referência indica que o indivíduo tem um biomarcador de câncer.

[0022] Em certos aspectos, a operação central concreto legível por computador compreende adicionalmente receber informações correspondentes a um nível de referência de (i) um ou mais miRNA(s) selecionados a partir de miRNAs fornecidos na Tabela 5; (ii) um precursor miRNA; (iii) uma proteína RISC; ou (iv) uma atividade de processamento miRNA, em uma fração do exossomo de um indivíduo que não tem câncer.

[0023] Em certos aspectos, o meio concreto legível por computador compreende adicionalmente um código legível por computador que, quando executado por um computador, faz com que o computador execute uma ou mais operações adicionais compreendendo: envio de informações correspondentes ao nível relativo de miRNA; um precursor miRNA, proteína RISC ou atividade de processamento de miRNA para um dispositivo de armazenamento de dados concreto.

[0024] Em um outro aspecto, o nível de referência é armazenado no referido concreto legível por computador. Em um aspecto, receber informações compreende o recebimento de um meio concreto legível por computador correspondente a um nível de miRNA; um nível de precursor miRNA, proteína RISC ou atividade de processamento miRNA, em uma amostra de um indivíduo. Em alguns aspectos, recebimento de informações compreende adicionalmente o recebimento de informações correspondentes a um nível de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de tais miRNAs em uma amostra de um indivíduo.

[0025] Em alguns aspectos, o código legível por computador, quando executado por um computador, faz com que o computador execute operações que compreendem adicionalmente (c) cálculo de uma pontuação diagnóstica para a amostra, em que a pontuação diagnóstica é indicativa da probabilidade de que a amostra seja de um indivíduo com câncer.

[0026] Em uma outra modalidade, a presente divulgação fornece um método de detecção de biomarcador de câncer em um indivíduo compreendendo (a) obtenção de uma amostra biológica do indivíduo; (b) medição do nível de um ou mais miRNA(s) na amostra selecionada dos miRNAs fornecidos na Tabela 5 ou um precursor miRNA dos mesmos e (c) identificação do indivíduo tendo ou não tendo um biomarcador de câncer baseado no nível medido de tal miRNA(s). Em um aspecto, a amostra biológica é essencialmente livre de células. Em certos aspectos, a amostra biológica pode ser uma amostra de linfa, saliva, urina ou sangue. Em um

aspecto, o método pode compreender adicionalmente a purificação de uma fração do exossomo de um fluido corporal.

[0027] Ainda em outra modalidade, a presente divulgação fornece um método para entrega do RNA inibitório ativo compreendendo o contato de uma célula com um RNA inibitório que é fornecido em associação com um complexo de proteínas RISC. Em um aspecto, o complexo de proteínas RISC compreende TRBP, DICER e AGO2. Em alguns aspectos, o RNA inibitório é um siRNA ou shRNA. Em um aspecto, o RNA inibitório é um miRNA humano.

[0028] Em certos aspectos,o RNA inibitório e o complexo de proteína RISC estão compreendidos em um lipossoma, uma nanopartícula ou um micro cápsula composta por uma bicamada lipídica. Em um aspecto, a microcápsula é um exossomo.

[0029] Em alguns aspectos, um método compreende adicionalmente a transfecção de uma célula com o RNA inibitório e o complexo de proteína RISC. Em outro aspecto, o método compreende adicionalmente a administração do RNA inibitório e o complexo de proteína RISC a um indivíduo.

[0030] Ainda em outra modalidade, a presente divulgação fornece uma composição compreendendo um RNA inibitório recombinante ou sintético em associação com um complexo de proteína RISC, tal complexo compreendido em um lipossoma, uma nanopartícula ou uma micro cápsula. Em um aspecto, o complexo de proteínas RISC compreende TRBP, DICER e AGO2. Em alguns aspectos, o RNA inibitório é um siRNA ou shRNA. Em alguns aspectos, o RNA inibitório é um miRNA humano. Em certos aspectos, o complexo é compreendido em um lipossoma sintético, uma nanopartícula ou uma microcápsula. Em um aspecto, a microcápsula é um exossomo.

[0031] Certos aspectos das modalidades como detalhadas *supra* compreendem a medição de um nível de um ou mais miRNA(s) (ou

precursor miRNA) em uma fração do exossomo de uma amostra selecionada à partir aquelas fornecidas na Tabela 5. Por exemplo, um método pode compreender a medição de um nível de um ou mais miRNA selecionados a partir do grupo consistindo em 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-548q-

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 e hsa-miR-302a (*isto é,* aqueles listados na Tabela 5).

[0032] Como usado neste documento, a especificação, "um" ou "uma" significa um ou mais. Como usado neste documento, nas reivindicações, quando usado em conjunto com a palavra "compreendendo", as palavras "um" ou "uma" podem significar um ou mais de um.

[0033] O uso do termo "ou" na reivindicação é usado para significar "e/ou" a menos que explicitamente indicado para se referir a apenas alternativas ou se as alternativas são mutuamente exclusivas, embora a divulgação suporte uma definição que se refere a apenas alternativas e "e/ou". Como usados neste documento, "outro(a)" pode significar pelo menos um segundo ou mais.

[0034] Em todo este pedido, o termo "cerca de" é usado para indicar que um valor inclui a variação inerente de erro para o dispositivo, o método sendo empregado para determinar o valor ou a variação que existe entre os indivíduos do estudo.

[0035] Outros objetivos, características e vantagens da invenção

atual serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada. Deve-se compreender, entretanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, ao indicarem as modalidades preferidas da invenção, são apresentados apenas a título de ilustração, uma vez que várias mudanças e modificações dentro do princípio e escopo da invenção se tornarão evidentes àquelas pessoas versadas na técnica à partir desta descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0036] As figuras a seguir fazem parte do presente relatório descritivo e estão incluídas para demonstrar adicionalmente certos aspectos da presente invenção. A patente ou arquivo de pedido contém pelo menos um desenho executado em cor. Cópias desta publicação de patente ou pedido de patente com desenho(s) coloridos serão fornecidas pelo escritório mediante solicitação e pagamento das taxa necessárias. A invenção pode ser melhor compreendida por referência a uma ou mais destas figuras em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas apresentadas neste documento.

[0037] As FIGs. 1A-F. Caracterização de Exossomos – Oncossomos são enriquecidos em miRNAs oncogênicos em comparação com normossomos. (A) Micrografia eletrônica de transmissão de oncossomos (foto superior esquerda e foto inferior esquerda e zoom inserido; linhas pontilhadas retratam a área de zoom). Imagens inferiores a direita produzidas por rotulação por immunogold usando anticorpo anti-CD9 e microscopia de transmissão de elétrons. (transmission electron microscopy, TEM na sigla em inglês) Partículas de ouro são retratadas como pontos pretos. O gráfico representa o tamanho médio das preparações de exossomos analisados a partir de 112 fotos do TEM. (B) Imagem de microscópio de força atômica (Atomic Force Microscopy, AFM na sigla em inglês) de exossomos de células de câncer de mama. O gráfico central representa a dispersão de partículas na lamela com faixa de tamanho de

exossomos. O gráfico a direita representa o tamanho médio das preparações de exossomos analisados a partir de 26 fotos do AFM. (C) Immunoblot usando anticorpo anti-Dicer em exossomos coletados de: linhas de células (blot a esquerda, primeiro painel) de camundongo (NMuMG) e humano (MCF10A) não tumorigênicas; linhas de células de câncer de camundongo, 67NR e 4T1 (blot central, primeiro painel); linhas de células de câncer humano MCF7 e MDA-MB231 (blot a direita, primeiro painel). Os controles usados foram: exossomos tratados com TritonX seguido de proteinase K (Triton + PK), para induzir lise de exossomos e subsequente degradação de proteínas exossomais; exossomos tratados com proteinase K para degradar proteínas extra-exossomais (PK); sobrenadante após ultracentrifugação para coletar exossomos (sobrenadante). Immunoblots TSG101 (segunda linha) e CD9 (terceira fila) foram usados para confirmar a presença de exossomos. (D) Análise de citometria de fluxo usando marcadores de exossomos TSG101, CD9, flotillina-1 e anticorpos CD63 de exossomos derivados de MDA-MB231 acoplados a grânulos de 0,4 μm. (E) Dimensionamento de exossomos com Espectroscopia de Dispersão de Luz (Light Scattering Spectroscopy, LSS na sigla em inglês). Calibração do sistema foi feita usando sinais de suspensões de tampão fosfato-salino (PBS) de microesferas de vidro com diâmetros nominais de 24 nm e 100 nm e microesferas de poliestireno com diâmetros nominais de 119 nm, 175 nm, 356 nm e 457 nm. Os espectros experimentais e ajustes resultantes são mostrados no gráfico à esquerda por microesferas de vidro com diâmetro nominal de 100 nm e microesferas de poliestireno com diâmetro nominal de 356 nm. Gráfico a direita representa a medição do tamanho de uma suspensão de PBS de exossomos de câncer. Inset mostra o mesmo gráfico com uma escala até 10 μm para eliminar a contaminação potencial das nossas preparações de exossomos com células e restos celulares. (F) Distribuição de tamanho de exossomos usando NanoSight. Gráfico esquerdo representa a distribuição

de tamanho de partículas em solução, apresentando um tamanho médio de 105 nm e também não demonstrando picos em tamanhos maiores. Gráfico a esquerda representa a distribuição por tamanho e concentração de partículas em solução por NanoSight. Os dados representados nesta figura são o resultado de três experimentos independentes cada um com três repetições, sendo representados como ± s.d.

[0038] As FIGs. 2A-F. Oncossomos tornam-se enriquecidos em miRNAs. (A) Gráfico de correlação de miRNAs expressados em exossomos MDA-MB231 e exossomos MCF10A. (B) Gráficos de correlação entre miRNAs nas células e respectivos exossomos usando 6 dos miRNAs expressos diferencialmente entre normossomos e oncossomos (miR-10a, 10b-miR, miR-21, miR-27a, miR-155 e miR-373) após 72h de cultura celular-livre. (C) Normossomos e oncossomos foram ressuspensos no meio DMEM e mantidos em cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h, exossomos foram recuperados e 15 miRNAs (ver Tabela 4) foram quantificados por qPCR. A modulação de cada miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 72h foi quantificada em relação ao mesmo miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 24 h. As parcelas gráficas representam uma média de modulação para o MiRNA supressor de tumor (ST) e oncogênico (ONC) em exossomos coletados após 72h em comparação com os coletados após 24h. (D) Northern blots de miR-10b e miR-21 de normossomos após 24 e 72 h de cultura celular livre e oncossomos sem cultura e com 24h, 72h e 96h de cultura celular livre. O tRNAMet foi usado como um controle de carregamento. Quantificação foi feita utilizando o software Image J. (E) Plots de correlação entre os 15 miRNAs quantificados em células MCF10A, MDA-MB231 e 4T1 e seus respectivos exossomos após 72h de cultura celular livre. Oncossomos apresentam valores de correlação baixos com sua célula de origem (gráficos central e direita) quando comparados a normossomos (gráfico à esquerda). (F) Representação gráfica do bioanalisador retratada em

unidades de fluorescência (UF) por segundos (s) e imagens de gel do conteúdo de exossomos de RNA de normossomos e oncossomos.

[0039] As FIGs. 3A-E. Exossomos contêm pre-miRNAs. (A) Quinze pre-miRNAs correspondentes aos miRNAs maduros estudados foram quantificados usando exossomos qPCR de MCF10A e MDA-MB231. O inverso do valor ΔCt para cada pre-miRNA foi plotado para refletir sua abundância e os valores são representados como ± s.d. (B) Oncossomos e normossomos foram ressuspensos em meio DMEM e mantidos em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h os exossomos foram extraídos mais uma vez e 15 pre-miRNAs foram quantificados por qPCR. Gráficos mostram modulação de cada pre-miRNA em exossomos MCF10A e MDA-MB231 após 72h de cultura celular livre em relação à 24h de cultura celular livre e são representados como ± s.d. (C) Northern blots de premiR-10b e pre-miR-21 usando normossomos MCF10A após 24h e 72h de cultura celular livre e oncossomos MDA-MB231 com 0 h, 24 h, 72h e 96 h de cultura celular livre. O tRNAMet foi usado como um controle de carregamento. Quantificação foi feita utilizando o software Image J. (D) Gráficos superiores: pre-miRNAs oncogênicos (gráfico à esquerda) e miRNAs oncogênicos (gráfico à direita) de oncossomos (MDA-MB231) foram quantificados após 24h e 72h de condições de cultura celular livre. O inverso do valor ΔCt para cada pre-miRNA (gráfico à esquerda) e miRNA (gráfico à direita) em diferentes pontos de tempo foi plotado para refletir sua abundância e uma tendência exponencial foi observada. Os dados apresentados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. Gráficos inferiores: pre-miRNAs (gráfico à esquerda) e miRNAs maduros (gráfico à direita) de oncossomos (MDA-MB231) foram quantificados após 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h e 96h de condições de cultura celular livre. O inverso do valor ΔCt para cada pre-miRNA (gráfico à esquerda) e miRNA (gráfico à direita) em diferentes pontos de tempo foi plotado e uma tendência exponencial foi

observada. Os dados apresentados nesta figura são o resultado de três experimentos independentes cada um com três repetições, sendo representados como ± s.d. (E) Oncossomos e normossomos foram ressuspensos em meio DMEM e mantidos em condições de cultura celular livre por 0h, 24h, 72h e 96h Exossomos foram extraídos de pontos de tempo diferentes e pre-miRNAs foram quantificados por qPCR. O inverso do valor ΔCt para cada pre-miRNA em pontos de tempo diferentes foi plotado para refletir sua abundância.

[0040] As FIGs. 4A-N. Oncossomos contêm proteínas RLC. (A) Immunoblot usando anticorpo anti-Dicer em exossomos coletados de: linhas de células (blot a esquerda, primeiro painel) de camundongo (NMuMG) e humano (MCF10A) não tumorigênicas; linhas de células de câncer de camundongo, 67NR e 4T1; e linhas de células de câncer humano MCF7 e MDA-MB231. Os controles usados foram: exossomos tratados com TritonX seguido de tratamento proteinase K (Triton + PK), para induzir lise de exossomos e subsequente degradação de proteínas exossomais; e exossomos tratados com proteinase K para degradar proteínas extra-exossomais (PK). Immunoblots TSG101 (segunda linha) e CD9 (terceira fila) foram usados para confirmar a presença de exossomos. (B) Micrográficos de transmissão de elétron da rotulação por immunogold usando anticorpo anti-Dicer em oncossomos (MDA-MB231). Imagem superior a direita é digitalmente ampliada à partir de uma nova imagem independente da extração. Controle negativo refere-se a IgG. Partículas de ouro são retratadas como pontos pretos e são indicadas por setas pretas da imagem inferior. Gráfico representa a quantificação das duas imagens superiores à esquerda. (C) Immunoblot usando anticorpo anti-sinalizador (painel superior) em exossomos MCF10A e MDA-MB231 coletados de células transfectadas com vetor vazio (pCMV-Tag4B; primeira e terceira faixas, respectivamente) e vetor Sinalizador-Dicer (segunda e quarta faixas). Immunoblot CD9 foi usado para confirmar a presença de

exossomos e como um controle de carregamento (painel inferior). (D) Immunoblot para Dicer em exossomos coletados de células MCF10A e MDA-MB231 tratadas com o ionóforo de cálcio A23187 (painel superior). Exossomos extraídos de células não tratadas foram utilizados como controle. Immunoblot CD9 (painel inferior) foi usado como controle para mostrar aumento na secreção de exossomos. (E) Immunoblot para Dicer em exossomos extraídos de células parentais MCF10A e MDA-MB231 e células transfectadas com plasmídeos shScramble e shDicer (blot superior). Immunoblot CD9 foi usado para mostrar a presença de exossomos e como um controle de carregamento (blot inferior). Quantificação de immunoblot foi feita utilizando o software Image J. (F) Micrográficos de transmissão de elétron da rotulação por immunogold usando anticorpo anti-Dicer em oncossomos derivados de células MDAMB231shDicer. Partículas de ouro são retratadas como pontos pretos. Gráfico à direita retrata a quantificação de partículas de ouro em imagens EM. (G) Immunoblot usando anticorpo anti-AGO2 em exossomos coletados de oncossomos (MCF7 e MDA-MB231) e normossomos (MCF10A). O controles usados foram: exossomos tratados com TritonX seguido de proteinase K (TritonX + PK), para induzir lise de exossomos e subsequente degradação de proteínas exossomais; exossomos tratados com proteinase K para degradar proteínas extra-exossomais (PK); sobrenadante após ultracentrifugação para coletar exossomos (sobrenadante). Immunoblots TSG101 (segunda linha) e CD9 (terceira linha) foram usados para confirmar a presença de exossomos. (H) Immunoblot usando anticorpo anti-TRBP em exossomos coletados de oncossomos (MCF7 e MDA-MB231) e normossomos (MCF10A). O controles usados foram: exossomos tratados com TritonX seguido de proteinase K (TritonX + PK), para induzir lise de exossomos e subsequente degradação de proteínas exossomais; exossomos tratados com proteinase K para degradar proteínas extra-exossomais (PK); sobrenadante após ultracentrifugação para coletar exossomos (sobrenadante). Immunoblots

TSG101 (segunda linha) e CD9 (terceira fila) foram usados como marcadores de exossomos. (I) Immunoblot usando anticorpo anti-GFP nas células MCF10A e MDA-MB231 transfectadas com plasmídeo GFP-AGO2 (painel superior). Beta-actina foi usada como controle de carregamento (painel inferior). (J) Immunoblot usando anticorpo anti-GFP em exossomos extraídos das células MCF10A e MDA-MB231 transfectadas com plasmídeo GFP-AGO2 (painel superior). TSG101 (painel central) e CD9 (painel inferior) foram utilizados como marcadores de exossomos e controles de carregamento. (K) Expressão de mRNA AGO2 em células MCF10A e MDA-MB231 transfectadas com siAGO2. Células parentais MCF10A e MDA-MB231 foram usadas como controles relativos para comparação de alteração de modulação. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (L) Immunoblot usando anticorpo AGO2 em exossomos extraídos de células parentais MCF10A e MDA-MB231 ou células transfectadas com sicontrol ou siAGO2 (painel superior). TSG101 (blot central) e CD9 (blot inferior) foram utilizados como marcadores de exossomos e controles de carregamento. Quantificação foi feita utilizando o software Image J. (M) Immunoblot usando o anticorpo AGO2 em proteínas exossomais extraídas de células MCF10A e MDA-MB231 imunoprecipitadas com anticorpo Dicer ou IgG (painel superior). 5% da entrada do lisado de exossomos extraído de células MDA-MB231 foi usado como controle. Immunoblot de Dicer foi usado como controle para a imunoprecipitação (painel inferior). (N) Immunoblot usando o anticorpo TRBP em proteínas exossomais extraídas de células MCF10A e MDA-MB231 imunoprecipitadas com anticorpo Dicer ou IgG (painel superior). Entrada do lisado de exossomos (5%) extraído de células MDA-MB231 foi usado como controle. Immunoblot de Dicer foi usado como controle (painel inferior).

[0041] As FIGs. 5A-E. Oncossomos processam pre-miRNAs para gerar miRNAs maduros. (A) Exossomos foram coletados de células

MCF10A, MCF10A, shScramble, MCF10A shDicer (gráfico superior), células MDA-MB231, shScramble MDA-MB231 e MDA-MB231 shDicer (gráfico inferior) e mantidos sob condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h, exossomos foram recuperados e 15 pre-miRNAs foram quantificados por qPCR. Gráficos mostram a modulação de cada pre-miRNA nos diferentes exossomos após 72h de cultura celular livre em relação à 24h de cultura celular livre e são representados como ± s.d. (B) Exossomos foram coletados de células MCF10A, MCF10A, shScramble, MCF10A shDicer (gráfico superior), células MDA-MB231, MDA-MB231 shScramble e MDA-MB231 shDicer (gráfico inferior) e mantidos sob condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h os exossomos foram extraídos mais uma vez e 15 pre-miRNAs foram quantificados por qPCR. Gráficos mostram a modulação de cada pre-miRNA nos diferentes exossomos após 72h de cultura celular livre em relação à 24h de cultura celular livre e são representados como ± s.d. (C) Immunoblot usando anticorpo secundário anticoelho e antimouse para detectar o anticorpo primário Dicer e o anticorpo primário Actina de cadeia pesada (CP) e de cadeia leve (CL) eletroporados em exossomos de células MDA-MB231. Exossomos eletroporados sem anticorpos derivados de células MDA-MB231 foram utilizados como controle negativo. Tratamentos de proteinase K foram realizados após eletroporação para garantir depleção dos anticorpos não incluídos em exossomos. (D) Oncossomos (MDA-MB231) foram coletados em duplicata (gráfico inferior) ou quadruplicata (gráfico superior). As amostras foram eletroporadas com anticorpo anti-Dicer, anticorpo anti-actina ou anticorpo anti-TRBP. As amostras e o controle foram deixados em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72h os exossomos foram extraídos mais uma vez e os 6 pre-miRNAs oncogênicos (gráfico superior) ou 15 pre-miRNAs (gráfico inferior) foram quantificados por qPCR. A modulação de cada pre-miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 72h foi quantificada em relação

ao mesmo pre-miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 24 h em cada amostra. As parcelas gráficas representam uma modulação média para pre-miRNAs (no gráfico inferior – ST = supressor do tumor; ONC = oncogênicos) em exossomos de 72h em relação a exossomos de 24 h e são representados como ± s.d. (E) Oncossomos (MDA-MB231) foram coletados em quadruplicata (gráfico superior) ou duplicata (gráfico inferior). As amostras foram eletroporadas com anticorpo anti-Dicer, anticorpo anti-actina ou anticorpo anti-TRBP. As amostras e o controle foram deixados em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72h os exossomos foram extraídos mais uma vez e os 6 miRNAs oncogênicos (gráfico superior) ou 15 miRNAs (gráfico inferior) foram quantificados por qPCR. A modulação de cada miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 72h foi quantificada em relação ao mesmo miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 24 h em cada amostra. As parcelas gráficas representam uma modulação média para os miRNAs (no gráfico inferior – ST = supressor do tumor; ONC = oncogênicos) em exossomos de 72h em relação a exossomos de 24 h e são representados como ± s.d.

[0042] As FIGs. 6A-F. Oncossomos processam pre-miRNAs para gerar miRNAs maduros. (A) Exossomos de células MDA-MB231 foram coletados e eletroporados com Geldanamicina. As amostras foram deixadas em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h, depois das quais exossomos foram extraídos e os 6 miRNAs foram quantificados por qPCR. A modulação de cada miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 72h foi quantificada em relação ao mesmo miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 24 h em cada amostra. As parcelas gráficas representam a modulação média para os miRNAs em exossomos de 72h em relação a exossomos de 24 h e são representados como ± s.d. (B) pre-miRNAs sintéticos -10b, -21 e – cel-1 foram eletroporados em exossomos coletados de células MCF10A (MCF10A eletrop.), MCF10AshDicer(MCF10AshDicer eletrop.), MDAMB231 (MDA-MB231

eletrop.) e MDA-MB231shDicer (MDAMB231shDicer eletrop.) Células TIRARTIRARTIRARTIRARTIRARTIRARTIRARTIRAR Exossomos foram recuperados após condições de cultura celular livre por 72h. pre-miR-10b, -21 e –cel-1 foram quantificados por qPCR antes e após 72 h de eletroporação e cultura. Cada barra nos plots mostra a modulação de pre-miR-10b, -21 e – cel-1 72 h após a eletroporação em relação à 0h após a eletroporação e são representados como ± s.d. Exossomos MCF10A e MDA-MB231 eletroporados na ausência de pre-miRNAs foram usados como controles para realçar níveis basais. (C) pre-miRNAs sintéticos -10b, -21 e – cel-1 foram eletroporados em exossomos coletados de células MCF10A (MCF10A eletrop.), MCF10AshDicer(MCF10AshDicer eletrop.), MDAMB231 (MDA-MB231 eletrop.) e MDAMB231shDicer (MDA-MB231shDicer eletrop.) Células TIRARTIRARTIRARTIRARTIRARTIRARTIRARTIRAR Exossomos foram recuperados após condições de cultura celular livre por 72h. MiR-10b, -21 e –cel-1 foram quantificados por qPCR antes e após 72 h de eletroporação e cultura. Cada barra nos plots mostra a modulação de pre-miR-10b, -21 e -cel-1 72 h após a eletroporação em relação à 0h (gráficos superiores) ou 24hrs (gráfico inferior) após a eletroporação e são representados como ± s.d. Exossomos MCF10A e MDA-MB231 eletroporados na ausência de pre-miRNAs foram usados como controles para determinar níveis basais. (D) Northern blot sem sonda de detecção, utilizando amostras do ensaio de corte em cubos. Diferentes extratos de proteína exossomais e pre-miR-10b sintéticos internamente marcados com biotina foram utilizados para o ensaio de corte em cubos. Amostras utilizadas foram MCF10A, MCF10AshDicer, exossomos MDA-MB231 (MDA231 Exos), exossomos de MDA-MB231shDicer clone1 e clone2 (MDA231shDicer 1 exos e MDA231shDicer 2 exos, respectivamente), células MDA-MB231shDicer e exossomos MDA-MB231 eletroporados com anticorpo Dicer (MDA231 exos + Dicer AB). (E) Northern blot sem sonda de detecção, utilizando amostras

do ensaio de corte em cubos. Diferentes extratos de proteína exossomais e pre-miR-21 sintéticos internamente marcados com biotina foram utilizados para o ensaio de corte em cubos. Amostras utilizadas foram MCF10A, MCF10AshDicer, exossomos MDA-MB231 (MDA231 Exos), exossomos de MDA-MB231shDicer clone1 e clone2 (MDA231shDicer 1 exos e MDA231shDicer 2 exos, respectivamente), células MDA-MB231shDicer e exossomos MDA-MB231 eletroporados com anticorpo Dicer (MDA231 exos + Dicer AB). (F) Northern blot sem sonda de detecção utilizando amostras do ensaio de corte em cubos. Diferentes extratos de proteína exossomais e pre-cel-miR-1 sintéticos internamente marcados com biotina foram utilizados para o ensaio de corte em cubos. Amostras utilizadas foram MCF10A, MCF10AshDicer, exossomos MDA-MB231 (MDA231 Exos), exossomos MDAMB231shDicer (MDA231shDicer exos) e exossomos MDAMB231 eletroporados com anticorpo Dicer (MDA231 exos + Dicer AB).. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD.

[0043] As FIGs. 7A-H. Oncossomos induzem alterações no transcriptoma nas células recipientes e formação de tumor em uma forma dependente de Dicer. (A) Immunoblot usando anticorpo anti-PTEN e extratos de proteína de células MCF10A tratadas por 0, 30min, 1h, 12h e 24h com oncossomos MDA-MB231 após cultura celular livre. Beta-actina foi usada como controle de carregamento. (B) Immunoblot usando anticorpo anti-HOXD10 e extratos de proteína de células MCF10A tratadas por 0, 30min, 1h, 12h e 24h com oncossomos MDA-MB231 após cultura celular livre. Beta-actina foi usada como controle de carregamento. (C) Gráfico mostrando a atividade repórter da luciferase nas células MCF10A transitoriamente transfectadas com 3'UTR-PTEN-WT, 3'UTRPTEN-Mut, 3'UTR-HOXD10-WT e 3'UTR-HOXD10-Mut e tratadas com oncossomos derivados de células MDA-MB231. (D) Immunoblot usando anticorpo anti-PTEN (painel superior) e anticorpo anti-HOXD10 (painel central) e extratos

de proteínas de células MCF10A tratadas por 0, 30min, 1h, 12h e 24h com oncossomos MDAMB231 eletroporados com anticorpo Dicer após condições de cultura celular livre. Beta-actina foi usada como controle de carregamento. (E) Immunoblot usando anticorpo anti-Smad4 (painel superior) e extratos de proteína de células MCF10A e células MCF10A tratadas com exossomos MDA-MB231 com exossomos anti-miR-182-5 p e MDA-MB231 sem tempo de cultura celular livre. Beta-actina foi usada como controle de carregamento. (F) Viabilidade da célula medida pelo ensaio MTT durante 5 dias da cultura de células MCF10A, as células MCF10A tratadas com exossomos MDA-MB231 sem tempo de cultura celular livre (MCF10A + MDA231 exos), as células MCF10A tratadas com exossomos MDA-MB231 com tempo de cultura celular livre (células MCF10A + cultura exos MDA231) e as células MCF10A tratadas com exossomos MDA-MB231 eletroporados com o anticorpo de Dicer com tempo de cultura celular livre (células MCF10A + MDA231 exos Dicer AB) e são representadas como ± s.d. * p=0.0027. (G) O ensaio de formação de colônia mostra a formação de colônias na placa de cultura e rotulados com MTT reagente após 8 dias de cultura de células MCF10A, , as células MCF10A tratadas com exossomos MDA-MB231 sem tempo de cultura celular livre (MCF10A + MDA231 exos), as células MCF10A tratadas com exossomos MDA-MB231 com tempo de cultura celular livre (células MCF10A + cultura exos MDA231) e células MCF10A tratadas com exossomos MDA-MB231 eletroporados com anticorpo Dicer com tempo de cultura celular livre (células MCF10A + MDA231 exos Dicer AB). (H) Gráfico superior: Células MCF10A, células MCF10A expostas a oncossomos MDA-MB-231 (células MCF10A + cultura exos MDA231), células MCF10A expostas a oncossomos MDA-MB231 eletroporados com anticorpo Dicer (células MCF10A + MDA231 exos Dicer AB) e células MCF10A expostas a oncossomos MDAMB231 eletroporados com anticorpo Actina (células MCF10A + MDA231 exos Actina AB) foram ortotopicamente injetados nas glândulas mamárias de camundongos nude

atímicos. Gráfico mostra o volume do tumor em relação ao tempo e são representados como ± s.d. *p=0,005. Gráfico inferior: Células MCF10A, células MDA-MB231 e células MCF10A expostas a oncossomos (MDA-MB231) foram ortotopicamente injetadas nas glândulas mamárias de camundongos nude atímicos. Gráfico retrata o volume do tumor em relação ao tempo.

[0044] As FIGs. 8A-I. Soro de pacientes com câncer de mama contêm Dicer e processam pré-miRNAs. (A) Immunoblot usando anticorpo anti-Dicer, que reconhece Dicer humano e de camundongo, e extratos de proteína de exossomos de soro coletados de camundongo xenoenxertados com tumores humanos (como mostrado na FIG. 18A). OVA1-5 representa xenoenxertos de ovário humano; END1-3 representa xenoenxertos de endométrio humano; e BRST1 e 2 representam xenoenxertos de mama humana. Exossomos 4T1 e células foram usados como controles para Dicer murino. hsa-Dicer representa o peso molecular de Dicer humano e mmu-Dicer representa o peso molecular do Dicer murino. Ver FIG. 18D para coloração Comassie das membranas como controle de carregamento. (B) Análise de rastreamento de partícula NanoSight mostrando a distribuição de tamanho de exossomos extraídos do soro de 8 doadores saudáveis (gráfico à esquerda) e 11 pacientes com câncer de mama (gráfico à direita). Concentração das amostras foi padronizada para mostrar melhor o tamanho. (C) Micrografia de transmissão de elétron de exossomos coletados do soro de pacientes com câncer de mama. (D) Concentração de exossomos do soro de 8 doadores saudáveis e 11 pacientes com câncer de mama avaliados pela análise de rastreamento de partícula Nanosight. *p = 0,012 (E) Exossomos foram coletados do soro fresco de 8 doadores saudáveis e 11 pacientes com câncer de mama. As amostras extraídas foram deixadas em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h, exossomos foram recuperados e 6 pré-miRNAs foram quantificados por qPCR. A modulação de cada pré-miRNA em exossomos após a cultura

celular livre de 72h foi quantificada em relação ao mesmo pré-miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 24 h em cada amostra. As parcelas gráficas em pontos representam a modulação média para os pre-miRNAs em exossomos de 72h em relação a exossomos de 24 h e são representados como ± s.d. (F) Exossomos foram coletados do soro fresco de 8 doadores saudáveis e 11 pacientes com câncer de mama. As amostras extraídas foram deixadas em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h, exossomos foram recuperados e 6 miRNAs foram quantificados por qPCR. A modulação de cada miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 72h foi quantificada em relação ao mesmo miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 24 h em cada amostra. As parcelas gráficas em pontos representam a modulação média para os pre-miRNAs em exossomos de 72h em relação a exossomos de 24h. Ambos os painéis E e F são o resultado de três experimentos independentes cada um com três repetições, sendo representados como ± s.d. (G) Células MCF10A, células MCF10A misturadas com exossomos de doadores saudáveis (H1-8) e células MCF10A misturadas com exossomos de pacientes com câncer de mama (BC1-11) foram ortotopicamente injetadas nas glândulas mamárias de camundongos nude atímicos. O número de exossomos usado foi calculado por peso corporal, refletindo a concentração inicial coletada do soro. Amostras que não formaram um tumor aparecem sobrepostas no EIXO X do gráfico. Este gráfico mostra o volume do tumor em relação ao tempo e é representado como ± s.d. (H) Immunoblots usando o anticorpo anti-Dicer e extratos de proteína de exossomos de soro coletados de 5 indivíduos saudáveis (C46, C45, C44, C43 e C41) e 4 cânceres de mama metastáticos (Met219, Met354, Met299 e Met356) usando o CD9 blot como controle de carregamento. (I) Duplicação de tempo de HDF e HDF tratado com oncossomos (MDA-MB231). * p=0,0114. Quantificação de immunoblot foi feita utilizando o software Image J.

[0045] As FIGs. 9A-B. Dicer está presente nos corpos multivesiculares e CD43 citoplasmático mobiliza Dicer em exossomos. (A) Immunoblot de CD43 em extratos de proteínas de células MDA-MB231 imunoprecipitadas com anticorpo Dicer (IP Dicer) ou IgG (painel superior, faixas direita e central, respectivamente). Apenas immunoblot de Dicer foi usado como controle (painel inferior). (B) Immunoblot de Dicer em extratos de proteínas de exossomos derivados MDA-MB231 e exossomos derivados MDA-MB231 siCD43. Immunoblot CD9 foi usado como um controle de carregamento. Quantificação foi feita utilizando o software Image J.

[0046] As FIGs. 10A-E. Caracterização de exossomos. (A) Fotografia de exossomos PKH26 corados, na parte inferior do tubo de ultracentrifugação. Inset representa a imagem digital ampliada dos exossomos. (B) Representação esquemática do sistema experimental usado para coletar espectros LSS. (C) Viabilidade celular medida pelo ensaio MTT durante 5 dias de cultura de células MCF10A, NMuMG, MDA-MB231 e 4T1. (D) Análise de fluxo de citometria para iodeto de propídeo (PI) e Anexina V de células MDA-MB231 e 4T1. Células MDA-MB231 tratadas com etoposida foram utilizadas como controle positivo para apoptose. (E) Análise immunoblot de citocromo C em exossomos usando células MDA-MB231 como um controle positivo e TSG101 como um controle de carregamento para exossomos. Os dados apresentados nesta figura são o resultado de três experimentos independentes cada um com três repetições, sendo representados como ± s.d.

[0047] As FIGs. 11A-E. Oncossomos são enriquecidos em miRNAs em comparação a normossomos. (A) Representação gráfica bioanalisadora retratada em unidades de fluorescência (UF) por nucleotídeos (nt) (gráficos) e imagens de gel (imagem à direita) do conteúdo do RNA de linhas de célula mamárias humanas MCF10A (não tumorigênicas) e MDA-MB231 (câncer de mama). (B) Exossomos coletados de células 4T1, MCF10A e MDA-MB231 foram resuspensos em meio DMEM e mantidos em condições

de cultura celular livre por 24 e 72 hrs. Após 24 e 72 h, exossomos foram recuperados e 15 miRNAs (ver Tabela 4) foram quantificados por qPCR. Gráficos mostram modulação de cada miRNA em oncossomos após a cultura celular livre para 24h (gráficos superiores) e 72h (gráficos inferiores) em relação aos normossomos após 24 e 72 h de cultura celular livre, respectivamente. Os dados representados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (C) Quinze miRNAs maduros (ver Tabela 4) foram quantificados por qPCR em células MCF10A (gráfico à esquerda), MDA-MB231 (gráfico central) e 4T1 (gráfico à direita) e seus respectivos exossomos. A modulação de cada miRNA em exossomos foi quantificada em relação ao mesmo miRNA em células. ST: miRNAs supressores de tumor; ONC: miRNAs oncogênicos. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (D) Exossomos coletados de células MCF10A, MDA-MB231 e 4T1 foram resuspensos em meio DMEM e mantidos em condições de cultura celular livre por 24 e 72 hrs. Após 24 e 72 h os exossomos foram extraídos mais uma vez e 15 miRNAs (ver Tabela 4) foram quantificados por qPCR. A modulação de cada miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 72h foi quantificada em relação ao mesmo miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 24 h. Dados correspondem aos gráficos detalhados dos gráficos de média de modulação na FIG. 2C. Os dados apresentados nesta figura são o resultado de três experimentos independentes cada um com três repetições, sendo representados como ± s.d. (E) Plots de correlação entre os 15 miRNAs quantificados em células MCF7 e 67NR e seus respectivos exossomos após 72h de cultura celular livre.

[0048] As FIGs. 12A-E. Exossomos contêm pre-miRNAs. (A) Quinze pre-miRNAs correspondentes aos miRNAs maduros previamente quantificados (ver Tabela 4) foram quantificados por qPCR em exossomos NMuMG e 4T1. O inverso do valor ΔCt para cada pre-miRNA foi plotado para refletir sua abundância. Os dados são o resultado de três réplicas

biológicas e são representados como ± s.d. (B) Exossomos coletados de células NMuMG e 4T1 foram resuspensos em meio DMEM e mantidos em condições de cultura celular livre por 24 e 72 hrs. Após 24 e 72 h os exossomos foram extraídos mais uma vez e 15 pré-miRNAs foram quantificados por qPCR. Gráficos mostram a modulação de cada pré-miRNA nos exossomos NMuMG e 4T1 após 72h de cultura celular livre em relação à 24h de cultura celular livre. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (C) Expressão de mRNA de XPO5 em células MDAMB231 com dois siRNAs transitoriamente transfectados direcionado ao XPO5 comparado conforme uma modulação controla as células. (D) Células MDA-MB231 foram transfectadas com construtos de XPO5 siRNA e expressão de miR-21 foi avaliada em vários pontos de tempo 12h pós-transfecção (0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h e 96h). Como uma comparação para mostrar o efeito de períodos longos de centrifugação células MDA-MB231 transfectadas com construtos de XPO5 siRNA foram centrifugadas a 4°C por 3h e colocadas de volta na cultura. Expressão de miR-21 foi avaliada em vários pontos de tempo pós centrifugação de pontos de tempo (0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h e 96h). Processamento de premiR21 a miR-21 é atrasado nas células centrifugadas (barra verde). Os dados apresentados nesta figura são o resultado de três experimentos independentes cada um com três repetições, sendo representados como ± s.d. (E) Exossomos coletados de células NMuMG e 4T1 foram resuspensos em meio DMEM e mantidos em condições de cultura celular livre por 0, 24, 72 e 96h em condições de cultura celular livre. Exossomos foram extraídos de pontos de tempo diferentes e pre-miRNAs foram quantificados por qPCR. O inverso do valor ΔCt para cada pré-miRNA em pontos de tempo diferentes foi plotado para refletir sua abundância. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD.

[0049] As FIGs. 13A-H. Oncossomos contêm Dicer. (A) Imagem de

micrografia de transmissão de elétrons produzida por rotulação por immunogold usando anticorpo anti-Dicer (foto à direita) e o controle negativo (foto à esquerda) em exossomos derivado de células MCF10A. Compare com FIG. 4B para rotulação positiva por immunogold de exossomos MDA-MB231. (B)Imagem de micrografia de transmissão de elétrons produzida por rotulação por immunogold usando anticorpo anti-GFP exossomos derivados de MDA-MB231. (C) Immunoblot usando anticorpo anti-sinalizador (painel superior) em células MCF10A e MDA-MB231 transfectadas com vetor vazio (pCMV-Tag4B; primeira e terceira faixas, respectivamente) e vetor Sinalizador-Dicer (segunda e quarta faixas). Immunoblot beta-actina foi usado como controle de carregamento (painel inferior). (D) Immunoblot usando anticorpo anti-Dicer (painel superior) em células de MCF10A, MCF10AshScramble e MCF10AshDicer clones 1 e 2, respectivamente (MCF10AshDicer clone1 e MCF10AshDicer clone2). Immunoblot beta-actina foi usado como controle de carregamento (painel inferior). (E) Immunoblot usando anticorpo anti-Dicer (painel superior) em células MB231-MDA, MDA-MB231shScramble e MDA-MB231shDicer clones 1 e 2, respectivamente (MDA-MB231shDicer clone1 e MDA-MB231shDicer clone2). Immunoblot beta-actina foi usado como controle de carregamento (painel inferior). Quantificação de immunoblot foi feita utilizando o software Image J. (F) Immunoblot usando o anticorpo AGO2 em proteínas exossomais extraídas de células MCF10A e MDA-MB231 imunoprecipitadas com anticorpo Dicer ou IgG (painel superior). 5% da entrada do lisado de exossomos extraído de células MDA-MB231 foi usado como controle. Immunoblot de Dicer foi usado como controle para a imunoprecipitação (painel inferior). (G) Immunoblot usando o anticorpo anti-TRBP em proteínas exossomais extraídas de células MCF10A e MDA-MB231 imunoprecipitadas com anticorpo Dicer ou IgG (painel superior). Entrada do lisado de exossomos (5%) extraído de células MDA-MB231 foi usado como controle. Immunoblot de Dicer foi usado como controle para a

imunoprecipitação (painel inferior). (H) Immunoblot de Dicer em oncossomos de linhas de célula (blot superior) A549 (câncer de pulmão humano), SW480 (câncer de cólon humano), HeLa (câncer de colo deútero humano) e 4T07 (câncer de mama murino). Immunoblot TSG101 foi usado para confirmar a presença de exossomos e carregamento (blot inferior).

[0050] As FIGs. 14A-F. Detecção de Dicer em exossomos. (A) Immunoblot usando anticorpo anti-Dicer em células 4T1, 4T1shScramble e 4T1shDicer e exossomos coletados de 4T1 (exos 4T1) e células 4T1shDicer (exos 4T1shDicer) (blot superior). Immunoblot GADPH foi usado como controle de carregamento (blot inferior). Quantificação foi feita utilizando o software Image J. (B) Exossomos foram coletados das células 4T1, 4T1shScramble e 4T1shDicer e mantidos em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h os exossomos foram extraídos mais uma vez e 15 pré-miRNAs foram quantificados por qPCR. Gráficos mostram a modulação de cada pré-miRNA nos diferentes exossomos após 72h de cultura celular livre em relação à 24h de cultura celular livre. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (C) Exossomos foram coletados das células 4T1, 4T1shScramble e 4T1shDicer e mantidos em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h os exossomos foram extraídos mais uma vez e 15 pré-miRNAs foram quantificados por qPCR. Gráficos mostram a modulação de cada pré-miRNA nos diferentes exossomos após 72h de cultura celular livre em relação à 24h de cultura celular livre. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (D) Exossomos foram coletados das células MDA-MB231 duplicadas. Uma das amostras foi eletroporada com anticorpo anti-Dicer. Ambas amostras foram deixadas em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h os exossomos foram extraídos mais uma vez e 15 pre-miRNAs (ver Tabela 4) foram quantificados por qPCR. A modulação de cada pre-miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 72h foi quantificada em relação

ao mesmo pré-miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 24h em cada amostra. As parcelas gráficas representam modulação de pre-miRNAs em exossomos de 72h em relação a exossomos de 24h e são uma análise detalhada do gráfico representado na FIG. 5D. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (E) Exossomos foram coletados das células MDA-MB231 duplicadas. Uma das amostras foi eletroporada com anticorpo anti-Dicer. Ambas amostras foram deixadas em condições de cultura celular livre por 24 e 72 h. Após 24 e 72 h os exossomos foram extraídos mais uma vez e 15 miRNAs (ver Tabela 4) foram quantificados por qPCR. A modulação de cada miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 72h foi quantificada em relação ao mesmo miRNA em exossomos após a cultura celular livre de 24h em cada amostra. As parcelas gráficas representam modulação de miRNAs em exossomos de 72h em relação a exossomos de 24h e são uma análise detalhada do gráfico representado na FIG. 5E. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (F) Representação gráfica das categorias (Oncogênica, Supressor de Tumor e Não-determinado relacionadas ao Câncer) dos miRNAs negativamente regulados em exossomos MDA-MB231 eletroporados com Dicer (MDA-MB231 exos Dicer AB) comparados aos exossomos MDA-MB231 (exos MDA-MB231). MicroRNAs foram atribuídos a cada categoria, com base na literatura. Os dados apresentados nesta figura são o resultado de três experimentos independentes cada um com três repetições, sendo representados como ± s.d.

[0051] As FIGs. 15A-C. Detecção de Dicer em exossomos. (A) Exossomos foram coletados de células MCF10, MCF10AshDicer, MDA-MB231 e MDA-MB231shDicer e eletroporados com pré-miRNA-10b, -21 e –cel-1 sintéticos. Cada pre-miRNA foi quantificado por qPCR nos exossomos de eletroporados e representado como uma modulação em relação ao exossomos que foram eletroporados com apenas tampão de eletroporação.

(B) Dot blot de biotina internamente rotulada pre-miR-21, -10b e -cel-1. (C) Análise de expressão miR-10b, -21 e –cel-1 de células MCF10A transfectadas com pre-miR-10b, -21 e –cel-1. Cada barra representa a modulação das células transfectadas em comparação com as não transfectadas. Os dados apresentados nesta figura são o resultado de três experimentos independentes cada um com três repetições, sendo representados como ± s.d.

[0052] As FIGs. 16A-I. Dicer está presente nos corpos multivesiculares e CD43 citoplasmático mobiliza Dicer em exossomos. (A) Gráfico representa a porcentagem de co-localização nas imagens confocais como quantificada utilizando software Image J. (B) Expressão de mRNA de hrs, TSG101 e BiG2 após regulação negativa usando dois siRNAs diferentes para Hrs e TSG101 e dois clones sh diferentes para BiG2. Células shScramble não transfectadas e transfectadas foram utilizadas como controle. (C) Quantificação da proteína por ensaio de Bradford de exossomos extraídos de MCF10A, MCF10AsiHrs, MDA-MB231 e MDA-MB231siHrs (gráfico à esquerda),MCF10shScramble, MCF10AshBiG2, MDA-MB231shScramble, MDA-MB231shBiG (gráfico central) e MCF10AsiTSG101 e MDA-MB231siTSG101 (gráfico à direita). Células parentais não transfectadas foram usadas como controles relativos para análise de modulação. Dados foram normalizados pelo número celular e são o resultado de três repetições biológicas representadas como SD. (D) Immunoblot de CD9 em extratos de proteínas exossomais de células (blot superior) MCF10A, MCF10AsiTSG101 (siTSG101), MCF10AsiHrs (siHrs) e MCF10AshBiG2 (shBiG2); immunoblot de CD9 em extratos de proteínas exossomais de células MDA-MB231, MDA-MB231siTSG101 (siTSG101), MDA-MB231siHrs (siHrs) e MDA-MB231shBiG2 (shBiG2). (E) Análise de rastreamento de partícula Nanosight de exossomos derivados de MDA-MB231, MDA-MB-231siTSG101, -siHrs e shBiG2 mostrando regulação negativa do número de exossomos em células reguladas negativamente

Hrs, TSG101 e BiG2 e a distribuição de tamanho de exossomos esperada. (F) Expressão de mRNA de Dicer em células MCF10A, MCF10AshScramble, MCF10AsiHrs,MCF10AshBiG2, MCF10AsiTSG101, MDA-MB231, MDA-MB231shScramble,MDA-MB231siHrs, MDA-MB231shBiG2, MDA-MB231siTSG101, 4T1, 4T1siHrs,4T1shBiG2 e 4T1siTSG101. Células parentais foram usadas como controles relativos para comparação de modulação. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (G) Immunoblot de Dicer em extratos de proteína de células de câncer MDA-MB231 e 4T1 imunoprecipitadas com anticorpo anti-Dicer (blot superior, duas faixas da esquerda) juntamente com 5% da entrada que corresponde ao lisado de proteína usado para a imunoprecipitação (blot superior, duas faixas de direita). Immunoblot de poli-ubiquitina em extratos de proteína de células MDA-MB231 e 4T1 imunoprecipitadas com anticorpo anti-Dicer (blot inferior, duas faixas da esquerda) juntamente com 5% da entrada que corresponde ao lisado de proteína usado para a imunoprecipitação (blot superior, duas faixas de direita). (H) Expressão mRNA de CD43 nas células MCF10A, MCF10AsiCD43, MDA-MB231 e MDA-MB231siCD43. Células parentais MCF10A e MDA-MB231 foram usadas como controles relativos para comparação de modulação. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD. (I) Expressão mRNA de Dicer nas células MCF10A, MCF10AsiCD43, MDA-MB231 e MDA-MB231siCD43. Células parentais MCF10A e MDA-MB231 foram usadas como controles relativos para comparação de modulação. Os dados são o resultado de três réplicas biológicas e são representados como SD.

[0053] As FIGs. 17A-G. Oncossomos induzem alterações no transcriptoma no recebimento de células e formação de tumor em uma forma dependente de Dicer. (A) Análise de rastreamento de partícula Nanosight de exossomos derivado de células MDA-MB231 CD63-GFP. A linha preta representa uma medida da população total de exossomos e a

linha verde retrata a população de exossomos que é rotulada com CD63-GFP usando o NanoSight equipado com um feixe de laser 488nm . Cinza claro e verde claro representam as barras de erro de cada medida. (B) Immunoblot usando anticorpo anti-PTEN e extratos de proteína de células MCF10A tratadas por 0, 30min, 1h, 12h e 24h com oncossomos MDA-MB231 extraídos recentemente. Beta-actina foi usada como controle de carregamento. (C) Immunoblot usando anticorpo anti-HOXD10 e extratos de proteína de células MCF10A tratadas por 0, 30min, 1h, 12h e 24h com oncossomos MDA-MB231 extraídos recentemente. Beta-actina foi usada como controle de carregamento. (D) Células MCF10A foram transfectadas com siRNA para XPO5 para regular negativamente o fluxo de pre-miRNAs para o citoplasma do núcleo. O processamento de pre-miR15 foi avaliado pela medição dos níveis de miR-15 ao longo do tempo (6h, 12h, 24h, 36h e 48h) em células MCF10AsiXPO5 e células MCF10AsiXPO5 tratadas com exossomos MDA-MB231 com e sem o anticorpo Dicer. Não houve mudanças significativas. (E) Expressão miR182-5P foi monitorada em exossomo derivado de MDA-MB231 ao longo do tempo (0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h e 96h). Cada barra representa a modulação de cada ponto de tempo em comparação com 0h. Não houve mudanças significativas. (F) Gráfico fornece quantificação número de colônia da FIG. 7G. * p=0.0006. (G) Immunoblot usando anticorpo anti-Dicer e extratos de proteína de células MCF10A tratadas por 0, 30min, 1h, 12h e 24h com oncossomos MDA-MB231 eletroporados com anticorpo Dicer após condições de cultura celular livre. Tubulina alfa foi usada como controle de carregamento.

[0054] As FIGs. 18 A-D Exossomos de pacientes com câncer de mama, processam pré-miRNAs e inserem células em diferentes órgãos. (A) Fotos representativas de xenoenxertos ortotópicos derivados de fragmentos de ovário humano fresco primário, tumores endometriais e de mama em camundongos nude. (B) Coloração de ovário por hematoxilina-eosina (HE), xenoenxertos ortotópicos de endométrio e câncer de mama. (C) Micrografia

de transmissão de elétrons de exossomos de soro coletados de camundongos com xenoenxertos ortotópicos de tumor. (D) Coloração Comassie das membranas de immunoblots representadas na FIG. 8A.

DESCRIÇÃO DE MODALIDADES ILUSTRATIVAS

[0055] Progressão de câncer é dependente de uma comunicação eficaz entre as células no tumor. Exossomos são nanovesículas secretadas por todos os tipos de células e contêm proteínas e ácidos nucleicos. Exossomos secretados pelas células de câncer contêm especificamente microRNAs (miRNAs) associados ao RISC (RNA Induced Silencing Complex, Complexo Silenciador Induzido por RNA - Dicer/TRBP/AGO2) e possuem capacidade autônoma de célula para processar microRNAs precursores (pre-miRNAs) em miRNAs maduros. A existência de miRNAs associados ao RISC ao invés de miRNAs puros permite um silenciamento altamente eficiente e rápido dos mRNAs em células-alvo, alterando efetivamente seu transcriptoma. As proteínas do RISC em células cancerosas são direcionadas especificamente a corpos multivesiculares (MVBs) e posteriormente, em exossomos em uma forma dependente de CD43. MiRNAs com RISC incorporado de exossomos estimulam células epiteliais não tumorigênicas para formar tumores por meio de indução específica de vias oncogênicas e ativar os fibroblastos estromais. Este estudo desvenda o possível papel dos exossomos de câncer na indução de um "efeito de campo" oncogênico, que subjuga ainda mais as células normais a participar no desenvolvimento e progressão do câncer. Além disso, a biogênese do miRNA pode ocorrer de forma independente de célula em exossomos, oferecendo novas oportunidades para projetar uma terapia alvo eficiente mediada por miRNA para uma variedade de doenças.

I. Exossomos derivados de câncer

[0056] Tumores contêm células cancerosas e elementos estromais (Tse e Kalluri, 2011). Indícios emergentes sugerem que a comunicação entre as células dos tumores e seus arredores também determinam a taxa

e intensidade de disseminação sistêmica no câncer (Luga *et al.*, 2012). Alguns estudos sugerem que os tumores primários podem formar e preparar locais de tumor secundário para futuras metástases por meio de fatores de secreção de células de câncer (Hood *et al.*, 2011; Peinado *et al.*, 2012). Foram identificados vários destes mediadores, que incluem fatores de crescimento solúveis, metabólitos de glicose, quimiocinas, enzimas, micropartículas, microvesículas, exossomos e ácidos nucleicos livres (Guermonprez *et al.*, 2002; Luga *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2012; Simons e Raposo, 2009; Thery e Casas, 2002).

[0057] Nos últimos anos houve uma infinidade de publicações relacionadas a exossomos e sua associação com câncer (Yang and Robbins, 2011). A maioria dos estudos mostra que células cancerosas secretam maior número de exossomos quando comparadas a células normais (Yang and Robbins, 2011). Células cancerosas hipóxicas verteram mais exossomos do que as células cancerosas normóxicas (King *et al.*, 2012). É esperado que exossomos derivados de câncer transportem cargas úteis específicas de proteínas e ácidos nucleicos, incluindo miRNAs (Valadi *et al*, 2007). Ao mesmo tempo que são estimulantes, tais estudos ficam aquém ao explicar como proteínas e miRNAs podem induzir alterações funcionais significativas nas células alvo, perto ou longe. A maioria dos estudos identificaram miRNAs maduros em exossomos, mas sua função é desconhecida. Além disso, miRNAs de fita única são altamente ineficientes no silenciamento de mRNAs alvo sem incorporação de RISC para facilitar o reconhecimento do mRNA. Proteínas do RLC reconhecem o pre-miRNA e o processam em um duplex de RNA de 22 nucleotídeos. AGO2 seleciona uma fita para silenciamento genético subsequente enquanto a outra fita é por vezes degradada. A reação geral é espontânea e não requer quaisquer fatores para além das três proteínas e do pre-miRNA incorporado (Maniataki and Mourelatos,2005). Portanto, para que um miRNA seja totalmente funcional ele precisa de processamento com RLC incorporado

de seu pre-miRNA e reconhecimento e silenciamento de mRNA mediado por AGO.

[0058] Neste documento, os perfis de miRNA de exossomos de células cancerígenas (oncossomos) e células de controle (normossomos) foram analisados e as capacidades funcionais de miRNAs exossomais foram avaliadas na realização de silenciamento de genes e alteração do transcriptoma da célula alvo. Especificamente, oncossomos contêm Dicer, TRBP e AGO2 como um complexo funcional com uma capacidade de processar pre-miRNAs em miRNAs. Os pre-miRNAs estavam presentes em todos os exossomos mas apenas processados nos oncossomos devido à presença de RLC. Curiosamente houve preferência por acumulação de pre-miRNAs/miRNAs oncogênicos nos oncossomos, isso podendo ser mero reflexo do conteúdo de pre-miRNA de células cancerígenas, que foram geralmente enriquecidas em miRNAs/pre-miRNAs oncogênicos (Bartels e Tsongalis, 2009; Nicoloso *et al.*, 2009).

[0059] Relatórios anteriores sugeriram a presença de miRNA em exossomos e houve especulação sobre a sua função (Valadi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). Dado que os miRNAs precisam estar presentes em uma concentração estequiométrica para silenciamento apropriado de alvos mRNA, é improvável que exossomos em circulação proporcionariam concentrações suficientes de miRNAs maduros para reprimir o transcriptoma alvo. O processamento dos pre-miRNAs originados de exossomos nas células recipientes é algo improvável porque a biogênese de miRNA em células recipientes é limitante da taxa não só devido à quantidade total de pre-miRNAs disponíveis para processamento já existentes no interior da célula, mas também devido a limitação da taxa de quantidades de enzimas necessárias. Portanto, é mais eficiente ter miRNAs maduros inserindo células recipientes para alteração direta da expressão de gene de maneira pós transcricional sem ter que passar por uma via de processamento, como aconteceria no caso onde pre-miRNAs fossem

transferidos para células recipientes, e não os respectivos miRNAs maduros. Biogênese de miRNA específica em exossomos resolve este dilema para as células cancerosas. Oncossomos ficam altamente enriquecidos em um subconjunto de miRNAs maduros que são associados ao RISC e podem desempenhar um papel biológico importante na formação do fenótipo das células alvo.

[0060] Além disso, as células cancerosas superexpressam miRNAs com potencial oncogênico, como o miR-21 e miR-155, que lhes proporcionam uma vantagem proliferativa e de sobrevivência e estão associados a estágio clínico avançado, metástase e mau prognóstico (Yan *et al*, 2008). Também foi anteriormente relatado que estes miRNAs são superexpressos na circulação de pacientes com câncer (Mao *et al.*, 2013). A síntese de miRNAs em células é uma reação enzimática e, portanto, depende da quantidade de enzimas-chave, tais como Dicer, presentes em seu citoplasma. Dicer tem sido descrito como regulado negativamente em células de câncer de mama e tumores (Grelier *et al.*, 2009; Martello *et al.*, 2010). Portanto, a quantidade de miRNAs que estas células cancerosas podem sintetizar é limitada. Porque a produção de exossomos é um processo contínuo, é hipotético que as células cancerosas empacotam pre-miRNAs específicos com proteínas RLC para permitir o enriquecimento do miRNA maduro em exossomos e ao mesmo tempo, mantenham estes miRNAs regulados positivamente nas células de origem. Oncossomos são altamente enriquecidos em miRNAs maduros que são associados ao RISC e podem desempenhar um papel biológico importante na formação do fenótipo das células alvo. Ao mesmo tempo, as células de origem mantêm sua superexpressão de miRNAs oncogênicos vantajosos, enquanto as células recipientes não têm sua via de biogênese super saturada com a entrada de pre-miRNAs através de exossomos.

[0061] Estudos presentes revelam o mecanismo dependente de RISC pelo qual exossomos de câncer se enriquecem em um subconjunto

de miRNAs. O uso de siRNA/shRNA contra Dicer em células cancerosas não era uma opção viável para analisar o conteúdo de miRNA em exossomos, já que qualquer diminuição no miRNA exossomal poderia ser um mero reflexo do baixo nível de miRNAs devido à supressão de Dicer. Portanto, um método de eletroporação foi desenvolvido para fornecer anticorpos neutralizantes diretamente para exossomos. Este método funcionou eficientemente para inibir a atividade de Dicer em exossomos e evitar o processamento de pre-miRNAs.

[0062] Enquanto determinados miRNAs são regulados positivamente em tumores específicos (Volinia *et al*, 2006), também há relatos de uma redução global de miRNA que ocorre em cânceres 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). Dicer é descrito como suprimido em células cancerosas, mas baixos níveis são suficientes para sustentar o crescimento do tumor (Kumar *et al*, 2009). Regulação negativa parcial de Dicer por meio do miR-103/107 aumenta a invasão de células cancerosas sem afetar a proliferação celular (Martello *et al*, 2010). Perda completa de Dicer é prejudicial para a sobrevivência da célula (Fukagawa *et al*, 2004). Baixos níveis de Dicer são associados a pouca sobrevivência de pacientes com câncer de ovário e pulmão (Karube *et al.*, 2005; Merritt *et al.*, 2008). Da mesma forma, perda de heterozigotos de Dicer se correlaciona com metástase em pacientes com câncer de mama (Martello *et al*, 2010). regulação negativo de Dicer em câncer de mama também ocorre de maneira pós transcricional porque os níveis do mRNA permanecem inalterados (Grelier *et al*, 2009; Wiesen e Tomasi, 2009). Em células cancerosas, uma fração de Dicer é direcionada a endossomos/MVBs de uma maneira dependente de CD43. Eventualmente, Dicer é secretado por meio de exossomos. regulação negativo de Hrs, BiG2 e TSG101, componentes da via biogênese exossomal, levou a mudanças drásticas na localização celular de proteínas Dicer. Uma possível explicação para níveis

de Dicer suprimidos em células cancerosas pode ser devido a exportação ativa por meio de exossomos. Se a via de secreção de exossomos for fechada, as células cancerosas sentem o aumento em proteína Dicer e regulam negativamente sua expressão de mRNA. Além disso, eles transportam a proteína no compartimento nuclear, onde este já não pode auxiliar na produção de miRNAs maduros. No que diz respeito a isto, regulação positiva de Dicer em células de câncer agressivo torna-os mais indolentes (Parque *et al*, 2011).

[0063] CD43 é uma proteína transmembranar que é predominantemente presente em leucócitos. Em algumas células cancerosas, observa-se um CD43 truncado no citoplasma e núcleo (Shelley et al 2012.) Mostrou-se anteriormente que CD43 poderia mirar certas proteínas de membrana para exossomos (Shen *et al*, 2011a). Supressão de CD43 em um modelo de camundongo ortotópico de câncer de mama reduz a carga de tumor em 76% (Shelley *et al.*, 2012). Estudos clínicos sugerem que a expressão CD43 se correlaciona a pouca sobrevivência de pacientes de câncer de mama (de Laurentiis *et al.*, 2011) Este relatório identifica que o CD43 está funcionalmente envolvido em direcionar o Dicer a oncossomos.

[0064] Estudos recentes mostram que os exossomos derivados de melanoma desempenham um papel na metástase e exossomos derivados de fibroblastos desempenham um papel na migração de células de câncer de mama (Luga *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2012). Exossomos derivados de células cancerosas têm um papel pro-tumorigênico associado à transferência de proteínas mRNA e pro-angiogênicas (Luga *et al.*, 2012;Peinado *et al.*, 2012; Skog *et al.*, 2008). Exossomos derivados de células cancerosas também podem contribuir para uma transferência horizontal de oncogenes, como EGFRvIII (Skog *et al*, 2008). Oncossomos mediam alterações significantes no transcriptoma em células-alvo por meio de miRNAs associadas ao RISC. Uma infinidade de processos biológicos

são afetados nas células alvo, induzindo a proliferação e convertendo células não tumorigênicas em células formadoras de tumor. No entanto, o potencial efeito in vivo de oncossomos sobre células recipientes provavelmente depende de vários outros parâmetros ambientais e barreiras de acessibilidade.

[0065] Oncossomos também ativam fibroblastos estromais para adquirir um fenótipo de miofibroblastos. Por exemplo, a capacidade de oncossomos para silenciar supressores de tumor PTEN e HOXD10 por meio de oncossomos derivados de miR-21 e miR-10b, respectivamente, foram ilustrados (Ma *et al*, 2007; Maehama, 2007). Esses resultados destacam a natureza complexa da comunicação adotada por células cancerosas para alcançar a malignidade. Estes dados ilustram que as células cancerosas podem usar exossomos para manipular as células normais ao redor para acelerar a progressão do câncer e recrutar estroma reativo.

[0066] Muitos estudos têm demonstrado que fibroblastos e células epiteliais normais, também apresentam regulação negativa de supressores de tumor e ativação dos oncogenes sem mutações óbvias. Coletivamente, este estudo desvenda o possível papel dos exossomos de câncer na indução de um "efeito de campo" oncogênico, que subjuga as células normais subjacentes a participar no desenvolvimento e progressão do câncer. Oncossomos podem converter células não tumorigênicas em células formadoras de tumor por meio de ativação das vias oncogênicas. Adicionalmente, os oncossomos também podem participar na geração de estroma reativo. Isto provavelmente é alcançado sem a necessidade de mutações genéticas definidas e explica a natureza complexa de como células de câncer mutantes estendem sua agenda para recrutar apoio de seus micro e macro ambientes.

II. Detecção de biomarcador

[0067] A expressão de biomarcadores ou de genes pode ser medida

por uma variedade de técnicas que são bem conhecidas na técnica Quantificação dos níveis do RNA mensageiro (mRNA) de um biomarcador pode ser usada para medir a expressão do biomarcador. Alternativamente, quantificação dos níveis do produto de proteína de um biomarcador da proteína pode ser usada para medir a expressão do biomarcador. Informações adicionais sobre os métodos discutidos abaixo podem ser encontradas em Ausubel *et al.* (2003) ou Sambrook *et al.* (1989). Aquele versados na técnica saberá quais parâmetros podem ser manipulados para otimizar a detecção do mRNA ou proteína de interesse.

[0068] Em algumas modalidades, tal obtenção de informações de expressão pode compreender a quantificação de RNA*, por exemplo*, microarranjo de cDNA, RT-PCR quantitativo, hibridação *in situ*, Nothern bot ou proteção de nuclease. Tal obtenção de informações de expressão pode compreender a quantificação de proteínas, *por exemplo*, quantificação de proteína compreendendo imuno-histoquímica, um ELISA, um radioimunoensaio (RIA), um ensaio imunorradiométrico, um fluoroimunoensaio, um ensaio quimioluminescente, um ensaio bioluminescente, uma eletroforese em gel, uma técnica Western blot, uma análise de espectrometria de massa ou um microarranjo da proteína.

[0069] Um microarranjo de ácido nucleico pode ser usado para quantificar a expressão diferencial de uma pluralidade de biomarcadores. Análise de microarranjo pode ser realizada usando um equipamento comercialmente disponível, seguindo os protocolos do fabricante, como por exemplo usando a tecnologia de Affymetrix GeneChip ® (Santa Clara, CA) ou o sistema de microarranjo da Incyte (Fremont, CA). Por exemplo, ácidos nucleicos de fita única (*por exemplo,* cDNAs ou oligonucleotídeos) podem ser plaqueados ou arranjados sobre um substrato de microchip. As sequências arranjadas em seguida são hibridizadas com sondas específicas de ácidos nucleicos das células de interesse. Sondas de cDNA marcadas de modo fluorescente podem ser geradas por meio da

incorporação de desoxinucleotídeos marcados de modo fluorescente por transcrição reversa do RNA extraído de células de interesse. Alternativamente, o RNA pode ser amplificado pela transcrição *in vitro* e marcado com um marcador, como a biotina. As sondas marcadas são então hibridizadas aos ácidos nucleicos imobilizados sobre o microchip sob condições altamente restritivas. Após a lavagem rigorosa para remover as sondas acopladas não especificas, o chip é examinado por microscopia confocal de laser ou por outro método de detecção, como uma câmera CCD. Geralmente, os dados brutos de intensidade de fluorescência nos arquivos de hibridização são pré-processados com RMA para gerar valores de expressão.

[0070] PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) também pode ser usado para medir a expressão diferencial de uma pluralidade de biomarcadores. No qRT-PCR, o modelo de RNA é geralmente transcrito de modo inverso em cDNA, que é então amplificado por meio de uma reação de PCR. A quantidade de produto de PCR é seguida ciclo-por-ciclo em tempo real, que permite a determinação das concentrações iniciais de mRNA. Para medir a quantidade de produto PCR, a reação pode ser realizada na presença de um corante fluorescente, como o SYBR Green, que se liga ao DNA de fita dupla. A reação também pode ser realizada com uma sonda repórter fluorescente que é específica para o DNA a ser amplificado.

[0071] Um exemplo não limitante de uma sonda repórter fluorescente é uma sonda TaqMan ® (Applied Biosystems, Foster City, CA). A sonda repórter fluorescente fica fluorescente quando o corante silenciador é removido durante o ciclo de extensão PCR. qRT-PCR multiplex pode ser executado pelo uso de várias sondas repórter de genes específicos, cada uma das quais contém um fluoróforo diferente. Valores de fluorescência são registrados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado àquele ponto na reação de amplificação. Para minimizar erros e

reduzir qualquer variação de amostra para amostra, qRT-PCR pode ser realizado usando um padrão de referência. O padrão de referência ideal é expresso em um nível constante entre tecidos diferentes e não é afetado pelo tratamento experimental. Normas de referência adequados incluem, mas não estão limitadas a, mRNAs para os genes constitutivos gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e β-actina. O nível de mRNA na amostra original ou a modulação na expressão de cada biomarcador podem ser determinados usando cálculos conhecidos na técnica.

[0072] Coloração imuno-histoquímica também pode ser usada para medir a expressão diferencial de uma pluralidade de biomarcadores. Esse método permite a localização de uma proteína nas células de uma amostra de tecido pela interação da proteína com um anticorpo específico. Por isso, o tecido pode ser fixado em formol ou outro fixador adequado, incorporado em cera ou plástico, e cortado em seções finas (a partir de cerca de 0,1 mm até vários mm de espessura) usando um micrótomo. Alternativamente, o tecido pode ser congelado e cortado em seções finas usando um criostato. As seções de tecido podem ser arranjadas sobre e fixadas em uma superfície sólida (*ou seja* um microarranjo do tecido). As seções de tecido são incubadas com um anticorpo primário contra o antígeno de interesse, seguido de lavagens para retirar os anticorpos desvinculados. O anticorpo primário pode ser acoplado a um sistema de detecção, ou o anticorpo primário pode ser detectado com um anticorpo secundário, que é acoplado a um sistema de detecção. O sistema de detecção pode ser um fluoróforo ou pode ser uma enzima, como a peroxidase de rábano ou fosfatase alcalina, que pode converter um substrato em um produto colorimétrico, fluorescente ou quimioluminescente. As seções de tecido corado geralmente são verificadas sob um microscópio. Porque uma amostra de tecido de um indivíduo com câncer pode ser heterogênea, *ou seja,* algumas células podem ser normais e outras podem ser cancerosas, a percentagem

de células coradas positivamente no tecido pode ser determinada. Essa medida, juntamente com uma quantificação da intensidade da coloração, pode ser usada para gerar um valor de expressão para o biomarcador.

[0073] Um ensaio de imunoabsorção enzimática, ou ELISA, pode ser usado para medir a expressão diferencial de uma pluralidade de biomarcadores. Há muitas variações de um ensaio ELISA. Todos são baseados na imobilização de um antígeno ou anticorpo sobre uma superfície sólida, geralmente uma placa de microtitulação. O método ELISA original compreende a preparação de uma amostra contendo as proteínas de biomarcador de interesse, revestimento dos poços de uma placa de microtitulação com a amostra, incubando cada poço com um anticorpo primário que reconhece um antígeno específico, lavagem para retirar os anticorpos desvinculados e em seguida, detecção dos complexos antígeno-anticorpo. Os complexos anticorpo-anticorpo podem ser detectados diretamente. Para isto, os anticorpos primários são conjugados a um sistema de detecção, tais como uma enzima que produz um produto detectável. Os complexos anticorpo-anticorpo podem ser detectados indiretamente. Para isso, o anticorpo primário é detectado por um anticorpo secundário, que é conjugado a um sistema de detecção, como descrito acima. A placa de microtitulação é então examinada e os dados brutos de intensidade podem ser convertidos em valores de expressão usando meios conhecidos na técnica.

[0074] Um microarranjo de anticorpos também pode ser usado para medir a expressão diferencial de uma pluralidade de biomarcadores. Para isso, uma pluralidade de anticorpos é arranjada e covalentemente ligada à superfície do microarranjo ou biochip. Um extrato de proteína contendo as proteínas de biomarcador de interesse geralmente é rotulado com um corante fluorescente ou biotina. As proteínas de biomarcador marcadas são incubadas com o microarranjo de anticorpo. Após lavagens para remover as proteínas desvinculadas, o microarranjo é examinado. Os dados brutos

de intensidade podem ser convertidos em valores de expressão usando meios conhecidos na técnica.

[0075] Microesferas Luminex de multiplexação também pode ser usadas para medir a expressão diferencial de uma pluralidade de biomarcadores. Estes grânulos de poliestireno microscópicos são internamente codificados por cores com corantes fluorescentes, de modo que cada grânulo tem uma assinatura espectral única (das quais existem até 100). Grânulos com a mesma assinatura são marcadas com um oligonucleotídeo específico ou anticorpo específico que vinculará o alvo de interesse (*ou seja,* biomarcador mRNA ou proteínas, respectivamente). O alvo, por sua vez, também está marcado com um repórter fluorescente. Portanto, há duas fontes de cor, um do grânulo e o outro da molécula repórter no alvo. Os grânulos são então incubados com a amostra contendo os alvos, dos quais até 100 podem ser detectados em um poço. O pequeno tamanho/área de superfície dos grânulos e a exposição tri dimensional dos grânulos para os alvos permite uma cinética de fase de solução durante a reação de ligação. Os alvos capturados são detectados por fluidos de alta tecnologia baseados em citometria de fluxo em que lasers excitam os corantes internos que identificam cada grânulo e também qualquer corante repórter capturado durante o ensaio. Os dados dos arquivos de aquisição podem ser convertidos em valores de expressão usando meios conhecidos na técnica.

[0076] *Hibridização in situ* também pode ser usada para medir a expressão diferencial de uma pluralidade de biomarcadores. Este método permite a localização de mRNAs de interesse nas células de uma amostra de tecido. Para este método, o tecido pode ser congelado, ou fixo e incorporado e então cortado em seções finas, que são dispostas e afixadas em uma superfície sólida. As seções de tecido são incubadas com uma sonda anti-sense marcada que irá hibridizar com um mRNA de interesse. A hibridação e etapas de lavagem geralmente são executadas sob condições

altamente rigorosas. A sonda pode ser marcada com um fluoróforo ou uma pequena tag (como biotina ou digoxigenina) que pode ser detectada por outra proteína ou anticorpo, de modo que o híbrido marcado pode ser detectado e visualizado sob um microscópio. Vários mRNAs podem ser detectados simultaneamente, uma vez que cada sonda anti-sense tem uma marca distinguível. A matriz de tecido hibridizada geralmente é examinada sob um microscópio. Porque uma amostra de tecido de um indivíduo com câncer pode ser heterogênea, *ou seja,* algumas células podem ser normais e outras podem ser cancerosas, a percentagem de células coradas positivamente no tecido pode ser determinada. Essa medida, juntamente com uma quantificação da intensidade da coloração, pode ser usada para gerar um valor de expressão para cada biomarcador.

[0077] Em uma outra modalidade, o nível do marcador pode ser comparado ao nível do marcador de um controle, no qual o controle pode incluir uma ou mais amostras de tumor retiradas de um ou mais pacientes determinados como tendo um determinado tumor metastático ou não tendo um determinado tumor metastático ou ambos.

[0078] O controle pode compreender dados obtidos ao mesmo tempo (*por exemplo*, no mesmo experimento de hibridação) do que os dados individuais do paciente, ou pode ser um valor armazenado ou um conjunto de valores *, por exemplo,*armazenado em um computador, ou em um meio legível por computador. Se este último for usado, novos dados do paciente para o(s) marcador(es) selecionado(s), obtidos de amostras iniciais ou de acompanhamento podem ser comparados aos dados armazenados para o(s) mesmo(s) marcador(es) sem a necessidade de experimentos de controle adicionais.

III. Definições

[0079] Como usado neste documento, "obtenção de uma amostra biológica" ou "obtenção de uma amostra de sangue" referem-se a receber uma amostra biológica ou de sangue*, por exemplo,* seja direta ou

indiretamente. Por exemplo, em algumas modalidades, a amostra biológica, como uma amostra de sangue ou uma amostra contendo células mononucleares de sangue periférico (PBMC), é obtida diretamente de um indivíduo em ou perto do laboratório ou o local onde a amostra biológica será analisada. Em outras modalidades, a amostra biológica pode ser retirada ou tomada por terceiros e transferida em seguida, *por exemplo,* para uma entidade separada ou local para análise. Em outras modalidades, a amostra pode ser obtida e testada no mesmo local usando um ponto de teste de cuidados. Nestas modalidades, tal obtenção refere-se a receber a amostra, *por exemplo,* do paciente, de um laboratório, um consultório médico, pelo correio, caixa postal ou agência dos correios, *etc*. Em alguns aspectos adicionais, o método pode compreender adicionalmente relatórios de uma determinação para o indivíduo, ao pagador do plano de saúde, um médico, farmacêutico, gerente de benefícios farmacêuticos ou qualquer pessoa a quem a determinação pode ser de interesse.

[0080] Por "indivíduo" ou "paciente" entende-se que seja qualquer indivíduo único para o qual a terapia ou teste de diagnóstico é desejado. Neste caso, os indivíduos ou pacientes geralmente se referem a seres humanos. Também se destina a ser incluído como um indivíduo são quaisquer indivíduos envolvidos em experimentos de pesquisa clínica que não mostrem qualquer sinal clínico de doença, ou indivíduos envolvidos em estudos epidemiológicos ou indivíduos utilizados como controles.

[0081] Como usado neste documento, "aumento da expressão" refere-se a um nível elevado ou aumento de nível de expressão em uma amostra de câncer em relação a um controle apropriado (*por exemplo,* um tecido não canceroso ou amostra de célula, uma padrão de referência), no qual a elevação ou o aumento do nível de expressão genética é estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Se um aumento na expressão de um gene em uma amostra de câncer em relação a um controle é estatisticamente significante, este pode ser determinado usando um teste t

apropriado (*por exemplo,* teste t de uma amostra, teste t de duas amostras, teste t de Welch) ou outro teste estatístico conhecido por aqueles versados na técnica. Genes que são superexpressos em um câncer podem ser, por exemplo, genes que são conhecidos, ou foram previamente determinados, para serem superexpressos em um câncer.

[0082] Como usado neste documento, "diminuição da expressão" refere-se a um nível reduzido ou diminuído de nível de expressão em uma amostra de câncer em relação a um controle apropriado (*por exemplo,* um tecido não canceroso ou amostra de célula, uma padrão de referência), no qual a redução ou a diminuição do nível de expressão genética é estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Em algumas modalidades, o nível reduzido ou diminuído da expressão genética pode ser uma completa ausência de expressão genética ou um nível de expressão de zero. Se uma diminuição na expressão de um gene em uma amostra de câncer em relação a um controle é estatisticamente significante, este pode ser determinado usando um teste t apropriado (*por exemplo,* teste t de uma amostra, teste t de duas amostras, teste t de Welch) ou outro teste estatístico conhecido por aqueles versados na técnica. Genes que são subexpressos em um câncer podem ser, por exemplo, genes que são conhecidos, ou foram previamente determinados, para serem subexpressos em um câncer.

[0083] O termo "fragmento ligante de antígeno" é usado neste documento no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (*por exemplo,* anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos e fragmentos de anticorpo.

[0084] O termo "iniciador" (primer), como usado neste documento, deve englobar qualquer ácido nucleico que é capaz de iniciar a síntese de ácidos nucleicos nascente em um processo dependente do modelo. Os iniciadores podem ser oligonucleotídeos de dez a vinte ou trinta pares de

bases em comprimento, mas sequências maiores podem ser empregadas. os inciadores demão podem ser fornecidos nas formas de fita dupla e/ou fita única, embora a forma de fita única seja preferencial.

IV. Exemplos

[0085] Os exemplos a seguir são incluídos para demonstrar modalidades preferenciais da invenção. Deve ser apreciado por aqueles versados na técnica que as técnicas divulgadas nos exemplos que se seguem representam técnicas que os inventores descobriram funcionar bem na prática da invenção e, assim, podem ser consideradas para constituir os exemplos dos modos preferenciais para sua prática. No entanto, aqueles versados na técnica devem, à luz da presente divulgação, apreciar que muitas mudanças podem ser feitas nas modalidades específicas as quais são divulgadas e ainda obter um resultado parecido ou semelhante, sem se desviar do espírito e do escopo da invenção.

Exemplo 1 – Procedimentos Experimentais

[0086] *Isolamento e purificação do exossomo* Exossomos foram purificados por centrifugação diferencial como descrito anteriormente (Thery *et al.*, 2006; Luga *et al.*, 2012). Em suma, sobrenadante de células cultivadas por 24 hr foram submetidos às etapas de centrifugação sequencial de 800g e 2000g e o sobrenadante foi filtrado usando filtro de 0,2 μm em frascos de cultura. Exossomos foram peletizados em 100,000g em um rotor de êmbolo oscilante SW40Ti por 2hr (Beckman). Sobrenadante foi descartado e PBS foi adicionado para uma etapa de 1hr de lavagem. O pélete foi analisado para exossomo. Exossomos para extração de RNA foram ressuspensos em 500ul de Trizol; exossomos para extração de proteína foram ressuspensos em 250ul de tampão de lise (8M Ureia/2,5%SDS, 5 μg/ml de leupeptina, 1 μg/ml de pepstatina e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil); e exossomos para os tratamentos foram ressuspensos em PBS. Amostras de soro congeladas foram descongeladas no gelo e 500 μl foram adicionados a 12 mL de PBS e se seguiu o mesmo

procedimento referido anteriormente. Exossomos purificados por centrifugação foram tratados (37°C por 60 minutos) com 500 g/mL de proteinase K (Sigma-Aldrich) dissolvida em água livre de RNase, seguida por inativação do calor da protease (60°C por 10 minutos) e incubação (37°C por 15 minutos) com 2g/mL de RNaseA livre de protease (Sigma-Aldrich), seguido pela adição de 10X do inibidor de RNase concentrado (Ambion). Para o tratamento de exossomos, os exossomos foram purificados em duplicado e uma das pelotas foi usada para a quantificação de proteínas.

[0087] *Análise de citometria de fluxo de exossomos*. Preparações de exossomos (5-10 µg) foram incubadas com 5µl de grânulos de látex de aldeído/sulfato com 4-µm de diâmetro (Interfacial Dynamics, Portland, OR) e ressuspensos em 400 µl de PBS contendo 2% de BSA. Grânulos revestidos de exossomos (20 µl) foram incubados com os seguintes anticorpos: anti-CD63 (Santa Cruz), anti-CD9 (abcam), anti-TSG101 (abcam), anti-flotillina-1 (Santa Cruz) durante 30 minutos a 4°C, seguido, quando necessário, por incubação com anticorpo secundário conjugado FITC e analisados em um citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences).

[0088] *Eletroporação de Exossomos* Exossomos em uma concentração total de proteína de 100 µg (medida pelo ensaio de Bradford) e 5 µg de anticorpo Dicer (SC-30226 policlonais, Santa Cruz, CA), 5 ug de anticorpo de Actina ou 10 µg de pre-miRNA-21,-10b e -cel1 foram misturados em 400 µl de tampão de eletroporação (1,15 mM de fosfato de potássio com pH 7,2, cloreto de potássio de 25 milímetros, 21% Optiprep) e eletroporados em uma cubeta de 4mm usando um sistema de eletroporação Gene Pulser Xcell (Biorad) conforme descrito anteriormente (Alvarez-Erviti *et al*2011). Depois da eletroporação, os exossomos foram tratados com proteinase K e/ou RNAse quando apropriado.

[0089] *Espectroscopia de Dispersão de Luz (LSS)*. Espectros LSS

foram coletados usando o sistema experimental descrito na FIG. 10B. O laser super contínuo de banda larga Fianium SC-450-2 foi usado como uma fonte de luz branca. A luz do laser super contínuo foi focada na amostra com uma lente de comprimento de foco longo. As amostras consistindo de suspensões líquidas de exossomos ou microesferas foram colocadas em um suporte de amostra de quartzo em forma cúbica personalizado. Os sinais de fundo foram coletados de amostras de solvente sem exossomos ou microesferas. A luz espalhada por exossomos ou microesferas a 90° ao feixe incidente foi coletada com a outra lente de comprimento de foco longo e entregue ao espectrógrafo de imagem Princiton InstrumentActon 2300i juntamente com um detector de alta eficiência Andor TechnologyiXon DV885 EMCCD. A detecção realizou-se na faixa de comprimento de onda de 470–870-nm. O detector foi controlado por um computador, ao qual os dados foram transferidos, armazenados e processados.

[0090] Para calibrar o sistema e estabelecer sua capacidade de detectar com precisão os tamanhos das partículas, que podem ser menores que o comprimento de onda, os sinais de suspensões de tampão fosfato salino (PBS) de microesferas de vidro com diâmetros nominais de 24 nm e 100 nm e microesferas de poliestireno com diâmetros nominais de 119 nm, 175 nm, 356 nm e 457 nm foram medidos. Os espectros previstos pela teoria de Mie foram ajustados aos dados usando o método dos mínimos quadrados desenvolvido anteriormente (Fang *et al*, 2003). Os espectros experimentais e ajustes resultantes são mostrados na FIG. 1E para microesferas de vidro com diâmetro nominal de 100 nm e microesferas de poliestireno com diâmetro nominal de 356 nm. Aqui o desvio em relação a dispersão de Rayleigh multiplicado pelo poder diante do comprimento de onda é mostrado para enfatizar o comportamento não-Rayleigh dos espectros de LSS. Comparando as distribuições de tamanho de rendimento de LSS para microesferas com as especificações fornecidas pelo fabricante, concluiu-se que a precisão do método LSS é estimada em 10

nm. Também foi estabelecido que as distribuições de tamanho reconstituídas são insensíveis aos índices de refração das microesferas e do solvente. Deve ser salientado aqui que uma vez que a dispersão de luz de pequenas partículas é proporcional à potência seis de seu tamanho, detecção de partículas menores que 50 nm na presença de partículas maiores exigiria um aumento substancial na relação sinal-ruído do sistema experimental.

[0091] Experimentos de LSS com suspensão de PBS de exossomos foram então realizados. O espectro de LSS experimental dos exossomos e o ajuste Mie correspondente são apresentados na FIG. 1B. O ajuste do espectro reconstruído é excelente. Usando a técnica de reconstrução mencionada acima (Fang *et al.* 2003; Itzkan *et al.* 2007; Fang *et al.* 2007) foi encontrada a distribuição de tamanho dos exossomos (ver FIG. 1R gráfico à esquerda e inserção), que atingiu um pico em 104 nm. Esta distribuição de tamanho extraída foi comparada às medidas morfométricas realizadas nas fotografias TEM das amostras de exossomos semelhantes (FIG. 1A). Uma vez que o número de partículas nas fotos TEM não era grande o suficiente para traçar uma distribuição estatisticamente significativa, o tamanho médio das partículas maiores do que 50 nm foi calculado a partir da fotografia TEM, descoberto como sendo igual a 95nm. Assim, a distribuição de tamanho reconstruída de LSS e medidas morfométricas realizadas nas fotografias TEM de exossomos estão de acordo com todos os dados.

[0092] *Tratamentos N-Rh-PE*. As células foram marcadas com N-Rh-PE incubando com 8 μM N-Rh-PE (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) diluído em 1X de tampão Hanks gelado (Invitrogen, Carlsbad, CA) por uma hora no gelo. As células foram então lavadas 3 vezes com tampão Hanks gelado antes de serem plaqueadas de volta no meio DMEM. As células N-Rh-PE foram usadas para imagem confocal aproximadamente 24 horas após a marcação.

[0093] *Marcação do Immunogold e Microscopia Eletrônica.* Espécimes fixos em uma concentração ideal foram pingados em uma grade revestida de carbono/formvar e permitidos para absorver o formvar por um período mínimo de 1 minuto. Para coloração por immunogold, as grades foram colocadas em um tampão de bloqueio para uma etapa de bloqueio/permeabilização por 1 hora. Sem enxágue, as grades foram imediatamente colocadas no anticorpo primário na diluição adequada durante a noite a 4°C (anti-Dicer policlonal 1:10 30226-SC, Santa Cruz; anti-CD9 1:10 monoclonal, Abcam). Como controles, algumas grades não foram expostas ao anticorpo primário. No dia seguinte, todas as grades foram enxaguadas com PBS e então flutuadas em gotas do anticorpo secundário apropriado anexado a partículas de ouro de 10nm (AURION, Hatfield, PA) por 2 horas em temperatura ambiente. Grades foram enxaguadas com PBS e foram colocadas em 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M durante 15 minutos. Após o enxague em PBS e água destilada, as grades foram deixadas para secar e coradas para contraste com acetato de uranil. As amostras foram vistas com um microscópio de transmissão de elétrons Tecnai Bio Twin (FEI, Hillsboro, OR) e imagens feitas com uma câmera AMT CCD Camera (AdvancedMicroscopy Techniques, Danvers, MA).

[0094] *Blot de Proteína e Anticorpos*. Para monitorar respostas genéticas endógenas, as células foram coletadas no tampão RIPA e exossomos em 8M de ureia/2.5%SDS, 5 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de pepstatina e 1mM de tampão de fluoreto de fenilmetilsulfonil. As proteínas foram carregadas de acordo com a quantificação de Bradford em géis de acrilamida e transferidas para membranas PVDF (ImmobilonP) por transferência eletroforética molhada. Para exemplos de amostras de proteínas dos exossomos de soro coletados a partir dos modelos de xenoenxertos ortotópicos, um gel com 4% de acrilamida com 15 cm de altura foi usado para resolver bandas de Dicer humanas e de

camundongos. Em geral, os blots foram bloqueados por 1hr a RT com 5% leite desnatado seco em PBS/0,05% Tween e incubados durante a noite a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: 1:500 anti-Dicer (SC-30226) Santa Cruz; 1:1000 proteínas anti-Ubiquitiniladas, clone FK2 Millipore; 1:500 anti-sinalizador M2-Peroxidase Clone M2 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 anti-β-actina Peroxidase Clone AC-15, Sigma; 1:500 anti-GFP ab6556, Abcam; 1:500 anti-HOXD10 ab76897 Abcam. Anticorpos secundários foram incubados por 1hr no RT Lavagem após incubação de anticorpos foram feitas em um agitador orbital, quatro vezes em intervalos de 10 min, com 1X PBS 0,05% Tween20. Blots foram desenvolvidos com reagentes quimioluminescentes de Pierce.

[0095] *Análise PCR em Tempo Real* RNA tratado por DNase foi retrotranscrito com MultiScribe ReverseTranscriptase (Applied Biosystems) e iniciadores oligo-d(T) após purificação total de RNA com Trizol (Invitrogen). PCR em tempo real para os mRNAs foi realizado em um Instrumento de Detecção de Sequência ABI PRISM 7300HT usando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e β-actina como o controle. Os iniciadores são listados na Tabela 1.

[0096] Pré-miRNAs foram quantificados usando 150ng de RNA tratado por DNase e pelo kit SuperScript III Platinum One-Step RT-qPCR (Invitrogen) (Schmittgen *et al*, 2004). Os iniciadores são listados na Tabela 1.

[0097] Para análise da expressão do miRNA, 10ng de RNA foi misturado com o kit de transcrição reversa TaqManMicroRNA reagente que contem iniciadores específicos do miRNA e reverso transcrito de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems). Misturas de reação foram incubadas a 16°C durante 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C

por 5 minutos. PCR em tempo real foi realizado usando ABI PRISM 7300HT Sequence Detection System Instrument (Applied Biosystems) usando usando o Ensaio Sob Demanda comercialmente disponível (Applied Biosystems) para cada miRNA estudado. Expressão de miRNAs foi normalizada para a expressão de 18S rRNA (Reagente de Ensaio Pré-Desenvolvido TaqMan; Applied Biosystems) que serviu como controle interno para quantidade e integridade de RNA. Cada medida foi realizada em triplicata. Limite de ciclo (Ct), o número de ciclo fracional no qual a quantidade de alvo amplificado atingiu um limite fixo, foi determinado e a expressão foi medida usando a fórmula $2^{-\Delta Ct}$, como anteriormente relatado (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 1 Sequências Iniciadoras de qPCR

Nome dos Iniciadores	**Sequências de Iniciadores**	**SEQ ID NO:**
BiG2 F	5’ CAGGAGGTGGTGAAGGACAT3’	1
BiG2 R	5’ CCCGTTGGTCTGTGAGTTT3’	2
TSG101 F	5' GATACCCTCCCAATCCCAGT3'	3
TSG101 R	5’ GTCACTGACCGCAGAGATGA3’	4
Hrs F	5’AGTGGCTGTCGGGTATTCATC3’	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’CTCCTTAATGTCACGCACGAT3’	10
mmu-Actina F	5’GGCTGTATTCCCCTCCATCG3’	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’GCCATGGCTGCTGTCAG3’	20
Pre-miR-125a F	5’GTCCCTGAGACCCTTTAACC3’	21
Pre-miR-125a R	5’AACCTCACCTGTGACCCTG3’	22
Pre-miR-125b F	5’GTCCCTGAGACCCTAACTTG3’	23

Nome dos Iniciadores	Sequências de Iniciadores	SEQ ID NO:
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’GGCGGAACTTAGCCACTGT3’	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

[0098] *Nothern Blot*. Nothern Blot foi realizado utilizando oligonucleotídeos 3'Bio [TEG] DNA do complemento reverso para o miRNA maduro como sondas (ver Tabela 2). Géis de 15% de acrilamida/ureia foram usados para carregar 40 µg de RNA exossomal (tratado por DNase) juntamente com 1 X de corante de carregamento RNA após 2 minutos a 95°C seguido de um período de 2 minutos no gelo. Marcador de MicroRNA foi usado de acordo com as instruções do fabricante (N2102, New England BioLabs). Eletroforese foi realizada a 4°C durante 3 hr usando TBE 1x. Transferência foi feita usando papéis de blotting Whatman e a membrana de nylon positivamente carregada BrightStar-Plus (Ambion) durante 2 horas a 4°C com TBE 0,5 X. O RNA foi reticulado para a membrana usando um transiluminador UV durante 20 minutos. Membranas foram pre-hibridizadas girando por 1 hora a 42°C em solução de hibridação Ambion's ULTRAhyb®-Oligo (Ambion). As sondas foram descongeladas em gelo e 150 ng foram

adicionados por mL de tampão de hibridização após incubação de 5 minutos a 95°C, após o qual as membranas foram deixadas em rotação durante a noite a 42°C. As lavagens seguintes foram feitas: 2 x SSPE/0,5%SDS – duas vezes por 15 minutos; 0,2SSPE/0,5%SDS – duas vezes por 30 minutos e 2 X SSPE - 5 minutos. Estas etapas de lavagem inicial foram seguidas por mais lavagens e em seguida os blots foram desenvolvidos usando o kit BrightStar BioDetect de acordo com as instruções do fabricante (Ambion). Os blots foram expostos durante a noite com duas películas empilhadas. Os blots foram retirados e reanalisados por mais duas vezes com êxito.

Tabela 2. Sequências de Sonda Norte

Nome da Sonda	**Sequência de Sonda**	**Número de Identidade de Sequência:**
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' TGTCAGACAGCCCATCGACTGGTGTTGCCATGAGAT3'	47
tRNAMet	5'CAGCACGCTTCCGCTGCGCCACTCT3'	48

[0099] *Cultura de células, Plasmídeos, Pre-miRNAs e siRNAs.* Linhas de célula humanas MCF10A, MCF7, MDA-MB231, A549, SW480 e HeLa, assim as como linhas de células mamárias de camundongo NMuMG, 67NR e 4T1 foram cultivadas em DMEM 10% FBS (todas as células originadas de American Type Culture Collection – ATCC). Transfecções foram realizadas

usando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen) para siRNA. Para transfecções sintéticas pre-miRNA o RNAiFect (Qiagen) foi usado em todas as linhas de célula. As sequências de siRNAs são listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Sequências siRNA

Nome siRNA	**Sequência siRNA**	**Número de Identidade de Sequência:**
Hrs	5'GGAACGAGCCCAAGUACAATT3'	49
Hrs	5' UGUACUUGGGCUCGUUCCGG3'	50
TSG101	5'GUUUAUCAUUCAAGUGUAATT3'	51
TSG101	5'UUACACUUGAAUGAUAAACTG3'	52
CD43	5'GGAGAGCCUUUGGUCUCUATT3'	53
CD43	5'UAGAGACCAAAGGCUCUCCGG3'	54
AGO2	5'GGCGUUACACGAUGCACUUTT3'	55
AGO2	5'AAGUGCAUCGUGUAACGCCTG3'	56

[00100] *Plasmídeos*. p-CMV-Tag4B-Dicer (Melo *et al.*, 2009); p-CMV6-CD63-GFP de Origene (RG217238); GFP-hAGO2 de Addgene (plasmídeo 11590); pGFP-shBiG2 de Origene (TG314697); pGFP-shDicer de Origene (TG304991); pre-miR-10b sintético, -21 e –cel-1 foram comprados de Ambion; 3'UTR-WTPTEN, 3'UTR-Mutant-PTEN (Dr. Joshua Mendell laboratory), 3'UTR-WTHOXD10 e 3'UTR-Mutant-HOXD10 (Dr. Robert Weinberg laboratory) são de Addgene.

[00101] *Imunocitoquímica e Microscopia Confocal.* As células foram plaqueadas na confluência apropriada em 12 placas de poço em lamelas inseridas e cultivadas durante a noite. As células do dia seguinte foram lavadas com PBS frio 1X e fixadas por 20 min em RT com 4% PFA/PBS. Slides foram permeabilizados durante 10 minutos em RT com PBS 0,5% Triton X-100, bloqueado 1 hr a RT com BSA 5% e incubado durante a noite a 4°C, com os anticorpos primários em PBST (PBS, 0,1% Triton) 2% BSA: 1:100 anti-Dicer (SC-30226) Santa Cruz; 1:500 anti-sinalizador 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). Anticorpos secundários Alexa 543 cabra anti-coelho ou Alexa-488 cabra anti-camundongo foram incubados 1hr no RT diluído 1:200 em PBST 2% BSA. DAPI foi usado para corar os núcleos. Para análise de exossomos, exossomos coletados foram incubados com Triton X-0.05% por 15 min e, posteriormente, com 5% de BSA para 1 hr a RT. O primeiro anticorpo primário (anti-CD9, 1:50) foi incubado durante a noite em 100ul PBST a 4°C e o segundo anticorpo primário, anti-sinalizador (1:50), foi adicionado no dia seguinte e incubado durante 1 hr a RT. Anticorpos secundários foram adicionados consecutivamente e incubados também por 1 hr a RT. Exossomos foram plaqueados em cima de lamelas em placas de 12 poços em 4% PFA por 45 min e lavadas com PBS frio. Imagens foram obtidas com um Sistema Confocal Vertical Zeiss LSM510 usando a ferramenta de reciclagem para manter configurações idênticas. Exossomos agregados levam a estruturas maiores que 200 nm visíveis em microscopia confocal. Para análise de dados, imagens foram selecionadas de um pool de pelo menos dois experimentos independentes. Figuras mostram campos representativos.

[00102] *Ensaios de corte em cubos In Vitro* Extratos de proteína exossomais (10 µg) foram incubados a 37°C, com 3 pmol de hairpins internamente marcados com biotina pre-miR-10b, -21 e - cel-1 na presença de 3 mM $MgCl_2$, 30 mM de NaCl e 100 mM Hepes, pH 7,5. O volume final de cada reação foi 10 µl. As reações foram paradas pela adição de 10 µl de tampão de carregamento de gel de formamida. RNA foi resolvido usando a eletroforese em gel de poliacrilamida de desnaturação e desenvolvido com o kit BrightStar BioDetect de acordo com as instruções do fabricante (Ambion).

[00103] *Viabilidade Celular e Ensaios de Formação de Colônia.* As células foram banhadas em placas de 96 poços e exossomos coletados foram adicionados no dia 1, em uma concentração de 100 µg/mL.

Viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Para experimentos de formação de colônia, as células foram banhadas em placas de 12 poços e exossomos foram adicionados no dia 1 e 5 da cultura em uma concentração de 100 µg/mL. Após 8 dias as colônias foram fixadas e coradas com reagente MTT.

[00104] *Arranjo de Expressão de mRNA Illumina Human-HT12.* RNA foi hibridizado em uma matriz de arranjo de expressão de mRNA Illumina Human-HT12. Dados foram normalizados usando a rotina neqc oferecida pelo pacote R "limma"(Shi *et al*, 2010). Abundâncias genéticas foram determinadas pela mediana das sondas por gene. Agrupamento é feito pela média aritmética das distâncias euclidianas de genes (linhas) e amostras (colunas).

[00105] *Arranjo de Expressão miRNA*. Um arranjo de miRNA personalizado foi usado como descrito em 9. O arranjo contém 1833 sondas de microRNA humano, 1084 sondas de microRNA de camundongo e outras 78 sondas de RNA não codificadas. As sondas são impressas em duplicata. O ID de acesso GenBank associado a cada sonda está incluído. Análise bioinformática foi realizada usando R (versão 2.14.2) (na internet em r-project.org) e Bioconductor (na internet em bioconductor.org/). A intensidade bruta para cada sonda é a intensidade do pixel de característica mediana com a mediana de fundo subtraída. Definir um deslocamento 1 garante que não haverá nenhum valor negativo após transformação de dados em log. Dados foram normalizados seguidos por log2 transform. Sinais de sondas medindo o mesmo miRNA sofreram uma média. A análise foi realizada usando as funções da biblioteca LIMMA. Os mapas de calor foram gerados usando a função heatplot da biblioteca made4. Quando repetições técnicas foram realizadas, o mapa de calor representou os valores de expressão média obtidos de medições repetidas.

[00106] *Xenoenxertos Ortotópicos de Ovário, Endométrio e Tumores*

de Mama. Camundongos atímicos nu/nu (Harlan) entre 4 a 6 semanas de idade foram alojados em gaiolas ventiladas individualmente em um ciclo de claro-escuro de 12 horas de 21 a 23ºC e de 40% a 60% de umidade. Os camundongos tiveram acesso livre a uma dieta irradiada e água esterilizada. Todos os protocolos de animais foram revistos e aprovados de acordo com o cuidado Spanish Institutional Animal Care and Use Committees.

[00107] As espécimes de tumor primário foram obtidas no Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Espanha). O Institutional Review Board aprovou o estudo. O termo de consentimento foi coletado dos pacientes. Pedaços de tecido não necrótico (ca. 2-3mm^3) de cinco representantes ressecados de tumor de ovário epitelial humano (EOCs): serosa, endometrial, tumor de células claras e mucinoso, foram selecionados e colocados em DMEM (BioWhittaker) suplementados com 10% FBS e penicilina/estreptomicina em temperatura ambiente. Sob anestesia induzida pelo isofluorano, os animais foram submetidos a uma laparotomia lateral, seus ovários expostos e pedaços de tumor ancorados à superfície do ovário com 7,0 suturas de prolene. Além disso, pedaços de mama humana e tumores endometriais foram implantados nas glândulas de gordura mamárias e na parede endometrial, respectivamente.

[00108] Tumores ortotopicamente enxertados foram autorizados a crescer e, no momento do sacrifício 2 ml de sangue foram obtidos de camundongos anestesiados por punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 14,000 rpm e congeladas a -80ºC.

[00109] *Imunoprecipitação* Células e exossomos foram coletados, lavados em PBS e centrifugados ou ultracentrifugados, respectivamente para recolher péletes. Tampão RIPA gelado ou tampão de 8M de ureia/SDS foram adicionados a células e exossomos, respectivamente. Suspensões foram gentilmente balançadas a 4°C, 15 min para células e 2 hr para exossomos. Os lisados foram centrifugados a 14,000 g em uma centrífuga

pre-refrigerada por 15 minutos e o pélete foi descartado. Grânulos de proteína A ou G agarose/sefarose foram lavados duas vezes com PBS e restaurados com 50% de pasta com PBS. Uma mistura de grânulo/pasta (100 µl) foi adicionada a 1 mL de lisado celular e 500 µl de lisado exossomal e incubada a 4°C por 10 min. Os grânulos foram removidos por centrifugação a 14.000 x g a 4°C durante 10 minutos e os péletes descartados. Anticorpo Dicer (5 µg para células e 10 µg para exossomos) foi adicionado a 500 µl de lisado celular ou 250 µl de lisado exossomal (1 µg/µl células, 10 µg/µl exossomos) e incubado durante a noite a 4°C em um agitador orbital. 100 µl de grânulos/pasta de proteína A ou G agarose/sefarose foram adicionados e deixados durante a noite a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os grânulos lavados 3 vezes com tampão RIPA gelado para células ou tampão Ureia/SDS para exossomos. Os grânulos de agarose/sefarose foram fervidos por 5 minutos para dissociar os imunocomplexos dos grânulos. Os grânulos foram coletados por centrifugação e blot de proteína foi realizado com o sobrenadante.

[00110] *Condições de cultura na presença de Ionóforo A23187* Ca^{2+} Células (células 8 × 10^7) foram semeadas a 5 × 10^5 células/ml em DMEM. Para tratar as células, A23187 (200 nM concentração final, Calbiochem, La Jolla, CA) foi adicionado às culturas quatro horas mais tarde. Meios de células tratadas e não tratadas foi coletado e exossomos recolhidos.

[00111] *Injeção ortotópica das células em camundongos nude*. O crescimento do tumor ortotópico foi medido pela injeção de células epiteliais de mama não tumorigênicas, células epiteliais de mama não tumorigênicas MCF10A expostas aos exossomos derivados de MDA-MB231 e células de câncer de mama MDA-MB-231 (células 1 × 10^5 em 0,2 ml de PBS) nas glândulas mamárias de camundongos atímico feminino de 3 semanas de idade, conforme descrito anteriormente (Welch, 1997). O crescimento do tumor foi monitorado semanalmente, medindo-se o comprimento do tumor e

largura com um paquímetro e foi relatado como o diâmetro médio do tumor como descrito anteriormente (Welch, 1997). Todos os animais foram sacrificados 21 dias após a injeção de célula de tumor.

[00112] *Estatísticas*. Barras de erro indicam desvio padrão entre repetições biológicas. Triplicatas técnicas, assim como as biológicas de cada experimento foram realizadas. Significância estatística foi calculada pelo teste t de Student.

Exemplo 2 – Resultados

[00113] *Isolação e Identificação de Exossomos*. Exossomos das células cancerosas (carcinoma de mama humano metastático negativo triplo MDA-MB231, adenocarcinoma de mama humano MCF7, carcinoma de mama não-metastático de rato 67NR e carcinoma de mama metastático de rato 4T1) e as células de controle (mama epitelial humano não-tumorigênico MCF10A e mama epitelial de rato não-tumorigênico NMuMG) foram isolados usando métodos de ultracentrifugação estabelecidos (FIG. 10A) (Luga *et al.*, 2012; Thery *et al.*, 2006). Os exossomos colhidos foram analisados por microscopia de elétron de transmissão (TEM) e por microscopia de força atômica (AFM). As partículas entre 40-140 nm em tamanho foram identificadas (FIGs. 1A-B) (Thery *et al.*, 2002). Adicionalmente, a identidade dos exossomos foi confirmada detectando TSG101 e CD9, dois marcadores dos exossomos (FIG. 1C) (Ostrowski *et al.*, 2010). Os estabelecidos isolados eram também positivos para o marcador CD9 quando analisados por microscopia de elétron de imunogold-coloração (FIG. 1A). Exossomos acoplados aos grânulos de latex foram analisado também por citometria de fluxo, mostrando a expressão de superfície dos tetraspaninas CD9, CD63, TSG101 e flotillin1, que são marcadores dos exossomos tipicamente usados (FIG. 1D). Adicionalmente, a espectroscopia da difusão de luz (LSS) (Fang *et al.*, 2007; Itzkan *et al.*, 2007; Bang and Setabutr, 2010; Benitez-vieyra *et al.*, 2009; Khairkar *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2010) foi usada para mostrar que as

amostras isoladas revelam uma distribuição de tamanho apertado com pico em 104 nm no diâmetro (FIG. 1E, painel direito). O sistema de LSS permitiu a deteção exata de todos os tamanhos das partículas em extratos dos exossomos usando as microesferas de vidro de diâmetros diferentes como controles internos. LSS também excluiu microvesículas potenciais e contaminação por restos bacterianos ou celulares nestes isolados (FIG. 1E, vide a inserção no gráfico direito). Além disso, e de acordo com dados de LSS, a análise de monitoramento de nanopartícula de NanoSight revelou partículas com uma distribuição de tamanho com pico em 105 no ± 1,0 nm no diâmetro (FIG. 1F) ainda excluindo a existência de contaminadores potenciais das escalas diferentes de tamanho que existem na solução quando não é filtrada (FIG. 1F, gráfico direito). O ensaio de viabilidade de célula colorimétrico (MTT), ensaio de inserção de uma uracila marcada no desoxinucleotídeo terminal pela enzima transferase (TUNEL), análise de citometria do fluxo para Anexin V e iodeto de propídio, e imunoblots de citocromo C dos exossomos (FIGs. 10C-E) foram usados para demonstrar a viabilidade das células antes da extração dos exossomos a fim de excluir a possibilidade de contaminação dos isolados com corpos apoptóticos ou restos aleatórios da célula. Exossomos isolados das células cancerosas são denominados coletivamente de oncossomos, conforme definido previamente (Lee *et al.*, 2011). Exossomos isolados das células de controle são denominados coletivamente de normossomos.

[00114] *Oncossomos são enriquecidos especificamente em miRNAs oncogênicos quando comparados a normossomos*. O índice global de miRNA dos oncossomos e os normossomos foram investigados. A análise de microfluídica do RNA isolado dos exossomos revelou um aumento no índice pequeno do RNA dos oncossomos quando comparado aos normossomos (FIG. 2F). Além disso, uma correlação baixa entre os níveis dos miRNAs nos normossomos (derivado de MCF10A) e os oncossomos (derivado de MDA-MB-231) foi observada, com um valor de R^2 de 0,35

(FIG. 2A). A análise global da disposição do miRNA mostrou um enriquecimento do índice dos miRNAs nos oncossomos quando comparado com os normossomos. Esta análise revelou também um perfil muito distinto da expressão do miRNA nos oncossomos quando comparado aos normossomos. Os dados da disposição do miRNA mostraram 305 miRNAs diferencialmente expressados entre oncossomos e normossomos (Tabela 5), com um enriquecimento total do índice do miRNA nos oncossomos quando comparados com os normossomos. O enriquecimento dos miRNAs nos oncossomos não era uma mera reflexão de um aumento nos miRNAs nas células cancerosas porque as células cancerosas mostraram uma diminuição na quantidade total de RNAs pequenos totais quando comparadas às células não-tumorigênicas (FIG. 11A). Conseqüentemente, a acumulação dos miRNAs nos exossomos pareceu ser específica e direcionada.

[00115] A expressão de 15 miRNAs nas células cancerosas e nos exossomos derivados destas células que foram encontradas para ser expressadas diferencialmente na disposição do miRNA entre oncossomos e os normossomos foram avaliados adicionalmente (Tabelas 4 e 5). Seis miRNAs desta coleção foram implicados na progressão do câncer (miRNAs oncogênicos: miR-10a, miR-10b, miR-21, miR-27a, miR-155 e miR-373) e nove miRNAs foram relatados para possuir funções suppressivas de tumor (miRNAs do supressor do tumor: let7a, miR15b, miR26a, miR31, miR125a, miR125b, miR200a, miR200c, miR335) e são expressados nas células e nos exossomos derivados daquelas células (FIGs. 11B-C e Tabela 4). Para determinar a meia vida dos miRNAs nos exossomos, um sistema livre de células foi desenvolvido para estudá-los em exossomos isolados. Os exossomos purificados, livres das células, foram colocados em meios de cultura e incubados por 24h ou 72h a 37ºC. Após o período de incubação, os exossomos foram analisados para seu índice do miRNA e comparados às células das quais originaram. Havia uma diminuição nos valores da

correlação destes miRNAs nos oncossomos comparados às células em 72h quando comparado a 24h (R^2 = 0,60 a R^2 = 0,43), quando uma correlação elevada foi mantida entre normossomos e células MCF10A (as células usadas para derivar os normossomos; R^2 = 0,98 a R^2 = 0,98) (FIG. 2B). Um regulamento superior impressionante dos seis miRNAs oncogênicos analisados foi observado exclusivamente nos oncossomos cultivados por 72h quando comparado aos oncossomos cultivados por 24h, com um médio de mudança de dobra de 17,6 e de 13,2 para MDA-MB231 e os oncossomos derivados de 4T1, respectivamente, ainda suportando um aumento específico no índice do miRNA nos oncossomos em tempo (FIG. 2C gráficos de meio e de baixo e FIG. 11D, e gráficos da direita, de cima e de baixo). As diferenças insignificantas são anotadas para miRNAs suppressivos do tumor quando os oncossomos foram cultivados por 24h ou 72h (FIG. 2C e FIG. 11D). Normossomos não revelaram nenhuma diferença em seu índice do miRNA irrespectivo do tempo da cultura (FIG. 2C e FIG. 11D). A presença de todos os 15 miRNAs era idêntica em normossomos e em células cultivados por 72h foram derivados a partir de, com um coeficiente de correlação de 0,93 (FIG. 2E, esquerda). Os coeficientes de correlação dos exossomos MDA-MB231 e 4T1 eram significativamente mais baixos (r^2 = 0,56 e 0,42, respectivamente), ainda suportando uma alteração específica em níveis do miRNA dos oncossomos em tempo (FIG. 2E, meio e direita). Adicionalmente, os níveis da correlação diminuem com malignidade crescente das linhas das células quando os oncossomos são comparados a partir de MCF7 (r^2 = 0,76), MDA-MB231 (r^2 = 0,56), 67NR (r^2 = 0,64) e 4T1 (r^2 = 0,42) (FIG. 2E e FIG. 11E). Conseqüentemente, o índice do miRNA dos normossomos era uma reflexão de sua célula de origem em todas as vezes, quando os oncossomos alteraram seu índice dos miRNAs em tempo em uma maneira de célula independente.

[00116] Quando o índice do miRNA dos oncossomos MDA-MB231 e 4T1 foi comparado cm aquele dos normossomos das células de MCF10A e

de NMuMG, um enriquecimento foi observado de miRNAs oncogênicos nos oncossomos cultivados por 24h com uma mudança média da dobra de 2,7 e de 2,0 respectivamente (FIG. 11B). No ponto do tempo de 72h, um médio de mudança de dobra de 30 e 18,2 foi detectado em miRNAs oncogênicos em MDA-MB231 e em oncossomos derivados de 4T1, respectivamente, quando comparado a MCF10A e NMuMG derivado de normossomos (FIG. 11B). Os blots do norte confirmaram o regulamento superior de miR-10b e de miR-21 oncogênico exclusivamente nos oncossomos, suportando ambos a disposição do miRNA assim como a análise de qPCR (FIG. 2D).

[00117] *Oncossomos contêm pré-miRNAs e as proteínas do núcleo RLC*. A cultura livre de células de oncossomos recentemente isolados resultou em um aumento no índice do miRNA, sugerindo o biogenesis ativo nos exossomos. Adicionalmente, a análise da microfluídica sugeriu também a presença de moléculas maiores do RNA (FIG. 2F). Conseqüentemente, a presença potencial dos pré-miRNAs em preparações de normossomo e oncossomo foi explorada. A cultura livre de células dos exossomos por 24h ou 72h após sua isolação foi executada e sujeitada ao tratamento do RNAse para a depleção de todo o RNA extra-exossomal possível. Isto foi seguido pela deteção dos pré-miRNAs nos exossomos. Os pré-miRNAs analisados eram esses que corresponderam aos 15 miRNAs maduros avaliados previamente (Tabela 4).

Tabela 4 Os 15 miRNAs expressados diferencialmente entre oncossomos e normossomos.

MicroRNA ID	**Referências**
miR-let7-a	Kim *et al.*, 2012; Spizzo *et al.*, 2009
miR-15b	Cimmino *et al.*, 2005; Palamarchuk *et al.*, 2010
miR-26a	Kota *et al.*, 2009
miR-31	Valastyan *et al.*, 2009
miR-125a	Guo *et al.*, 2009; Spizzo *et al.*, 2009
miR-125b	Spizzo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011
miR-200a	Park *et al.*, 2008; Spizzo *et al.*, 2009
miR-200c	Park *et al.*, 2008; Spizzo *et al.*, 2009
miR-335	Heyn *et al.*, 2011; Scarola *et al.*, 2010; Tavazoie *et al.*,

	2008
miR-10a	Tan *et al.*, 2009
miR-10b	Spizzo *et al.*, 2009; Yigit *et al.*, 2012
miR-21	Spizzo *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008
miR-27a	Guttilla e White, 2009; Mertens-Talcott *et al.*, 2007
miR-155	Mattiske *et al.*, 2012
miR-373	Spizzo *et al.*, 2009; Voorhoeve *et al.*, 2006

[00118] Todos os 15 pré-miRNAs analisados estavam presentes nos exossomos (normossomos e oncossomos) (FIG. 3A e FIG. 12A). Como observado com miRNAs, os oncossomos foram enriquecidos altamente em pré-miRNAs oncogênicos, enquanto os pré-miRNAs suppressivos de tumor eram mal representados (FIG. 3A e FIG. 12A). Quando os exossomos foram cultivados por 24h ou 72h, um regulamento inferior significativo de pré-miRNAs oncogênicos foi observado nos oncossomos cultivados por 72h quando comparado aos oncossomos cultivados por 24h. Tal variação não foi encontrada nos normossomos (FIG. 3B e FIG. 12B). Os pré-miRNAs suppressivos de tumor não mostraram nenhuma diferença nos oncossomos nem nos normossomos (FIG. 3B e FIG. 12B). Além disso, as quantidades decrescentes de pré-miRNAs oncogênicos nos oncossomos, mas não nos normossomos, foi anotado após 96h da cultura, em que ponto os níveis oncogênicos do pré-miRNA alcançaram os níveis de pré-miRNAs suppressivos de tumor (FIG. 3E e FIG. 12E). O regulamento inferior de pré-miRNAs oncogênicos nos oncossomos foi confirmado por Northern blotting para pré-miR10b e pré-miR21 (FIG. 3C). Em seguida, uma análise do curso de tempo dos pré-miRNAs e os miRNAs nos exossomos foram executados. Cultivando oncossomos isolados por 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h e 96h, observou-se que os níveis dos 6 pré-miRNAs analisados eram inversamente proporcionais a seus miRNAs respectivos com tempo aumentado da cultura (FIG. 3D). Os miRNAs maduros aumentaram em uma quantidade entre 24 e 72h da cultura, depois do qual alcançaram um platô (FIG. 3D). Conseqüentemente, os oncossomos esgotam seu índice

dos pré-miRNAs com um aumento concomitante em seus miRNAs maduros respectivos com tempo. Esta observação levou à hipótese que os oncossomos têm a habilidade de biogênese do miRNA.

[00119] Para compreender por que o processamento dos pré-miRNAs em exossomos cultivados começa após 24h e não imediatamente, todos os seis miRNAs nas células MDA-MB-231 silenciadas para exportin-5 (XPO5) foram monitorados (FIGs. 12C e D). XPO5 é responsável para o transporte dos pré-miRNAs do núcleo ao citoplasma (Yi *et al.*, 2003). Silenciar XPO5 impede o fluxo dos pré-miRNAs do núcleo ao citoplasma e permite uma avaliação do processamento de pré-miRNA citoplásmico sem a introdução do pré-miRNA citoplásmico novo do núcleo. MicroRNA-21 foi monitorado nas células MDA-MB-231siXPO5 antes e depois de centrifugação (FIGs. 12C e D), que ocorreu a 4°C por 3 horas para imitar as condições da isolação dos exossomos. Um regulamento superior significativo do miR-21 não foi observado aos mesmos pontos de tempo entre células centrifugadas e não centrifugadas, onde as células precedentes sofrem um período da retardação de 24h (FIGs. 12C e D). Conseqüentemente, as células e os exossomos requerem um período de tempo de recuperar do estresse da centrifugação a 4°C para iniciar a processar os pré-miRNAs. Espera-se tal aclimatização para atividades enzimáticas em células cultivadas após a passagem da cultura do tecido.

[00120] *Oncossomos contêm as proteínas do núcleo RISC (RLC)*. Os oncossomos esgotam sua concentração dos pré-miRNAs com um aumento concomitante em seus miRNAs maduros respectivos com tempo. Isto levou-nos examinar o biogenesis do miRNA e potencialidades de processamento do pre-miRNA nos exossomos. O biogenesis de MicroRNA requer os componentes de proteína chaves de RLC, Dicer, TRBP e AGO2 (Chendrimada *et al.*, 2005). Tem-se mostrado previamente que Dicer e TRBP formam um complexo que fornece a estabilidade à proteína de Dicer, quando AGO2 é recrutado mais tarde no caminho do biogenesis para

ajudar com a seleção de filamento e o processo de desenrolar o RNA (Chendrimada *et al.*, 2005). A proteína de Dicer foi detectada nos oncossomos derivados das células cancerosas MCF7, MDA-MB231, 67NR e 4T1 (FIG. 1C e FIGs. 4A-B). A possibilidade de detectar a proteína de Dicer extra-exossomal contaminante foir removida tratando todas as preparações dos exossomos com o proteinase K antes de extração da proteína exossomal como descrito previamente (Montecalvo *et al.*, 2012) (FIG. 1C e FIGs. 4A-B). Além disso, as várias linhas de célula cancerosa tais como A549 (câncer de pulmão humano), SW480 (câncer colorretal humano), HeLa (câncer cervical humano) e 4T07 (câncer de mama de rato) produzem também exossomos que contêm Dicer (FIG. 13H). A proteína de Dicer não foi detectada nos normossomos produzidos por MCF10A (células epiteliais de mama não tumorigênico humano) e as linhas de células NMuMG (células epiteliais de mama não tumorigênico de rato) (FIG. 1C e FIG. 4A). A imunogold coloração dos exossomos que usam microscopia de elétron de transmissão corroborou a presença da proteína de Dicer nos oncossomos mas não nos normossomos (FIG. 4B e FIG. 13A). Adicionalmente, o anticorpo do anti-GFP foi usado como outro controle negativo em experiências de imunogold coloração, e nada foi detectado nos exossomos (FIG. 13B).

[00121] A proteína de Dicer era superexpressada mais mais com um marcador da bandeira do terminal N nas células MCF10A e MDA-MB231 (FIG. 13C). Immunoblotting e microscopia confocal adicionalmente confirmaram a presença da proteína da Bandeira-Dicer especificamente nos oncossomos e não nos normossomos (FIG. 4C). Os níveis de Ca2+ intracellular aumentando estimula a secreção dos exossomos (Savina *et al.*, 2003). O ionóforo A23187 do CA^{2+} foi adicionado aos meios de cultura de MCF10A e as células MDA-MB231 e os exossomos foram coletados. Nós observamos um aumento significativo na produção dos exossomos como julgado pela expressão CD9 (FIG. 4D). A proteína de Dicer foi detectada

nos oncossomos mas não foi nos normossomos (FIG. 4D). Estes resultados adicionalmente sugeriram que isto não é a quantidade dos exossomos que determinam o índice mas sim um mecanismo específico que leva à acumulação de Dicer. Além disso, a expressão de Dicer foi diminuída através de uma expressão estável de duas construções de curto-hairpin nas células MCF10A e MDA-MB-231 (FIGs. 13D-E). Os oncossomos derivados das células de MDA-MB-231shDicer continham significativamente menos Dicer em comparação com as células MDA-MB-231 de origem ou shScramble detectadas por immunoblotting e immunogold coloração (FIGs. 4E-F). Dicer não foi detectado também nos normossomos derivados das cjélulas de MCF10AshDicer (FIG. 4E).

[00122] Adicionalmente, as proteínas de RLC, AGO2 e TRBP, foram detectadas também nos oncossomos mas não nos normossomos (FIGs. 4G-H). Exossomos foram extraídos de MCF10A e as células MDA-MB231 transfectadas com um AGO2 marcado de GFP (FIG. 4I). Usando um anticorpo do anti-GFP, a presença de GFP-AGO2 foi detectada nos exossomos extraídos das células MDA-MB231-GFP-AGO2 (FIG. 4J). Ao silenciar de siRNA do AGO2 nas células MCF10A e MDA-MB231, um regulamento inferior da proteína AGO2 em oncossomos derivados de MDA-MB231 foi observado (FIGs. 4K-L). Nós mostramos por imunoprecipitação que AGO2 liga Dicer nos oncossomos quando ambos não forem detectáveis nos normossomos (FIG. 4M). Um sócio fundamental que induza a estabilidade de Dicer e ajuda com sua atividade de clivagem do pré-miRNA é TRBP (Chendrimada *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009). Immunoprecipitação revelou a presença do complexo de Dicer/TRBP nos oncossomos mas não nos normossomos (FIG. 4N).

[00123] Immunoprecipitação que usa o anticorpo do anti-Dicer revelou que AGO2 liga a Dicer nos oncossomos, quando ambos forem indetectáveis nos normossomos (FIG. 13F). Um sócio fundamental que induza a estabilidade de Dicer e ajuda com sua atividade de clivagem do

pré-miRNA é TRBP (Chendrimada *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009). Immunoprecipitação com anticorpo de anti-Dicer revelou a presença do complexo de Dicer/TRBP nos oncossomos mas não nos normossomos (FIG. 13G).

[00124] *Oncossomos usam RLC para processar pré-miRNAs para gerar miRNAs maduros*. A funcionalidade de proteínas de RLC (as propriedades cortando e silenciando) nos oncossomos foi testada para gerar o miRNA maduro do pré-miRNA. Exossomos que faltam Dicer foram extraídos das células MCF10AshDicer, MDA-MB231shDicer e 4T1shDicer (FIG. 14A). O contéudo de pré-miRNAs e miRNAs não revelaram nenhuma mudança significativa nos exossomos regulados inferiores de Dicer com o tempo, indicando que os pré-miRNAs não foram processados para gerar o miRNA na ausência de Dicer nos oncossomos (FIGs. 5A-B e FIGs. 14B-C). Em seguida, o anti-Dicer e os anticorpos do anti-TRBP foram introduzidos em exossomos por eletroporação e comparados aos oncossomos e aos normossomos eletroporados com um anticorpo de controle do anti-actin tratado com o proteinase K após eletroporação para evitar a presença dos anticorpos fora dos exossomos (FIG. 5C). Oncossomos eletroporados com o anticorpo do anti-actin de controle mostrou as mesmas variações em níveis do pré-miRNA e do mirNA como mencionados previamente (FIGs. 5D-E e FIGs. 14D-E). Nos oncossomos com os anticorpos do anti-Dicer e do anti-TRBP, as mudanças insignificantas nos níveis do pré-miRNA e o miRNA foram observados com o tempo, sugerindo uma inibição de processar o pré-miRNA (FIGs. 5D-E e FIGs. 14D-E). O índice total do miRNA foi avaliado por disposições da expressão do miRNA dos oncossomos (derivado de MDA-MB-231), oncossomos de anticorpo do anti-Dicer eletroporado (MDA-MB231 derivado) e os normossomos (derivado de MCF10A) após 72h da cultura livre de células. O índice total do miRNA dos oncossomos com anticorpo do anti-Dicer assemelhou-se mais pròxima àquele dos normossomos de MCF10A (R^2 = 0,79) do que os oncossomos

derivados de MDA-MB231 (R^2 = 0,48). Ao comparar oncossomos com os oncossomos que contêm o anticorpo do anti-Dicer, 198 miRNAs diferencialmente expressados foram observados, 48% de que foram regulados inferiores significativamente (Tabela 6). Destes, 19% são oncogênicos quando somente 1% foi relatado para possuir as propriedades suppressivas de tumor baseadas na literatura previamente publicada (FIG. 14F, Tabela 6).

[00125] Sabe-se que a reação enzimática que transforma um pré-miRNA em um miRNA maduro é espontânea e não requer nenhum fator além das três proteínas de RLC, pré-miRNA incorporado, e Hsp90, uma proteína presente nos exossomos (Maniataki e Mourelatos, 2005; McCready *et al.*, 2010). Para confirmar adicionalmente isto, os oncossomos foram eletroporados com Geldanamicina, uma droga que inibe seletivamente a atividade Hsp90 (Miyata, 2005). Uma diminuição significativa na quantidade de miRNAs maduros sintetizados na presença de Geldanamicina foi encontrada quando comparada aos controles (FIG. 6A). O efeito das proteínas Hsp90 na expressão do miRNA maduro podia ser mediado através de dois processos potenciais sobrepostos: um papel ativo em ajudar à atividade AGO2 no biogenesis do miRNA e a estabilização de miRNAs maduros ligados às proteínas AGO2 no RISC.

[00126] Para confirmar adicionalmente a potencialidade de processamento do pré-miRNA específico dos oncossomos, pré-miRNAs sintéticos -10b e -21 bem como pré-miRNA do precursor pré-cel-1 de *C.elegans* foram eletroporados em exossomos para estudar seu processamento (FIG. 15A). O regulamento inferior significativo dos pré-miRNAs e o regulamento superior de seus miRNAs respectivos foi observado nos oncossomos após a cultura de 72h (FIGs. 6B-C). Oncossomos com anticorpo de Dicer não revelaram uma diferença no índice do pré-miRNA após a cultura de 72h (FIGs. 6B-C). Oncossomos derivados de células shDicer não revelaram uma diferença no índice do

pré-miRNA após a cultura de 72h (FIGs. 6B-C). Adicionalmente, pre-miR-10b, -21 e - cel-1 foram internamente marcados com biotin-deoxitimidina (dT) e transfectaram-nos em células de MCF10A. Os pré-miRNAs modificados por dT foram processados e resultaram na geração de miRNAs maduros, confirmada a marcação não alterou seu potencial de processamento (FIGs. 15B-C). Os pré-miRNAs modificados foram usados em ensaios de 'dicing' para mostrar que o Dicer que contem exossomos era especificamente capaz de processar o pre-miRNA e gerar os miRNAs maduros (FIGs. 6D-F).

[00127] *CD43 citoplásmico em células cancerosas contribui à mobilização de Dicer*. Os corpos multivesiculares (MVBs) são organelas celulares que contêm os endossomos que são liberados eventualmente como exossomos por fusão com a membrana de plasma (Pant *et al.*, 2012). Um mecanismo possível que permite o recrutamento de proteínas do RISC em endossomos e sua liberação subseqüente em exossomos foi explorado. Primeiramente, se Dicer associa com MVBs em células cancerosas quando comparado às células do controle foi explorado. A distribuição celular de Dicer conjuntamente com marcadores de MVBs e o caminho do biogenesis dos exossomos foi comparado. Hrs e BiG2 são marcadores de endossomo cedo e TSG101 é um marcador para MVBs (Razi e Futter, 2006; Shin *et al.*, 2004). Dicer co-localizado com Hrs, BiG2 e TSG101 nas células MDA-MB231 e 4T1 (FIG. 16A). Fosfotidiletanolamina marcada de N-rodamina administrada exogenosamente (NRhPE) é adsorvida por células e retida dentro de MVBs (Sherer *et al.*, 2003). Coloração de Dicer nas células MDA-MB231 e 4T1 co-localizadas na maior parte com o NRhPE em MVBs, que geram eventualmente exossomos. Estes dados estão de acordo com observações precedentes em estudos de co-frationação eram Dicer, TRBP e AGO2 apareceram em frações atrasadas de endossomos/MVB (Shen *et al.*, 2013). No contraste, não havia nenhuma co-localização de Dicer com Hrs, BiG2, TSG101 ou NRhPE em células do controle (NMuMG e MCF10A)

(FIG. 16A). Adicionalmente, os genes Hrs e TSG101 foram silenciados usando dois siRNAs diferentes, bem como BiG2 usando dois shRNAS diferentes, em células de MDA-MB231 e de MCF10A, e a expressão da proteína de Dicer foi avaliada (FIG. 16B). Silenciar de Hrs, BiG2 e TSG101 danifica a formação de MVBs e levou ao regulamento inferior da produção dos exossomos (FIGs. 16C-E). A proteína aumentada de Dicer foi observada no citoplasma e no núcleo das células MDA-MB231 com siHrs, shBiG2 ou siTSG101. Os resultados similares foram obtidos quando as células 4T1 foram usadas em vez das células MDA-MB231. Quando os genes Hrs, BiG2 ou TSG101 foram silenciados em células de MCF10A, a expressão da proteína de Dicer e a posição alteradas (citoplasma) não foram observadas. Interessante, a expressão do mRNA de Dicer foi diminuída nas células siHrs, shBiG2 e siTSG101 MDA-MB231 e 4T1 (FIG. 16F). Isto podia representar um laço de gabarito negativo entre a quantidade de proteína de Dicer na célula e seus níveis de transcrição. Estes resultados sugerem que a exportação de exossomos mediados da proteína de Dicer é potencialmente uma etapa limitando a taxa para a depleção de Dicer em células cancerosas. A formação danificada de MVB levou à acumulação da proteína de Dicer durante todo o citoplasma e o núcleo, sem aumentar níveis da transcrição de Dicer.

[00128] MVBs também proteínas ubiquitiniladas sequestradoras para a degradação subseqüente por lissossomos (Luzio *et al.*, 2009). Nós mostramos que a proteína de Dicer não é ubiquitinada e não co-localiza com LAMP-1, um marcador extensamente usado para lissossomos. Estes resultados sugerem que Dicer não está direcionado para a degradação em células cancerosas mas sim secretado através dos exossomos (FIG. 16G).

[00129] Os sinais que as proteínas alvos a MVBs e exossomos são pela maior parte desconhecidos. Recentemente, uma variedade de proteínas da escora da membrana do plasma, tais como CD43, especulado como mediadores prováveis do transporte da proteína em MVBs e em

exossomos (Shen *et al.*, 2011b). CD43 é predominantemente um sialoglicoproteína de transmembrana de leucócito, que seja expressado altamente em células cancerosas (em sua forma citoplásmica truncada) e não em células de controle (Shelley *et al.*, 2012). CD43 é detectado em muitos tumors sólidos inclusive o câncer de mama, onde correlaciona com a progressão do câncer e metástase (Shelley *et al.*, 2012). Nós exploramos se CD43 pôde contribuir ao transporte de proteínas do RISC a MVBs. Nós mostramos que imunoprecipitados de Dicer com a proteína CD43 nas células MDA-MB231 (FIG. 9A). Quando CD43 é de regulamento inferior usando siRNA nas células MCF10A e MDA-MB231, os níveis de Dicer diminuem significativamente nos oncossomos (FIG. 9B e 16H), com uma acumulação nuclear e citoplásmica da proteína de Dicer. Um regulamento inferior da expressão do mRNA de Dicer foi observado em células cancerosas MDA-MB231siCD43 mas não nas células MCF10AsiCD43 não-tumorigênicas, como observado também antes com siHrs, shBiG2 e siTSG101 (FIG. 16I).

[00130] *Oncossomos alteram transcriptoma de células alvos em uma maneira dependente de Dicer*. As células cancerosas (células MDA-MB231) eram transfectadas com CD63-GFP, um marcador para exossomos (Escola *et al.*, 1998). As células CD63-GFP MDA-MB231 foram usadas para isolar os exossomos de GFP+, que foram incubadas subseqüentemente com células MCF10A. Exossomos de MDA-MB231-CD63-GFP se mostraram para ser verde usando NanoSight complementado com um feixe de laser que detecta partículas se emitindo o fluorescence verde (FIG. 17A.) Os oncossomos de CD63-GFP+ foram mostrados para incorporar as células MCF10A, onde apareceram no citoplasma. Usando disposições da expressão do miRNA, mostrou-se que as células de MCF10A expuseram aos oncossomos derivados de MDA-MB231 adquirem um perfil novo da expressão do miRNA distinto das células de origam de MCF10A e se assemelham às células MDA-MB231. Usando disposições da expressão do

miRNA, mostrou-se que as células de MCF10A expostas aos oncossomos derivados de MDA-MB-231 adquirem um perfil novo da expressão do miRNA distinto das células de origam de MCF10A. Perfilagem global do transcriptoma de MCF10A tratado com os oncossomos assemelha-se mais pròxima às células MDA-MB231. Tais alterações significativas no perfil da expressão do mRNA são invertidas quando as células de MCF10A são expostas aos oncossomos MDA-MB231 com anticorpo de Dicer, e os re-conjuntos do teste padrão da expressão com as células de origem de MC10A.

[00131] Uma análise profunda dos perfis da expressão do miRNA e do mRNA de células de MCF10A expôs aos oncossomos MDA-MB231 comparados às células de origem de MCF10A revelou o regulamento superior significativo de determinados miRNAs e um regulamento inferior de seus alvos descritos do mRNA em células tratadas de MCF10A. Como um exemplo, miRNA-21 e -10b foram regulados superiores (4,6 e 2,3 se dobram respectivamente) em células tratadas de MCF10A, entre com outros miRNAs oncogênicos. MicroRNA-21 e -10b foram implicados na progressão do câncer de mama, no invasivo e metástase (Ma*et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2011). Como mostrado antes, miR-21 e -10b sintetizados nos oncossomos de seus pré-miRNAs. PTEN e HOXD10 são descritos como alvos de miR-21 e de miR-10b e foram suprimidos na análise da disposição da expressão das células de MCF10A tratadas com os oncossomos quando comparados às células do controle MCF10A. A análise Western blot mostrou que os níveis de PTEN e HOXD10 estiveram suprimidos nas células de MCF10A expostas aos oncossomos (FIGs. 7A-B). Para examinar se miR-21 e miR-10b nos oncossomos podem silenciar PTEN e HOXD10 em células recipientes de MCF10A, as células de MCF10A eram transfectadas transientemente com os repórteres de luciferase que contêm o 3'UTR tipo selvagem de genes PTEN ou HOXD10 que são capazes de ligar miR-21 e miR-10b. O 3'UTR mutante dos vetores PTEN ou HOXD10

foi usado como controles. Uma diminuição na atividade do repórter de luciferase foi vista nas células de MCF10A incubadas com os oncossomos, confirmando a administração funcional dos miRNAs dos oncossomos às células recipientes (FIG. 7C). Nos oncossomos as células de MCF10A, os níveis incubados da expressão PTEN e HOXD10 foram avaliados em pontos diferentes do tempo. Uma diminuição significativa foi detectada em PTEN e a expressão HOXD10 imediatamente depois de tratar as células com 72h de exossomos cultivados (FIGs. 7A-B). Níveis da expressão PTEN e HOXD10 mudaram minimamente nas células de MCF10A tratadas com os exossomos recentemente isolados, sugerindo que a concentração suficiente dos miRNAs maduros não pode ter estado presente neste ponto do tempo (FIGs. 17B-C). As células de MCF10A tratadas com os oncossomos cultivados por 72h com anticorpo do anti-Dicer revelaram um regulamento inferior insignificante de PTEN e de HOXD10 (FIG. 7D e FIG. 17G). Adicionalmente, processamento de miR-15 nas células, um miRNA não detectado em oncossomos derivados de MDA-MB231, não era alterado devido ao tratamento de células de MCF10A com os exossomos MDA-MB-231 que contêm o anticorpo de Dicer, mostrando um efeito insignificante do anticorpo de Dicer em células tratadas (FIG. 17D). Alguns relatórios mostram o regulamento inferior de alvos do miRNA nas células incubadas com exossomos sem uma necessidade de períodos longos da cultura (Kosaka *et al.*, 2013; Narayanan *et al..*, 2013; Pegtel *et al.*, 2010). MiR-182-5p é um dos miRNAs regulados superiores em células de MCF10A em cima do tratamento dos oncossomos e Smad4, um alvo de miR-182-5p (Hirata *et al..*, 2012), é um dos genes regulados inferiores em cima do tratamento dos oncossomos destas células (FIG. 7E). O regulamento superior de miR-182-5p nos oncossomos durante o período da cultura não foi observado e pré-miR182-5p não foi detectado nos oncossomos (FIG. 17E). Conseqüentemente, os oncossomos embalam também miRNAs maduros sem a necessidade de processar pré-miRs. Se tais miRs maduros

estiverem em quantidades estoiquiométricos relevantes, podem regular a expressão do gene de células recipientes, como mostrado 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).. Entretanto, se alguns miRNAs maduros não estiverem presentes nos exossomos mas seus pre-miRNAs estiverem, estes podem ter um efeito biológico em seus alvos já que serão processados em RLC maduros associados a miRNAs.

[00132] A viabilidade da célula e proliferação de células de MCF10A tratadas com os oncossomos cultivados por 72h foram aumentados, que não foi observado quando os oncossomos recentemente isolados foram usados (FIG. 7F). Uma diferença não foi observada quando as células de MCF10A foram tratadas com os oncossomos derivados de MDA-MB231 que contêm anticorpos do anti-Dicer (FIG. 7F). O mesmo padrão continua verdadeiro para a capacidade da formação da colônia das células de MCF10A tratadas com os oncossomos (FIGs. 7G e 17F). Células de MCF10A tratadas com oncossomos cultivados por 72h formam colônias quando comparado às células não tratadas (FIG. 7G). Tal formação da colônia não foi observada quando os oncossomos recentemente isolados ou os oncossomos do AB Dicer foram usados (FIG. 7G).

[00133] *Oncossomos induzem a formação de tumor de células epiteliais não-tumorigênicas e ativam os fibroblastos*. Os estudos recentes sugerem que os exossomos se derivaram das células estromais mesenquimais de medula óssea apoia o crescimento múltiplo da célula do mieloma (Roccaro *et al.*, 2013). Para aproximar ao 'potencial oncogênico' funcional de células de MCF10A e de MCF10A com exposição prévia aos oncossomos (células-oncossomos de MCF10A), estas células foram injetadas ortotopicalmente na almofada de gordura mamária de ratos fêmeas de nu/nu, similares ao protocolo descrito recentemente (Luga *et al.*, 2012). As células de MCF10A não formaram tumores nestes ratos como

relatado também antes (Mavel *et al.*, 2002; Thery *et al.*, 2002) (FIG. 7H). As células-oncossomos de MCF10A formaram tumores após 21 dias, bem como as células do controle MDA-MB231 (FIG. 7H). As células de MCF10A incubadas com os oncossomos que contêm o anticorpo do anti-Dicer (mas não os anticorpos do anti-actin do controle) mostraram uma redução significativa no volume do tumor (FIG. 7H). Estes resultados suportam a conversão oncogênica de células de MCF10A quando expostas aos oncossomos que contêm a proteína de Dicer (FIGs. 7F-H e FIG. 17F).

[00134] *Os exossomos de soro dos pacientes de câncer contêm Dicer e processam premiRNAs para gerar os miRNAs maduros*. Exossomos de tumores humanos foram examinados para proteínas de RISC. Para conseguir a especificidade da célula cancerosa, partes de tumor endometrial e de mama, ovário preliminar humano recentemente isolado, foram enxertados ortotopicalmente em órgãos apropriados dos ratos fêmeas atímicos de nu/nu (FIGs. 18A-B). Os exossomos de soro destes ratos foram avaliados pelo microscópio de elétron (FIG. 18C). Blot da proteína da exclusão do tamanho do índice isolado destes exossomos demonstrou a existência da proteína de Dicer exclusivamente da origem humana (hsa-Dicer) (FIG. 8A e FIG. 18D). Os extratos da proteína dos exossomos derivados de 4T1 e das células 4T1 foram usados como controles para mostrar Dicer da origem do rato, que exibe um peso molecular diferente (mmu-Dicer) (FIG. 8A).

[00135] Oncossomos das células MDA-MB231 foram incubados com os fibroblastos dermais humanos (HDF). Perfilagem global da expressão do gene de fibroblastos incubados de oncossomos revela um impacto significativo em seu transcriptoma, quando comparado às células do controle. O regulamento inferior de αSMA (ACTA) (18 dobras), COL1A1 (12 dobras), TGFβ1 (15 dobras), CTGF (8 dobras), Ras (6 dobras) e ERK (4 dobras) foi observado. Os fibroblastos incubados com os oncossomos proliferados em uma taxa mais elevada (FIG. 8I). Estes resultados sugerem

que os oncossomos podem ativar fibroblastos estromais para se assemelhar a um fenótipo do miofibroblasto e para indicar as características associadas aos fibroblastos associados a carcinoma.

[00136] Em seguida, exossomos foram isolados de 100 µl de amostras frescas de soro de 8 indivíduos saudáveis (H) e de 11 pacientes com carcinoma de mama (BC) (FIG. 8B). As membranas de bicamada lipídica foram distinguidas por microscopia de elétron em exossomos (FIG. 8C). O soro de pacientes de câncer de mama conteve significativamente mais exossomos quando comparado ao soro de doadores saudáveis (FIG. 8D). Quando o número igual dos exossomos foi colocado na cultura por 24 e 72h, os 6 pré-miRNAs foram encontrados para ser regulados inferiores exclusivamente em pacientes de câncer de mama e seus miRNAs maduros respectivos foram regulados superiores após 72h da cultura, sugerindo pré-miRNAs foram processados na forma madura nos exossomos do soro fresco de pacientes de câncer de mama e não nos controles saudáveis (FIGs. 8E-F). Em seguida, os exossomos sozinhos ou combinados com as células de MCF10A, foram injetados ortotopicalmente na almofada de gordura mamária de ratos fêmeas de nu/nu. Cinco de 11 exossomos do soro derivados dos pacientes de câncer de mama combinados com as células de MCF10A formaram tumores quando nenhum dos exossomos fornecedores saudáveis ou de exossomos sozinhos, formaram tumores (FIG. 8G). Interessante, os exossomos que formaram tumores foram mostrados também para ter o mais elevado aumento de mudança de dobra na quantidade de miRNAs maduros após a cultura de 72h (FIGs. 8E-F).

[00137] Exossomos foram isolados adicionalmente de um conjunto novo das amostras do soro obtidas de 5 indivíduos saudáveis (C46, C45, C44, C43, e C41) e de 4 pacientes com carcinoma de mama metastática (Met219, Met354, Met299 e Met356). A expressão de Dicer nos exossomos foi observada somente em amostras metastáticas do carcinoma de mama e não nos exossomos do soro de indivíduos saudáveis (FIG. 8H).

Tabela 5. miRNAs diferencialmente expressados entre os oncossomos (derivado de MDA-MB231 e os normossomos (derivado de MCF10A).

miRNA	**p Valor**
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

miRNA	p Valor
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
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

miRNA	p Valor
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
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

miRNA	p Valor
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

miRNA	p Valor
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
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	0.02747134
hsa-miR-939-P	0.027590618
mmu-miR-2182	0.027770773

miRNA	p Valor
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
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

miRNA	p Valor
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
mmu-miR-190-P	0.046060702
hsa-miR-345	0.046092233
mmu-miR-711	0.046378698
hsa-miR-3116-2-P	0.046593825
hsa-miR-99a	0.046936625

miRNA	p Valor
mmu-miR-26a	0.04716311
hsa-miR-1248-P	0.047256233
mmu-miR-721-P	0.047540414
mmu-miR-801-P	0.048152879
hsa-miR-1826-P	0.048243592
hsa-miR-1236	0.048451235
hsa-miR-339-5p	0.048498093
mmu-miR-804	0.04863614
mmu-miR-467d*	0.048653868
mmu-miR-1191	0.048884442
hsa-miR-148a	0.048962197
hsa-miR-141	0.049152638
mmu-miR-1937a-P	0.049351966
mmu-miR-696	0.049529754
hsa-miR-302a	0.049722628

Tabela 6. miRNAs diferencialmente expressados entre os oncossomos (derivado de MDA-MB231) e os oncossomos com anticorpo de Dicer (derivado de MDA-MB-231).

miRNAs	Quantia de mudança
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

miRNAs	Quantia de mudança
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-2861-P	-5.546034309
mmu-miR-3471-2-P	-5.968684885
hsa-miR-3120-P	-5.809647124
mmu-miR-494	-5.460136383
mmu-miR-690	-6.785641527
hsa-mir-591-P	-4.676566053
hsa-miR-943	-4.21472556
hsa-miR-24-2*	-5.267717705
hsa-miR-891a	3.970259655
mmu-miR-467e*	4.371589059
mmu-miR-196a	-4.673219124
mmu-miR-763-P	-4.837159778
mmu-miR-689-P	-4.006113822
mmu-miR-1961-P	-4.02458343
mmu-miR-709	-43.11955582
hsa-miR-3147	-4.083582871
hsa-miR-1323	3.866709935
mmu-miR-761	-4.758191473
hsa-miR-1979	-22.63130882
hsa-miR-1255b	3.856857003
mmu-miR-3072	-3.955191268
hsa-miR-1248-P	3.690795669
hsa-mir-147-P	4.119353729
hsa-miR-3195	-5.808376336
hsa-miR-1273d-P	-7.045907865
mmu-miR-207	-4.467339352
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

miRNAs	Quantia de mudança
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

miRNAs	Quantia de mudança
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

miRNAs	Quantia de mudança
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
mmu-miR-27a	2.535988521
hsa-miR-937	- 3.726272762
hsa-miR-1255a-P	3.247591046
mmu-miR-505	2.610666762
hsa-miR-1263	2.736571865
mmu-miR-302b*	2.945119065
mmu-miR-721-P	2.91504884
hsa-miR-18b	2.611682702
hsa-mir-31	- 2.702014494
mmu-miR-801-A	- 6.683601538
has-let-7f-1*	3.908401267
hsa-miR-1259-P	2.644459942
mmu-mir-320-P	- 3.437080879
mmu-miR-1939	- 4.465923575
hsa-miR-1228	- 2.567882638
hsa-miR-483-3p	- 2.775662208
hsa-miR-129-5p	2.655425404
mmu-miR-145*	2.552327584
hsa-miR-544	3.017286257
hsa-miR-3124-P	3.475660577
hsa-let-7a*	3.67482271
hsa-miR-1308-P	- 2.815549142
hsa-miR-124	2.518148474
mmu-miR-500-P	2.439916722
hsa-miR-589	2.619270955
hsa-miR-155MM1G/T	- 3.153648547
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

miRNAs	Quantia de mudança
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

* * *

[00138] Todos os métodos divulgados e reivindicados neste documento podem ser realizados e executados sem experimentação imprópria devido a presente divulgação. Quando as composições e os métodos desta invenção forem descritos nos termos de modalidades preferidas, será aparente àqueles versados na técnica que as variações podem ser aplicadas aos métodos e nas etapas ou na seqüência das etapas do método descrito aqui sem partir do conceito, do espírito e do âmbito da invenção. Mais especificamente, será aparente que determinados agentes que são quimicamente e fisiologicamente relacionados podem ser substituídos por agentes descritos aqui quando o mesmo ou os resultados similares estiverem alcançados. Todos tais substitutos e modificações similares aparentes àquelas versados na técnica são julgados serem dentro do espírito, do âmbito e do conceito da invenção como definidos pelas reivindicações anexas.

REFERÊNCIAS

As seguintes referências, na medida em que fornecem procedimentos exemplares ou outros detalhes complementares àqueles estabelecidos neste documento, estão especificamente incorporadas neste documento por referência.

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.

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). Periocular capillary hemangiomas: indications and options for treatment. Middle East Afr J Ophthalmol 17, 121-128.

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.

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.

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, M111 007898.

Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, 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.

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.

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.

Gibbings, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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. Virol J 6, 129.

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).

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.

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., Viloria-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.

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.

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.

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.

Mavel, S., Thery, I., and Gueiffier, 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.

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., Ropero, 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.

Melo, S.A., Ropero, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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).

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.

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 497, 383-387.

Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Ingmundson, A., Horner, 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 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-Esteves, 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, (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.

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.

REIVINDICAÇÕES

1. Método *in vitro* de detecção de biomarcador de câncer em um sujeito, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) obter uma amostra biológica do sujeito;

(b) medir o nível de:

(i) Dicer em uma fração do exossomo da amostra; e/ou

(ii) atividade de processamento de Dicer de precursor miRNA em uma fração do exossomo da amostra; e

(c) identificar o sujeito tendo ou não tendo um biomarcador de câncer com base no nível de Dicer medido ou atividade de processamento de Dicer.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a amostra é:

(i) essencialmente livre de células; ou

(ii) uma amostra de linfa, saliva, urina ou plasma.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende, adicionalmente, purificar uma fração do exossomo da amostra ou aumentar a produção de uma fração do exossomo da amostra.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cabeça e pescoço, câncer de próstata, câncer de esôfago, câncer traqueal, câncer cerebral, câncer de fígado, câncer de bexiga, câncer de estômago, câncer pancreático, câncer de ovário, câncer uterino, câncer cervical, câncer de testículo, câncer de cólon, câncer retal, ou câncer de pele.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente:

(i) medir o nível de um ou mais miRNA(s) em uma fração do exossomo da amostra selecionados a partir de

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,
tem-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-455-5 p,
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-548q-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-15b*,
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,
hsa-miR-302a; ou

(ii) medir o nível deAGO2 ou TRBP.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende, adicionalmente, medir o nível de um precursor miRNA compreendendo medir o nível de um precursor de um do(s) miRNA(s) selecionados a partir de:

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,
tem-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-455-5 p,
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-548q-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-15b*,
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,
hsa-miR-302a.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito:

(i) tenha sido tratado anteriormente para um câncer; ou

(ii) tenha tido um tumor removido cirurgicamente anteriormente.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que:

(i) identifica o sujeito como tendo ou não tendo um biomarcador de câncer compreendendo, adicionalmente, correlacionar o nível de Dicer medido ou atividade de processamento de Dicer com um risco para câncer; ou

(ii) identifica o sujeito como tendo ou não tendo um biomarcador de câncer compreendendo, adicionalmente, análise do nível de Dicer medido ou atividade de processamento de Dicer usando um algoritmo.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que a análise é executada por um computador.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente:

b) medir o nível de:

(i) Dicer, AGO2 ou TRBP em uma fração do exossomo da amostra;

(ii) um precursor miRNA em uma fração do exossomo da amostra;

(iii) um ou mais miRNA(s) em uma fração do exossomo da amostra selecionado(s) a partir de

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,
tem-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-455-5 p,

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-548q-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-15b*,
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,
hsa-miR-302a; e/ou

(iv) uma atividade de processamento de miRNA em uma fração do exossomo da amostra; e

(c) identificar o sujeito como tendo ou não tendo um biomarcador de câncer, comparando o nível de RISC, precursor miRNA, miRNA(s) ou atividade de processamento de miRNA na amostra do sujeito ao nível de miRNA(s), precursor miRNA, atividade de processamento de RISC ou miRNA em um tecido não canceroso ou amostra de célula.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que:

(i) mede o nível de Dicer, AGO2 ou TRBP compreendendo realizar um Western blot, um ELISA ou ligação a um arranjo de anticorpo;

(ii) mede os níveis de miRNA compreendendo medir os níveis de miRNA processados;

(iii) mede os níveis de miRNA compreendendo realizar RT-PCR, Northern blot ou uma hibridização de arranjo.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende, adicionalmente, relatar se o sujeito tem um biomarcador de câncer.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que relatar compreende preparar um relatório escrito ou eletrônico.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que compreende, adicionalmente, prover o relatório para o paciente, um médico, um hospital ou uma companhia de seguros.

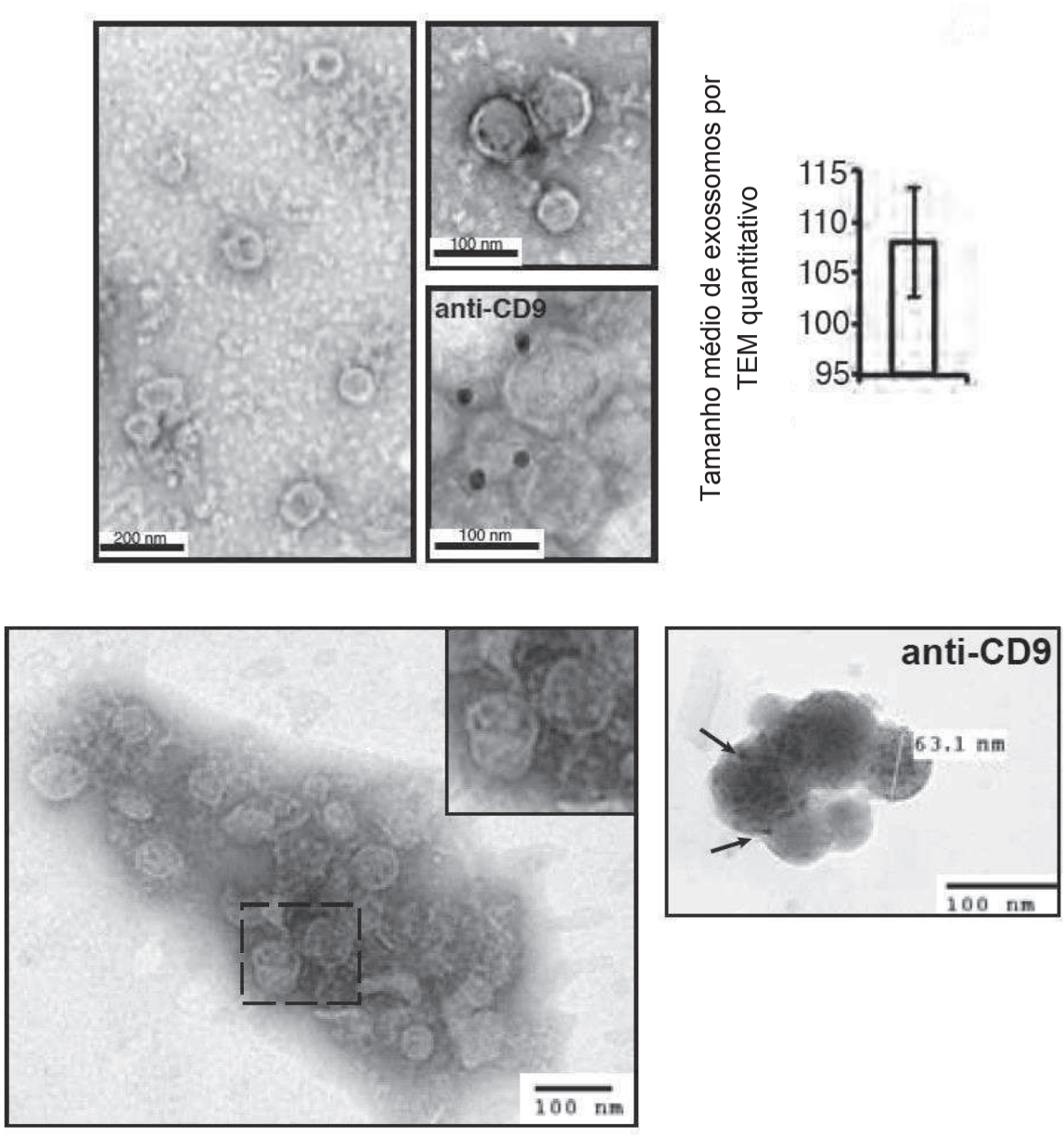

200 nm
100 nm
anti-CD9
100 nm
Tamanho médio de exossomos por TEM quantitativo
115
110
105
100
95
100 nm
anti-CD9
63.1 nm
100 nm

FIG. 1A

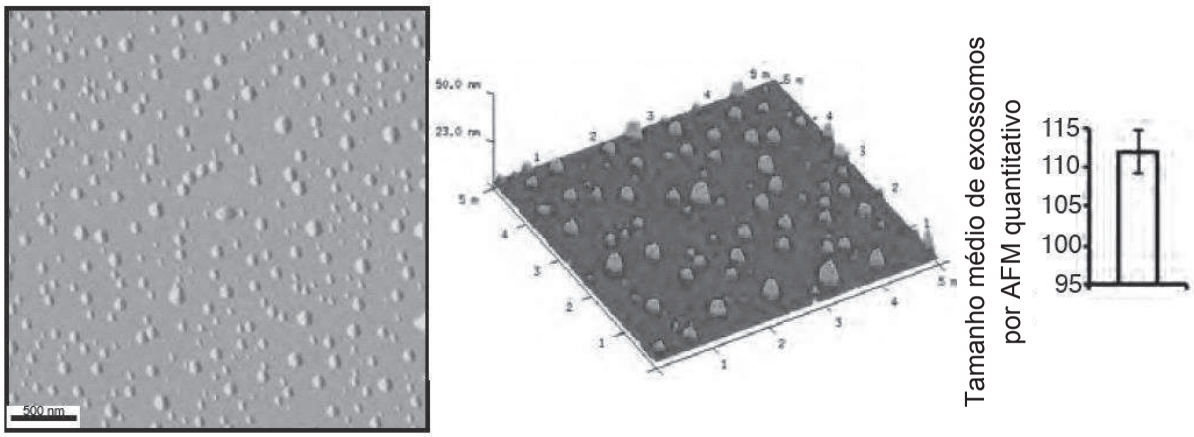

500 nm
50.0 nm
23.0 nm
Tamanho médio de exossomos
por AFM quantitativo
115
110
105
100
95

FIG. 1B

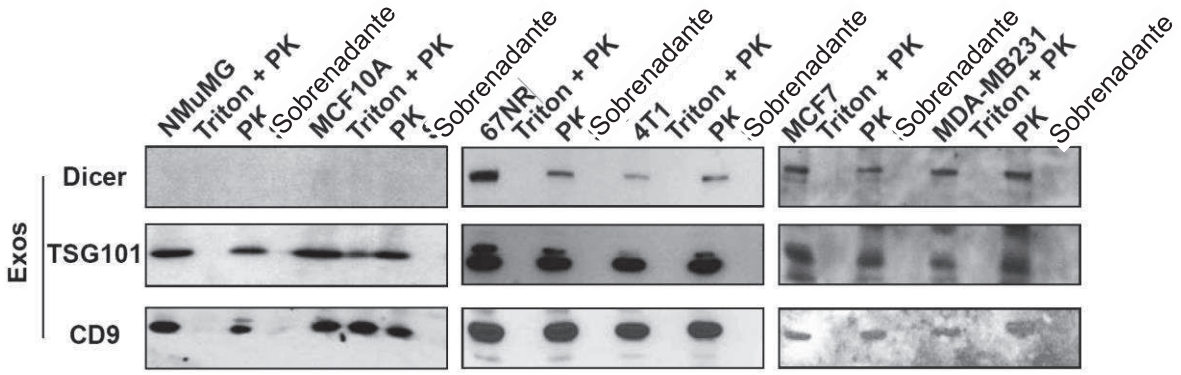

NMuMG
Triton + PK
PK
Sobrenadante
MCF10A
Triton + PK
PK
Sobrenadante
67NR
Triton + PK
PK
Sobrenadante
4T1
Triton + PK
PK
Sobrenadante
MCF7
Triton + PK
PK
Sobrenadante
MDA-MB231
Triton + PK
PK
Sobrenadante
Exos
Dicer
TSG101
CD9

FIG. 1C

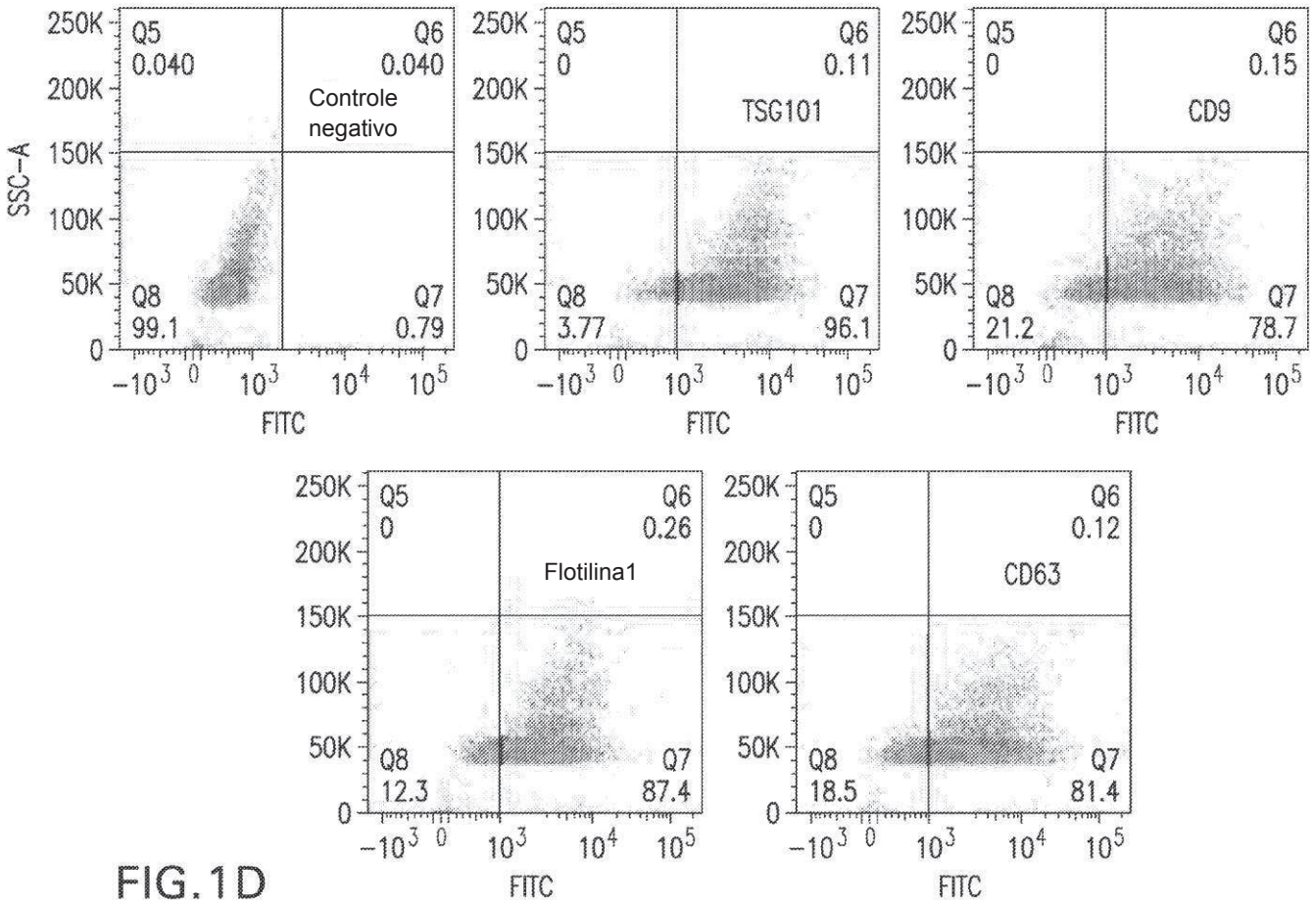

Controle negativo
TSG101
CD9
Flotilina1
CD63
SSC-A
FITC
Q5
Q6
Q7
Q8
0.040
0.040
99.1
0.79
0
0.11
3.77
96.1
0
0.15
21.2
78.7
0
0.26
12.3
87.4
0
0.12
18.5
81.4
250K
200K
150K
100K
50K
0
-10^3
10^3
10^4
10^5

FIG.1D

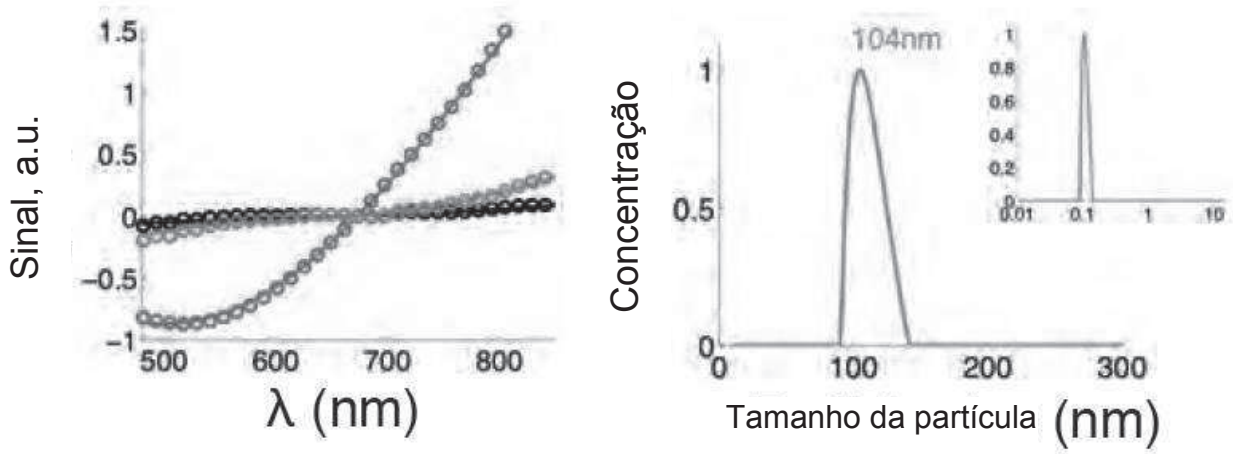

Sinal, a.u.
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
500
600
700
800
λ (nm)
Concentração
104nm
1
0.5
0
0
100
200
300
Tamanho da partícula (nm)

FIG. 1E

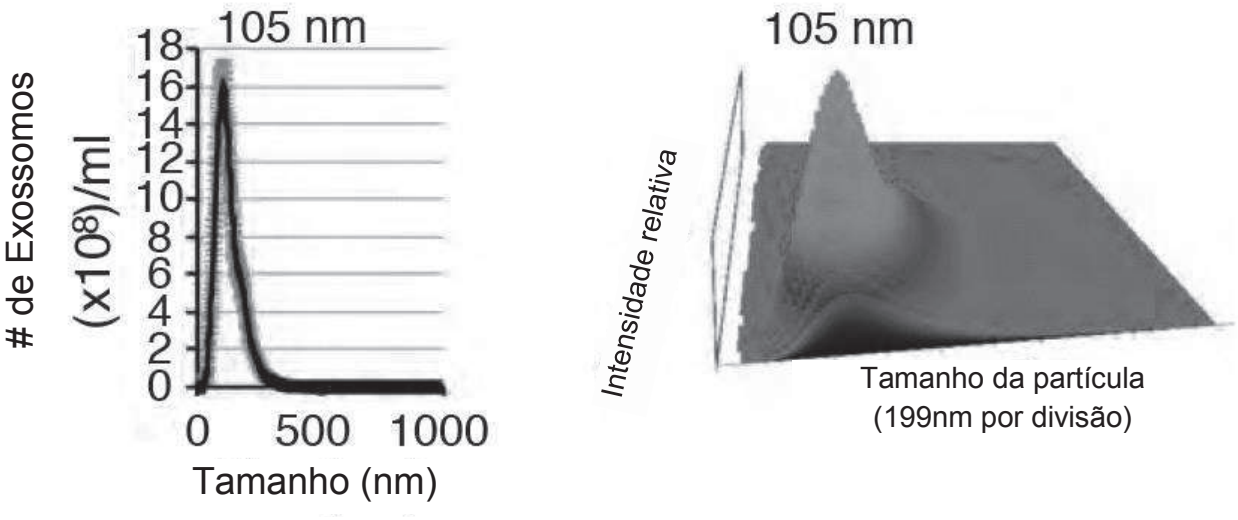

105 nm
de Exossomos
(x10⁸)/ml
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
500
1000
Tamanho (nm)
105 nm
Intensidade relativa
Tamanho da partícula
(199nm por divisão)

FIG. 1F

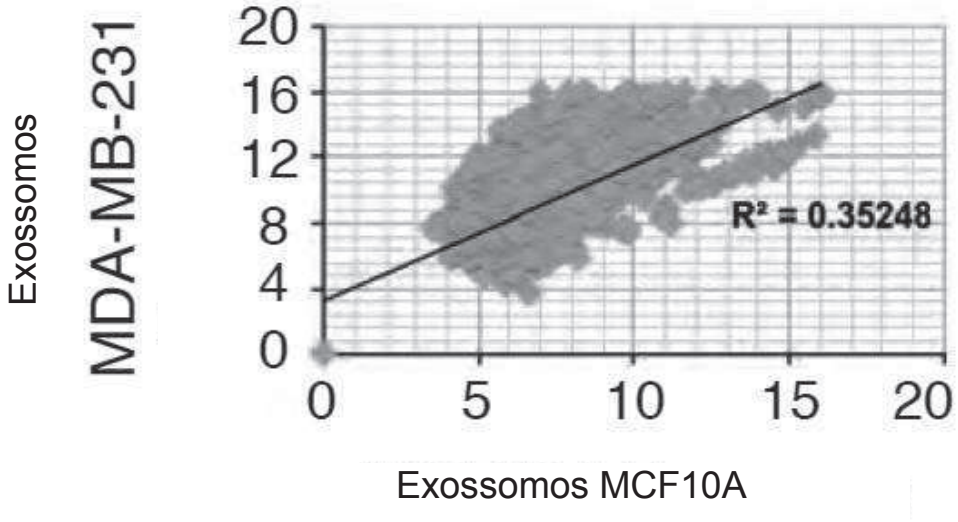

Exossomos
MDA-MB-231
20
16
12
8
4
0
0
5
10
15
20
R² = 0.35248
Exossomos MCF10A

FIG. 2A

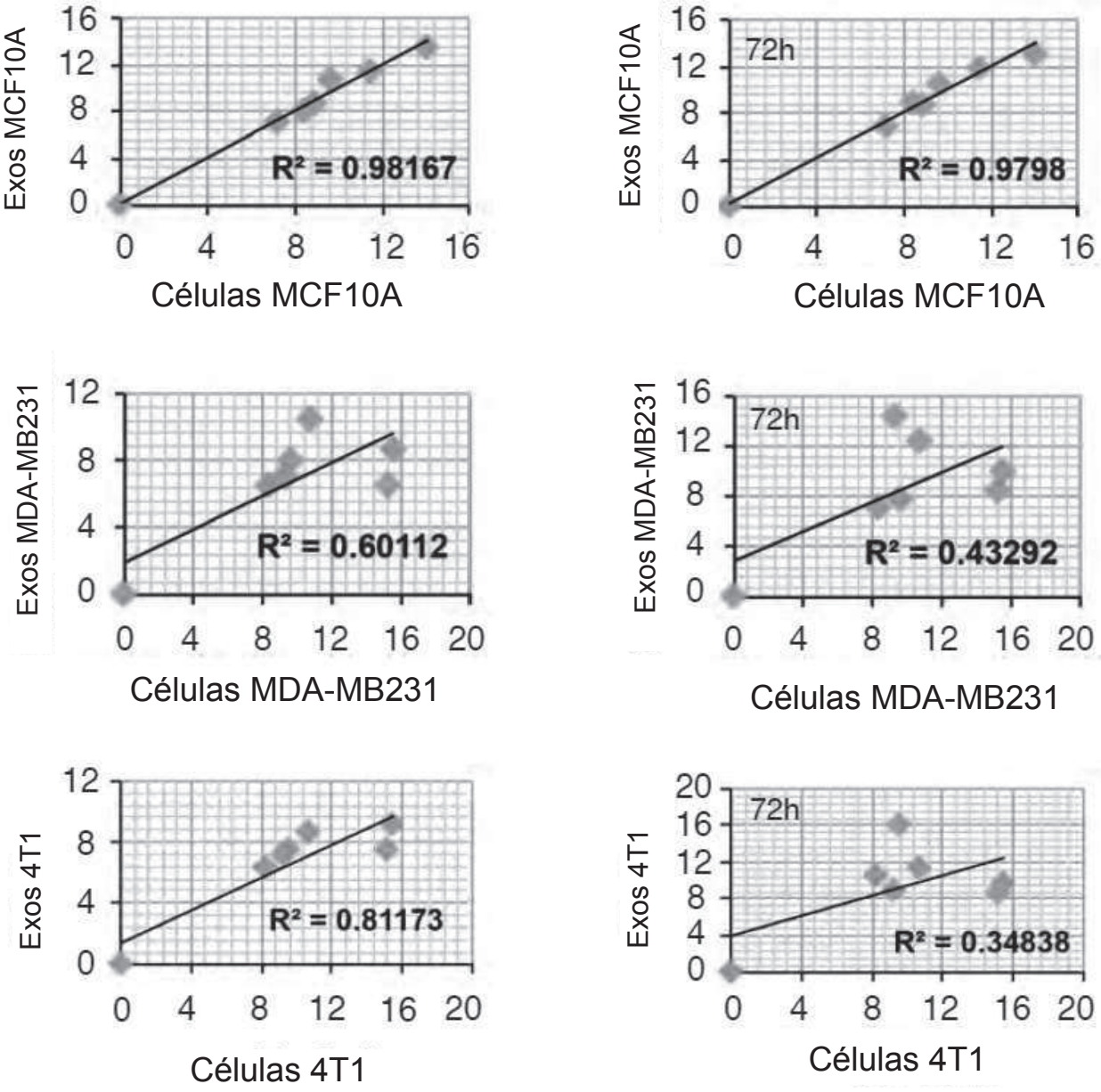

Exos MCF10A
Células MCF10A
R² = 0.98167
72h
R² = 0.9798
Exos MDA-MB231
Células MDA-MB231
R² = 0.60112
R² = 0.43292
Exos 4T1
Células 4T1
R² = 0.81173
R² = 0.34838

FIG. 2B

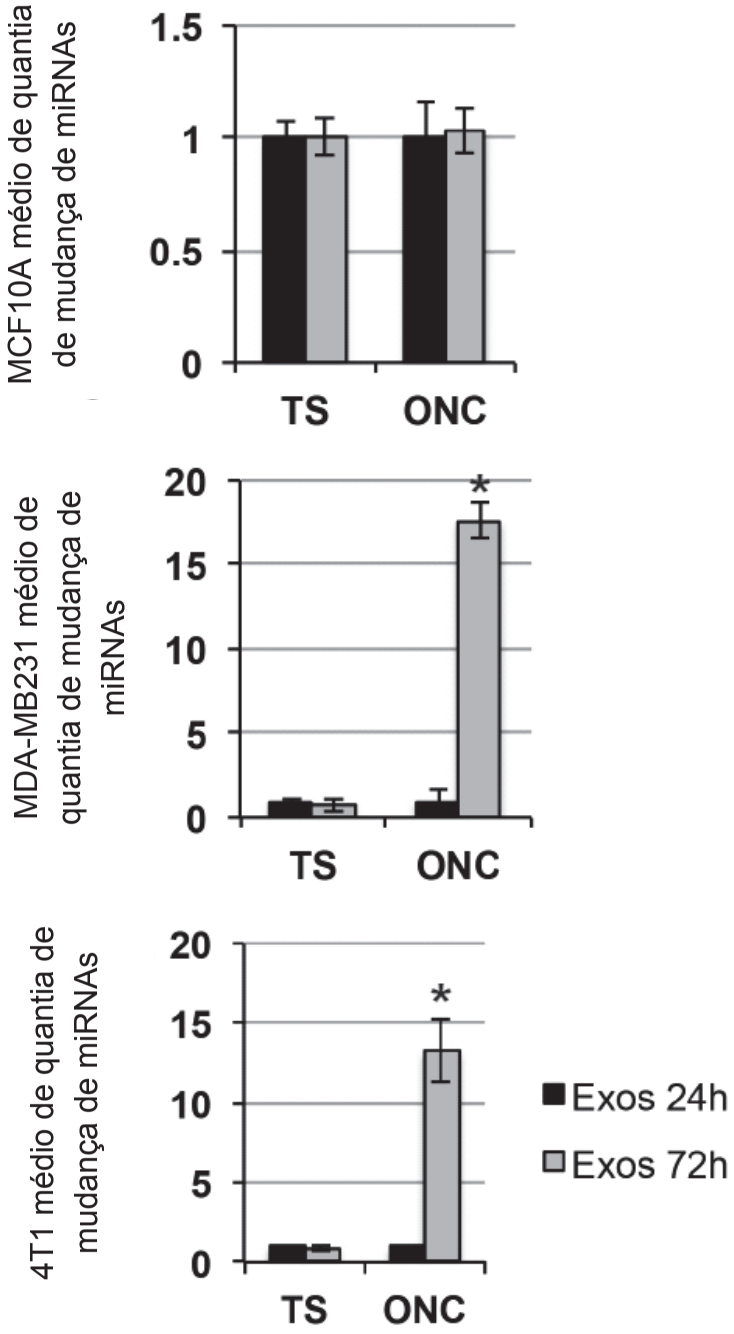

MCF10A médio de quantia de mudança de miRNAs
1.5
1
0.5
0
TS
ONC
MDA-MB231 médio de quantia de mudança de miRNAs
20
15
10
5
0
*
TS
ONC
4T1 médio de quantia de mudança de miRNAs
20
15
10
5
0
*
TS
ONC
Exos 24h
Exos 72h

FIG. 2C

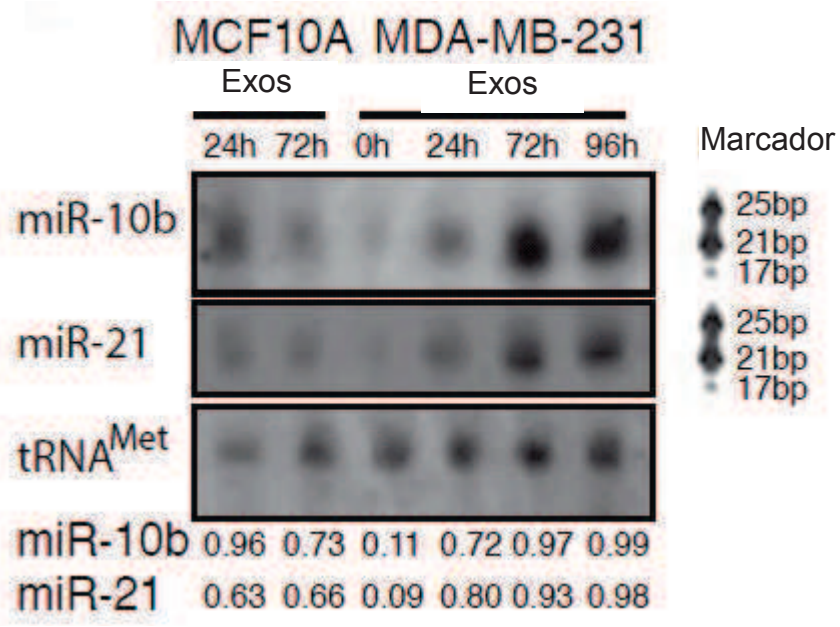

MCF10A MDA-MB-231
Exos
Exos
24h 72h 0h 24h 72h 96h
Marcador
miR-10b
miR-21
tRNA^Met
25bp
21bp
17bp
25bp
21bp
17bp
miR-10b 0.96 0.73 0.11 0.72 0.97 0.99
miR-21 0.63 0.66 0.09 0.80 0.93 0.98

FIG. 2D

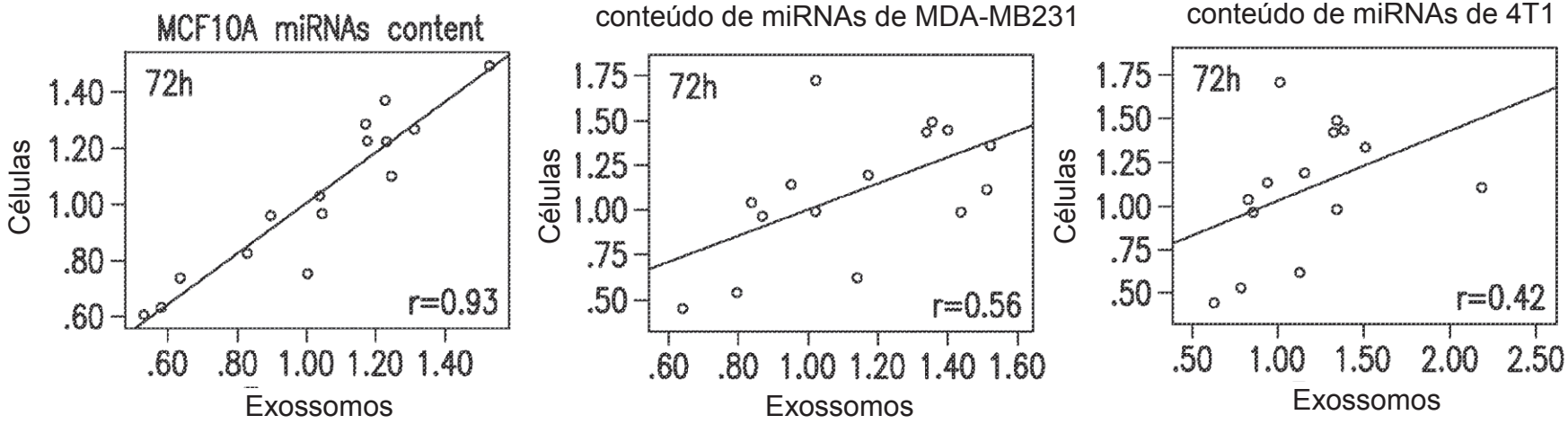

MCF10A miRNAs content
72h
r=0.93
Células
Exossomos
1.40
1.20
1.00
.80
.60
.60
.80
1.00
1.20
1.40
conteúdo de miRNAs de MDA-MB231
72h
r=0.56
Células
Exossomos
1.75
1.50
1.25
1.00
.75
.50
.60
.80
1.00
1.20
1.40
1.60
conteúdo de miRNAs de 4T1
72h
r=0.42
Células
Exossomos
1.75
1.50
1.25
1.00
.75
.50
.50
1.00
1.50
2.00
2.50

FIG.2E

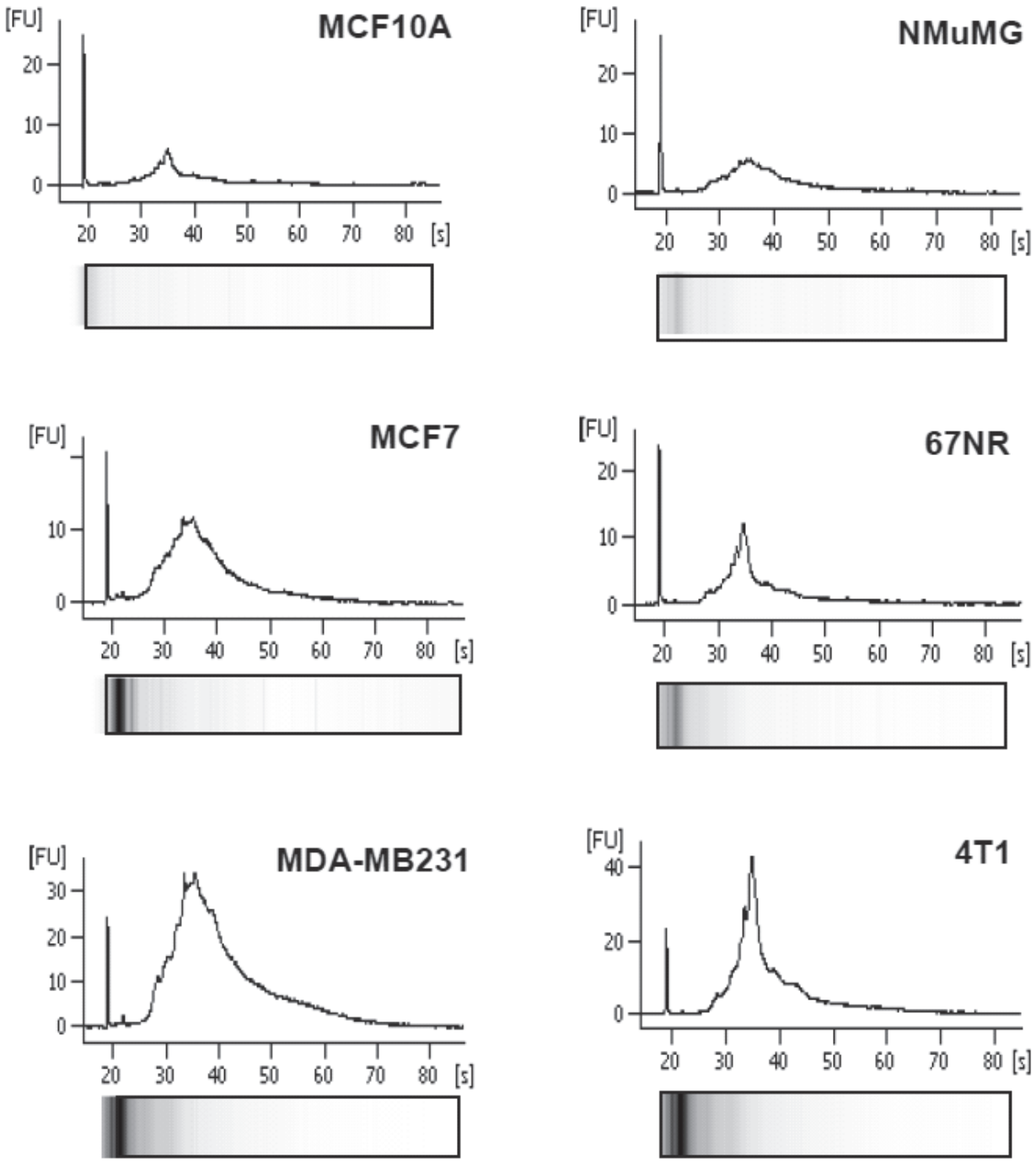

MCF10A
[FU]
20
10
0
20 30 40 50 60 70 80 [s]
NMuMG
[FU]
20
10
0
20 30 40 50 60 70 80 [s]
MCF7
[FU]
10
0
20 30 40 50 60 70 80 [s]
67NR
[FU]
20
10
0
20 30 40 50 60 70 80 [s]
MDA-MB231
[FU]
30
20
10
0
20 30 40 50 60 70 80 [s]
4T1
[FU]
40
20
0
20 30 40 50 60 70 80 [s]

FIG. 2F

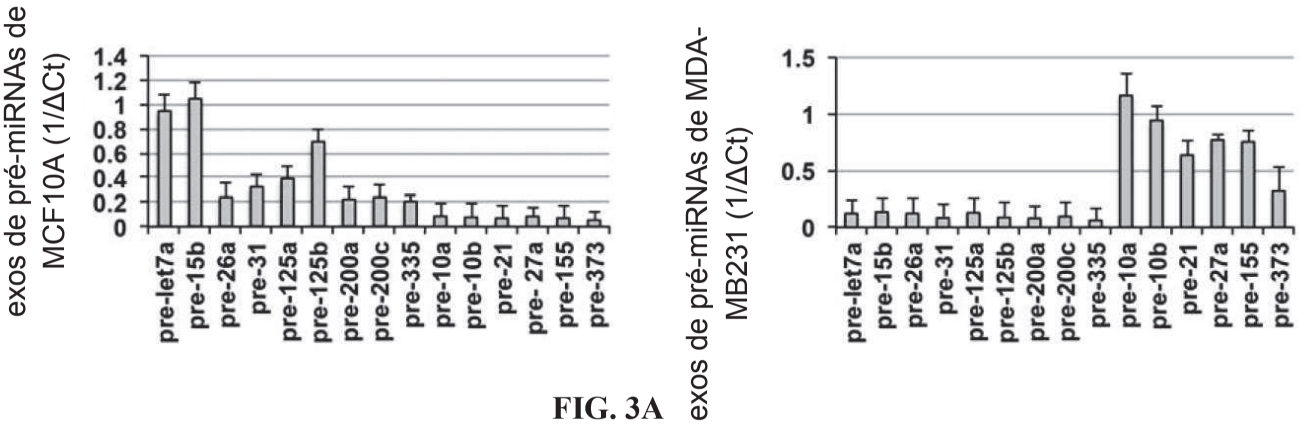

exos de pré-miRNAs de MCF10A (1/ΔCt)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
pre-let7a
pre-15b
pre-26a
pre-31
pre-125a
pre-125b
pre-200a
pre-200c
pre-335
pre-10a
pre-10b
pre-21
pre- 27a
pre-155
pre-373
exos de pré-miRNAs de MDA-MB231 (1/ΔCt)
1.5
1
0.5
0
pre-let7a
pre-15b
pre-26a
pre-31
pre-125a
pre-125b
pre-200a
pre-200c
pre-335
pre-10a
pre-10b
pre-21
pre-27a
pre-155
pre-373

FIG. 3A

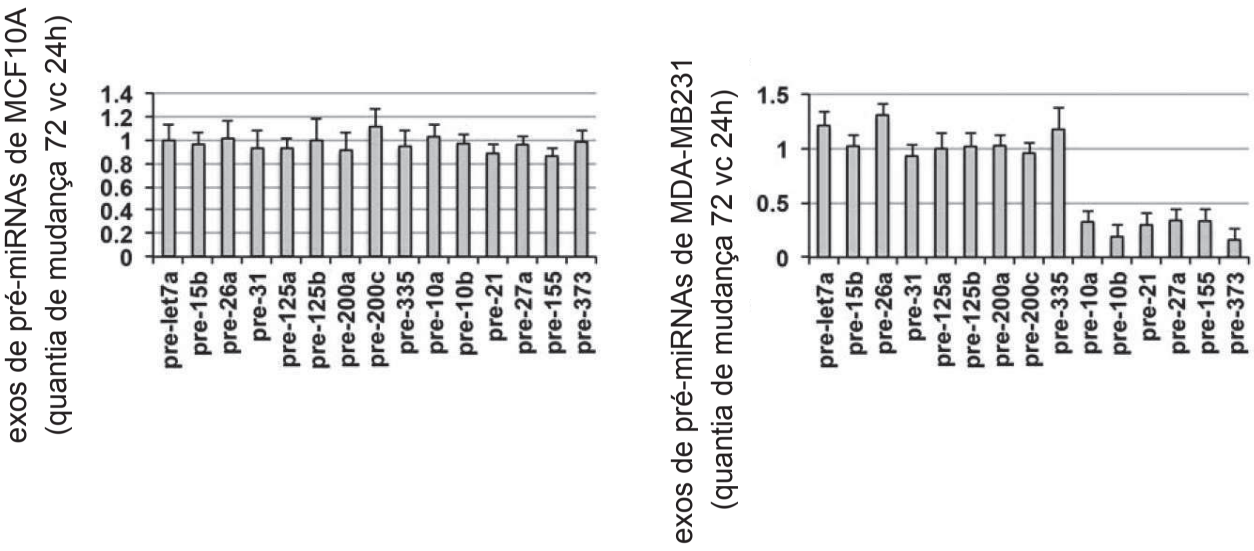

exos de pré-miRNAs de MCF10A (quantia de mudança 72 vc 24h)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
pre-let7a
pre-15b
pre-26a
pre-31
pre-125a
pre-125b
pre-200a
pre-200c
pre-335
pre-10a
pre-10b
pre-21
pre-27a
pre-155
pre-373
exos de pré-miRNAs de MDA-MB231 (quantia de mudança 72 vc 24h)
1.5
1
0.5
0
pre-let7a
pre-15b
pre-26a
pre-31
pre-125a
pre-125b
pre-200a
pre-200c
pre-335
pre-10a
pre-10b
pre-21
pre-27a
pre-155
pre-373

FIG. 3B

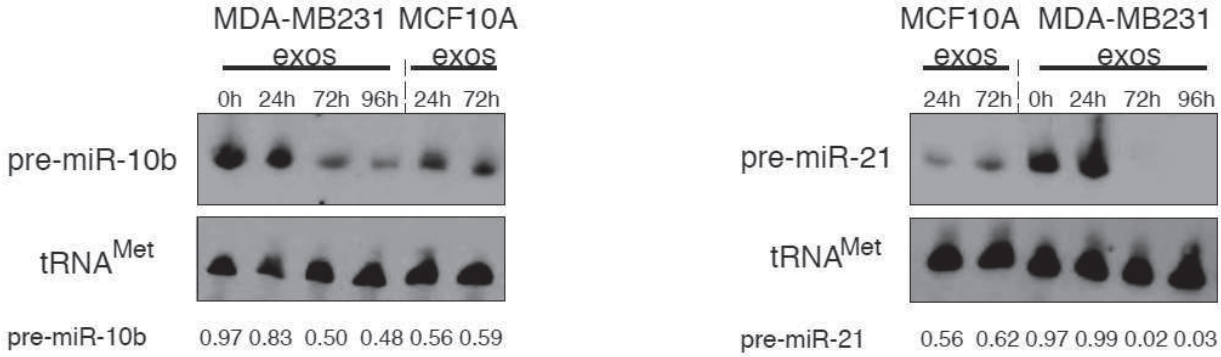

MDA-MB231
MCF10A
exos
exos
0h 24h 72h 96h 24h 72h
pre-miR-10b
tRNA^Met
pre-miR-10b 0.97 0.83 0.50 0.48 0.56 0.59
MCF10A
MDA-MB231
exos
exos
24h 72h 0h 24h 72h 96h
pre-miR-21
tRNA^Met
pre-miR-21 0.56 0.62 0.97 0.99 0.02 0.03

FIG. 3C

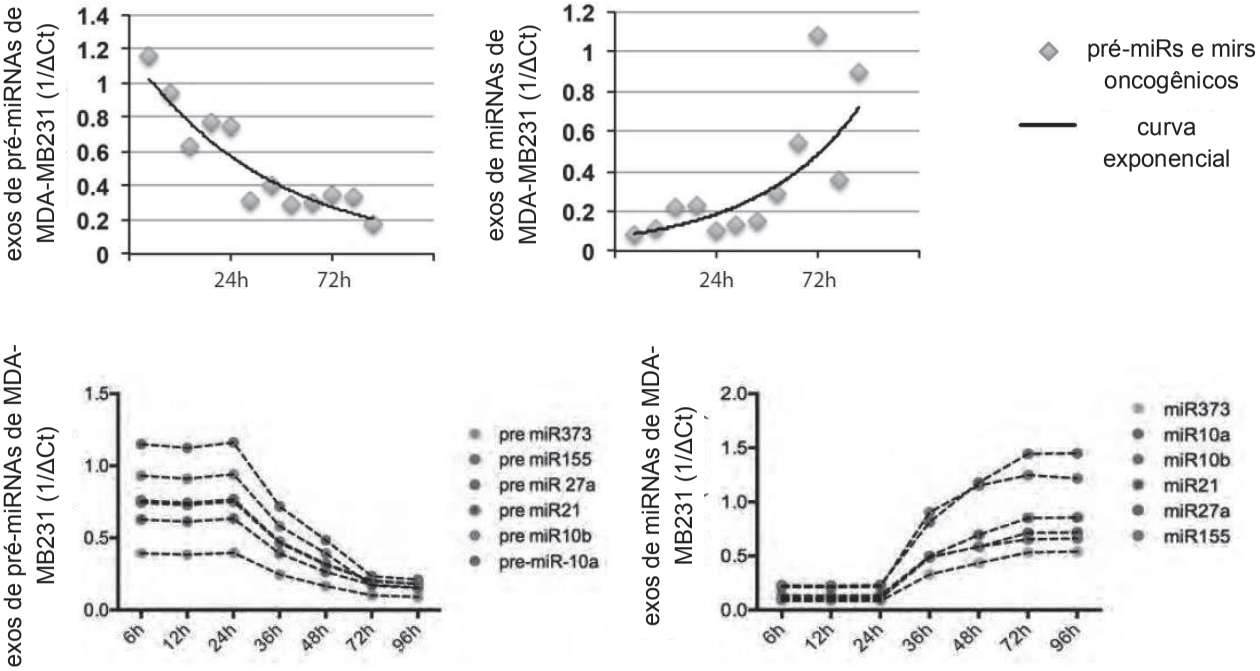

exos de pré-miRNAs de MDA-MB231 (1/ΔCt)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
24h
72h
exos de miRNAs de MDA-MB231 (1/ΔCt)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
24h
72h
pré-miRs e mirs oncogênicos
curva exponencial
exos de pré-miRNAs de MDA-MB231 (1/ΔCt)
1.5
1.0
0.5
0.0
6h
12h
24h
36h
48h
72h
96h
pre miR373
pre miR155
pre miR 27a
pre miR21
pre miR10b
pre-miR-10a
exos de miRNAs de MDA-MB231 (1/ΔCt)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
6h
12h
24h
36h
48h
72h
96h
miR373
miR10a
miR10b
miR21
miR27a
miR155

FIG. 3D

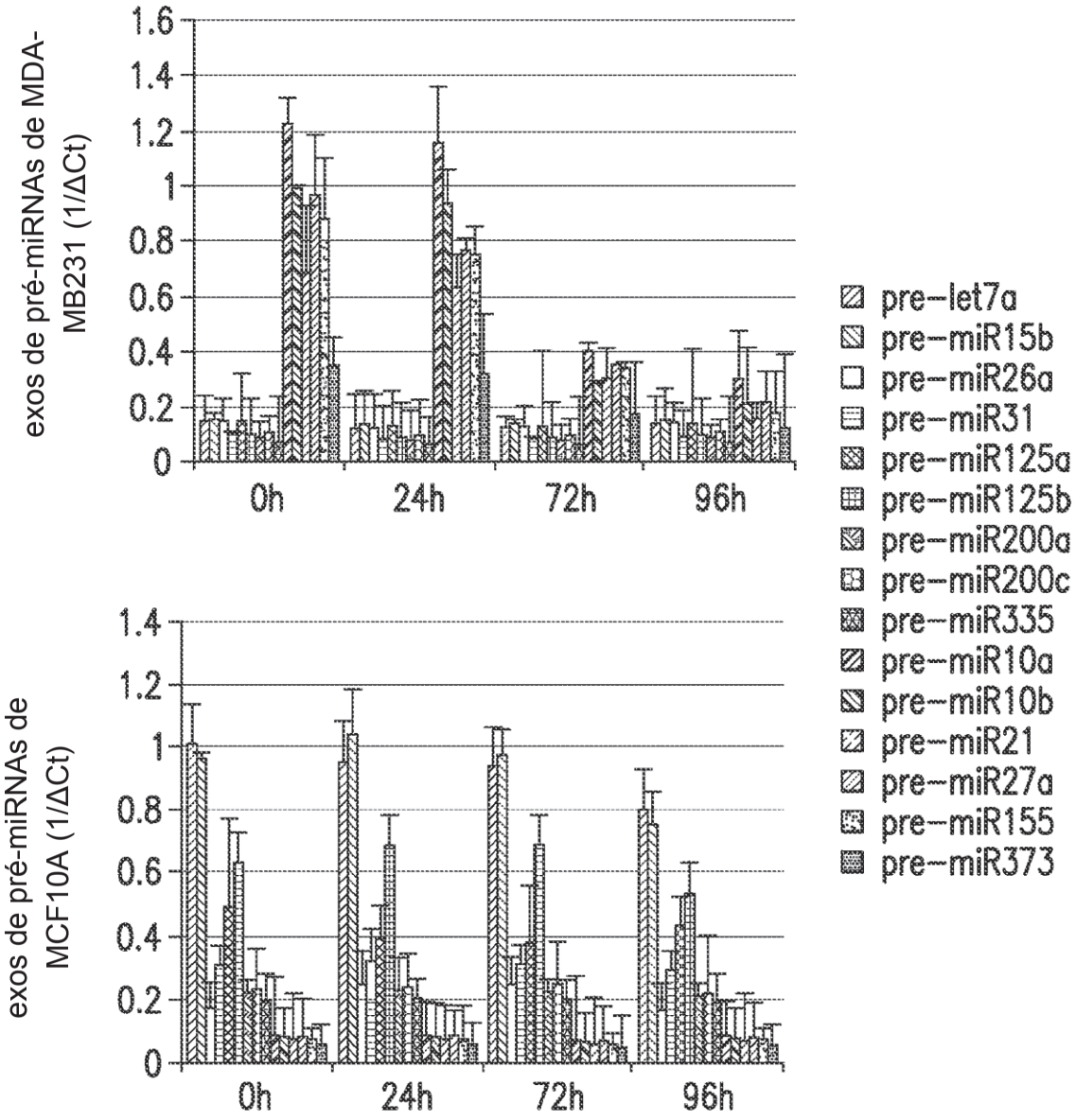

exos de pré-miRNAs de MDA-MB231 (1/ΔCt)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0h
24h
72h
96h
exos de pré-miRNAs de MCF10A (1/ΔCt)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0h
24h
72h
96h
pre-let7a
pre-miR15b
pre-miR26a
pre-miR31
pre-miR125a
pre-miR125b
pre-miR200a
pre-miR200c
pre-miR335
pre-miR10a
pre-miR10b
pre-miR21
pre-miR27a
pre-miR155
pre-miR373

FIG. 3E

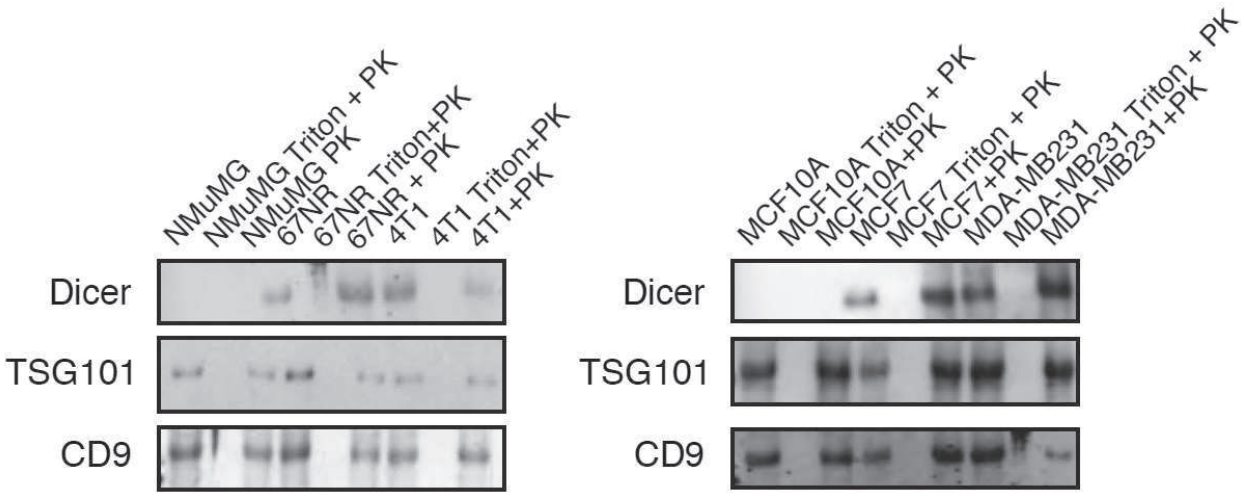

NMuMG
NMuMG Triton + PK
NMuMG PK
67NR
67NR Triton+PK
67NR + PK
4T1
4T1 Triton+PK
4T1+PK
Dicer
TSG101
CD9
MCF10A
MCF10A Triton + PK
MCF10A+PK
MCF7
MCF7 Triton + PK
MCF7+PK
MDA-MB231
MDA-MB231 Triton + PK
MDA-MB231+PK
Dicer
TSG101
CD9

FIG. 4A

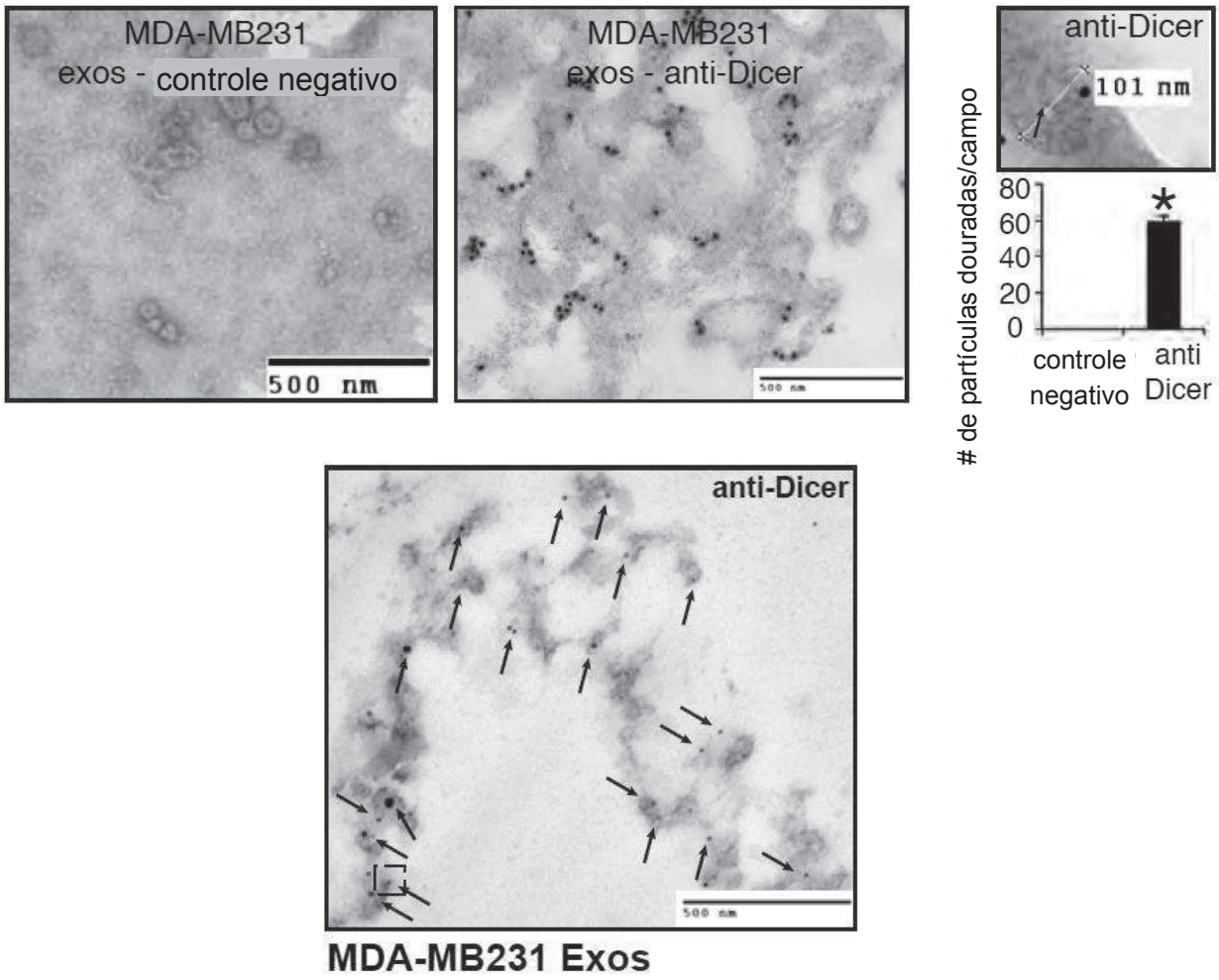

MDA-MB231
exos - controle negativo
500 nm
MDA-MB231
exos - anti-Dicer
anti-Dicer
101 nm
de partículas douradas/campo
80
60
40
20
0
*
controle negativo
anti Dicer
anti-Dicer
MDA-MB231 Exos

FIG. 4B

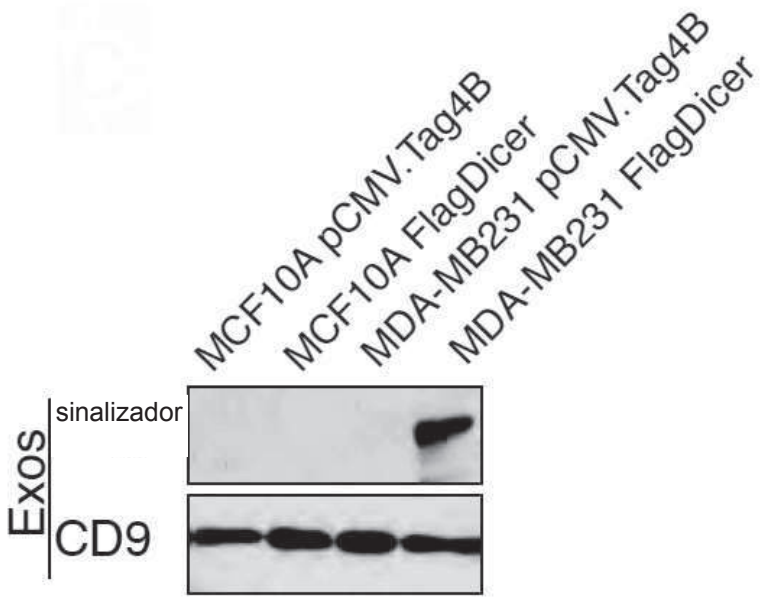

MCF10A pCMV.Tag4B
MCF10A FlagDicer
MDA-MB231 pCMV.Tag4B
MDA-MB231 FlagDicer
Exos
sinalizador
CD9

FIG. 4C

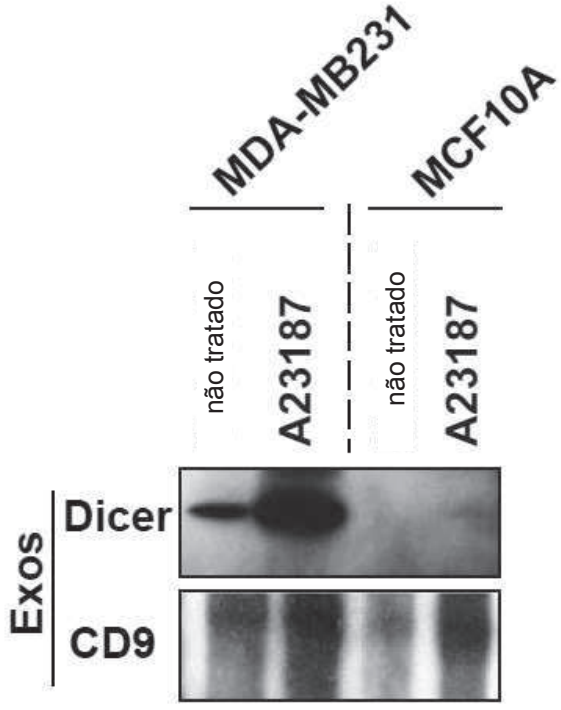

MDA-MB231
MCF10A
não tratado
A23187
não tratado
A23187
Exos
Dicer
CD9

FIG. 4D

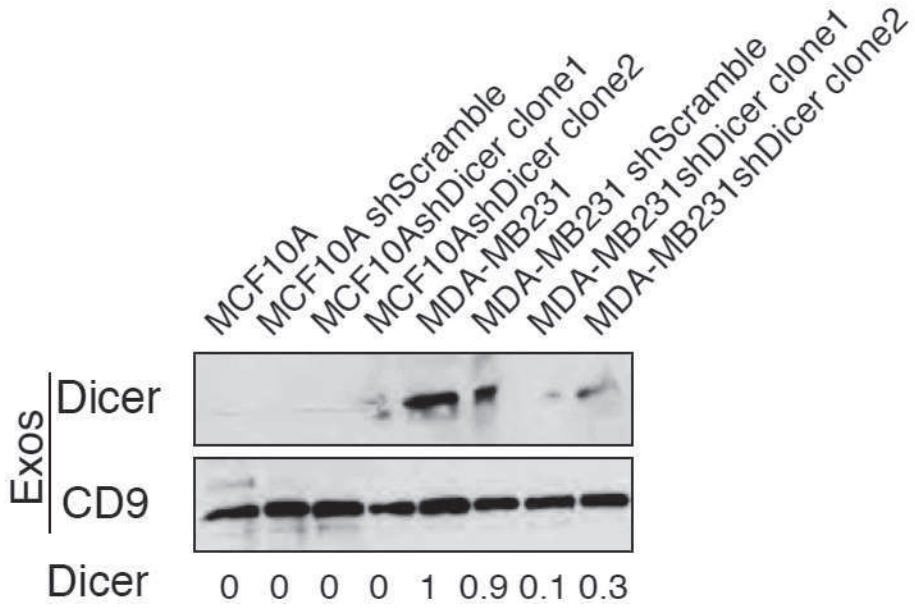

MCF10A
MCF10A shScramble
MCF10AshDicer clone1
MCF10AshDicer clone2
MDA-MB231
MDA-MB231 shScramble
MDA-MB231shDicer clone1
MDA-MB231shDicer clone2
Exos
Dicer
CD9
Dicer
0 0 0 0 1 0.9 0.1 0.3

FIG. 4E

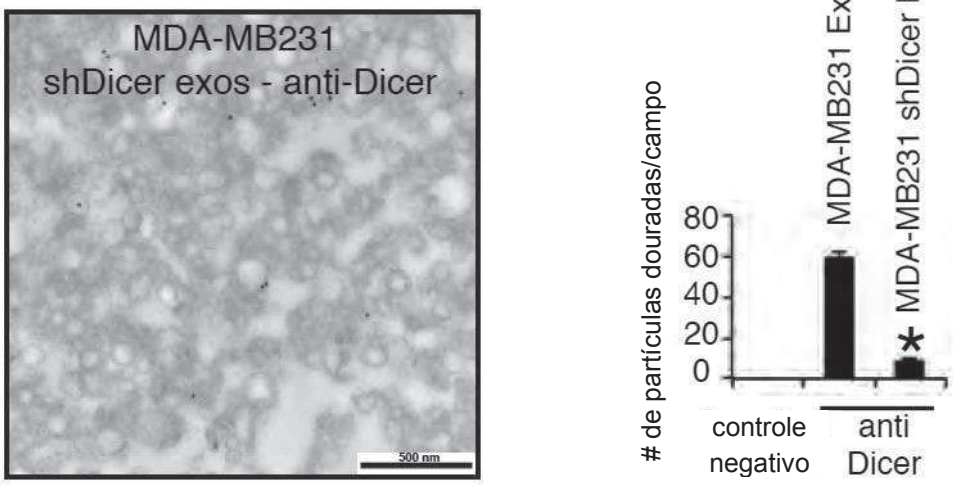

MDA-MB231
shDicer exos - anti-Dicer
500 nm
de partículas douradas/campo
80
60
40
20
0
MDA-MB231 Exos
MDA-MB231 shDicer Exos
*
controle negativo
anti Dicer

FIG. 4F

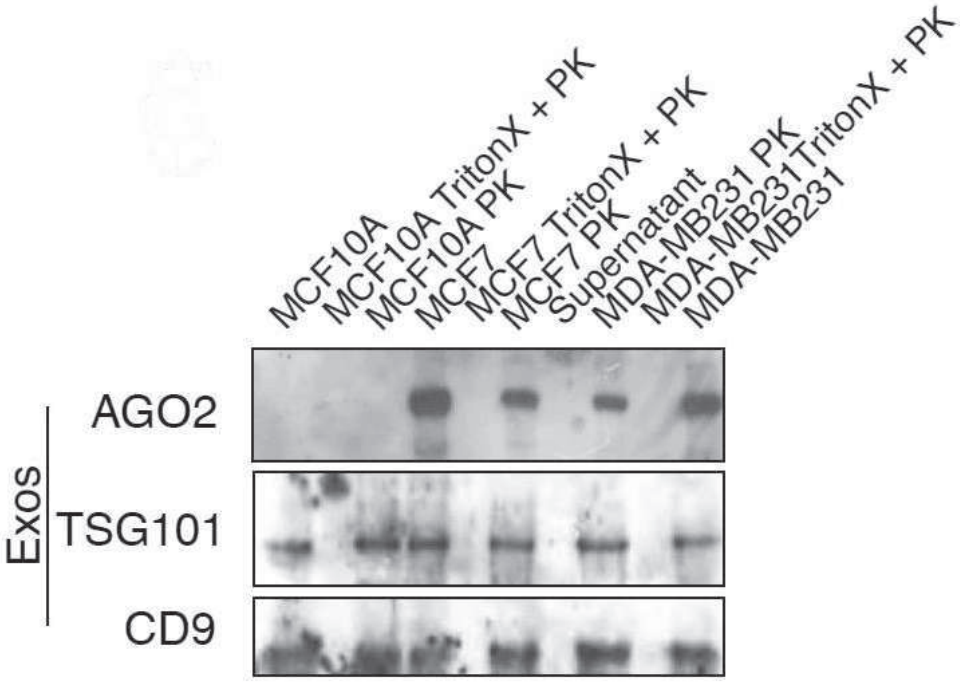

MCF10A
MCF10A TritonX + PK
MCF10A PK
MCF7
MCF7 TritonX + PK
MCF7 PK
Supernatant
MDA-MB231 PK
MDA-MB231TritonX + PK
MDA-MB231
AGO2
Exos
TSG101
CD9

FIG. 4G

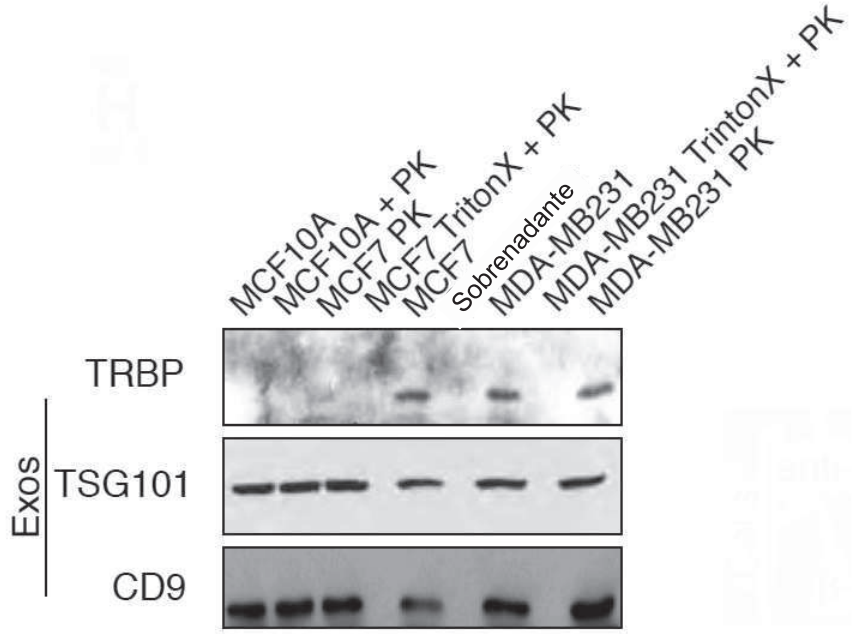

MCF10A
MCF10A + PK
MCF7 PK
MCF7 TritonX + PK
MCF7
Sobrenadante
MDA-MB231
MDA-MB231 TrintonX + PK
MDA-MB231 PK
TRBP
Exos
TSG101
CD9

FIG. 4H

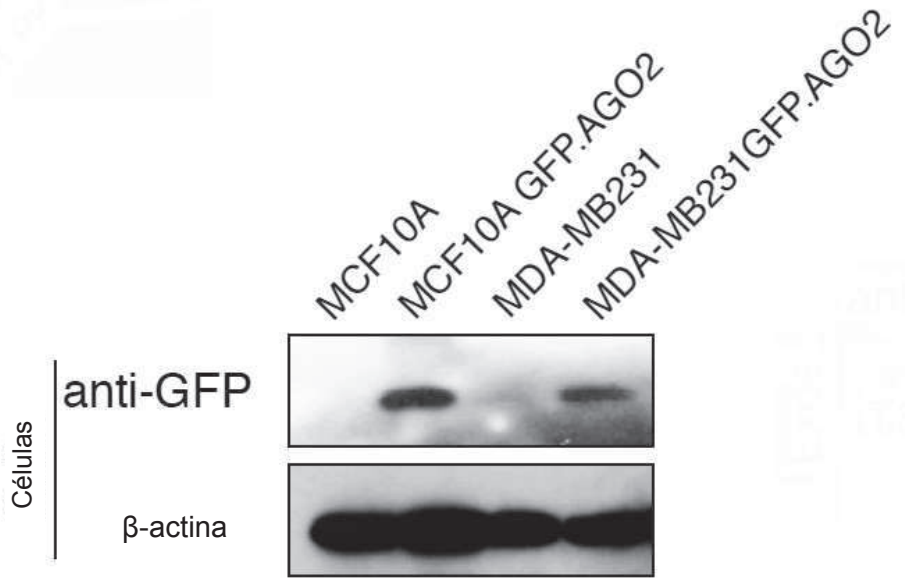

MCF10A
MCF10A GFP.AGO2
MDA-MB231
MDA-MB231GFP.AGO2
Células
anti-GFP
β-actina

FIG. 4I

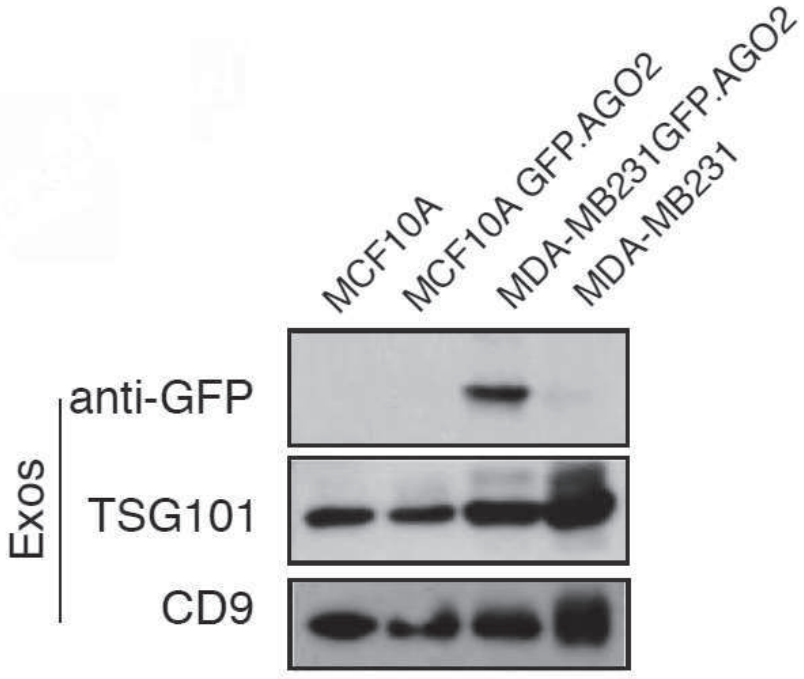

MCF10A
MCF10A GFP.AGO2
MDA-MB231GFP.AGO2
MDA-MB231
Exos
anti-GFP
TSG101
CD9

FIG. 4J

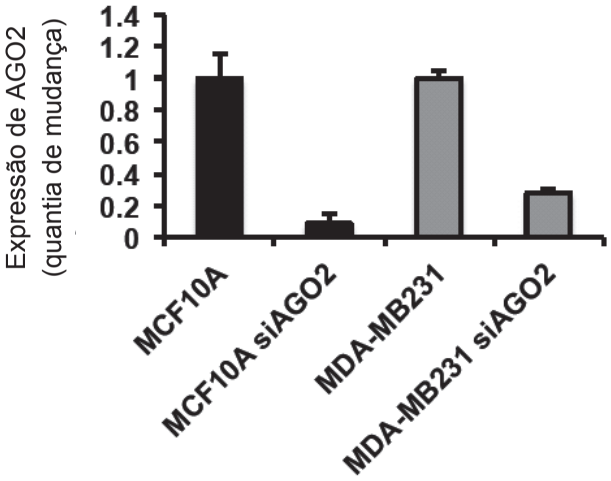

Expressão de AGO2
(quantia de mudança)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A siAGO2
MDA-MB231
MDA-MB231 siAGO2

FIG. 4K

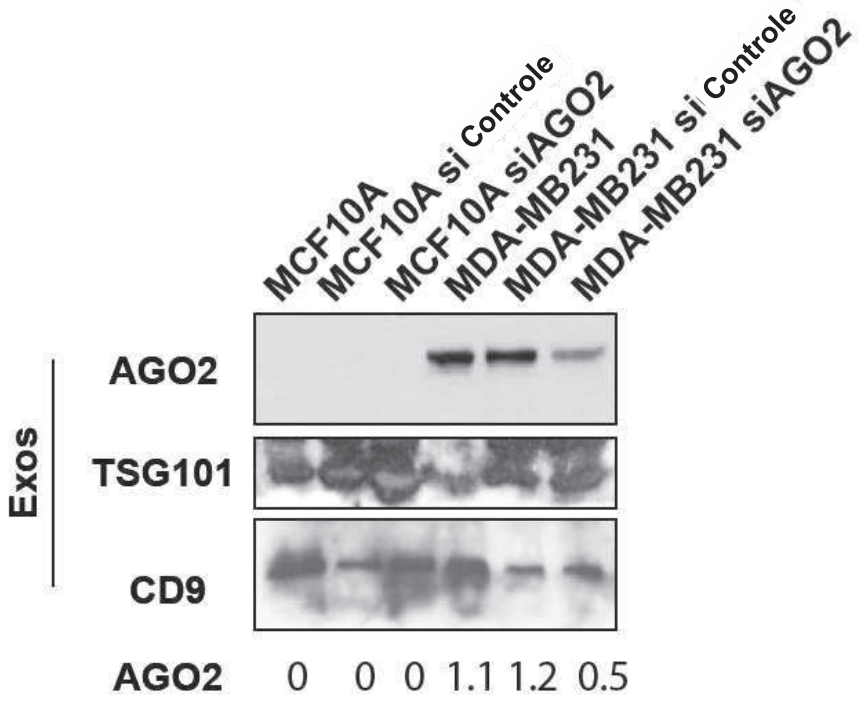

MCF10A
MCF10A si Controle
MCF10A siAGO2
MDA-MB231
MDA-MB231 si Controle
MDA-MB231 siAGO2
Exos
AGO2
TSG101
CD9
AGO2 0 0 0 1.1 1.2 0.5

FIG. 4L

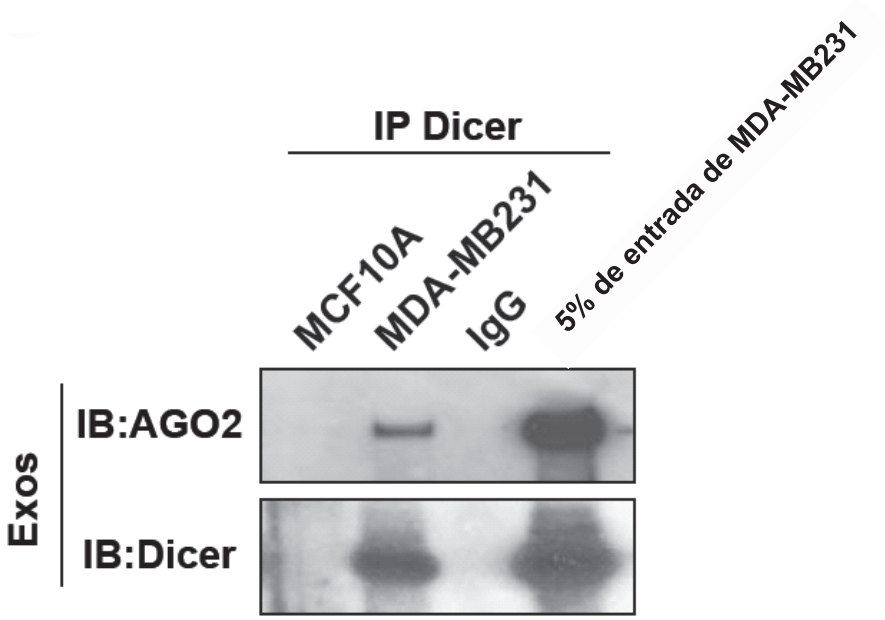

IP Dicer
MCF10A
MDA-MB231
IgG
5% de entrada de MDA-MB231
Exos
IB:AGO2
IB:Dicer

FIG. 4M

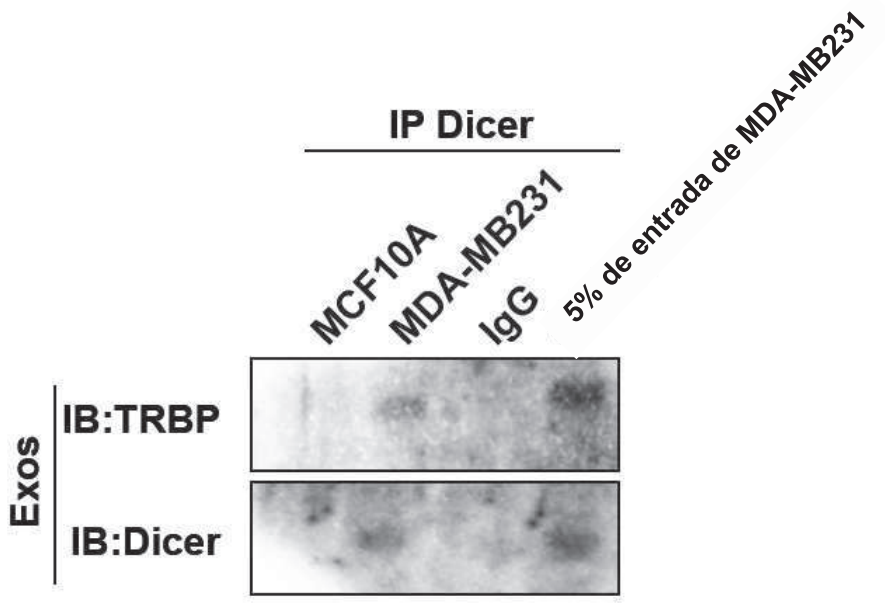

IP Dicer
MCF10A
MDA-MB231
IgG
5% de entrada de MDA-MB231
Exos
IB:TRBP
IB:Dicer

FIG. 4N

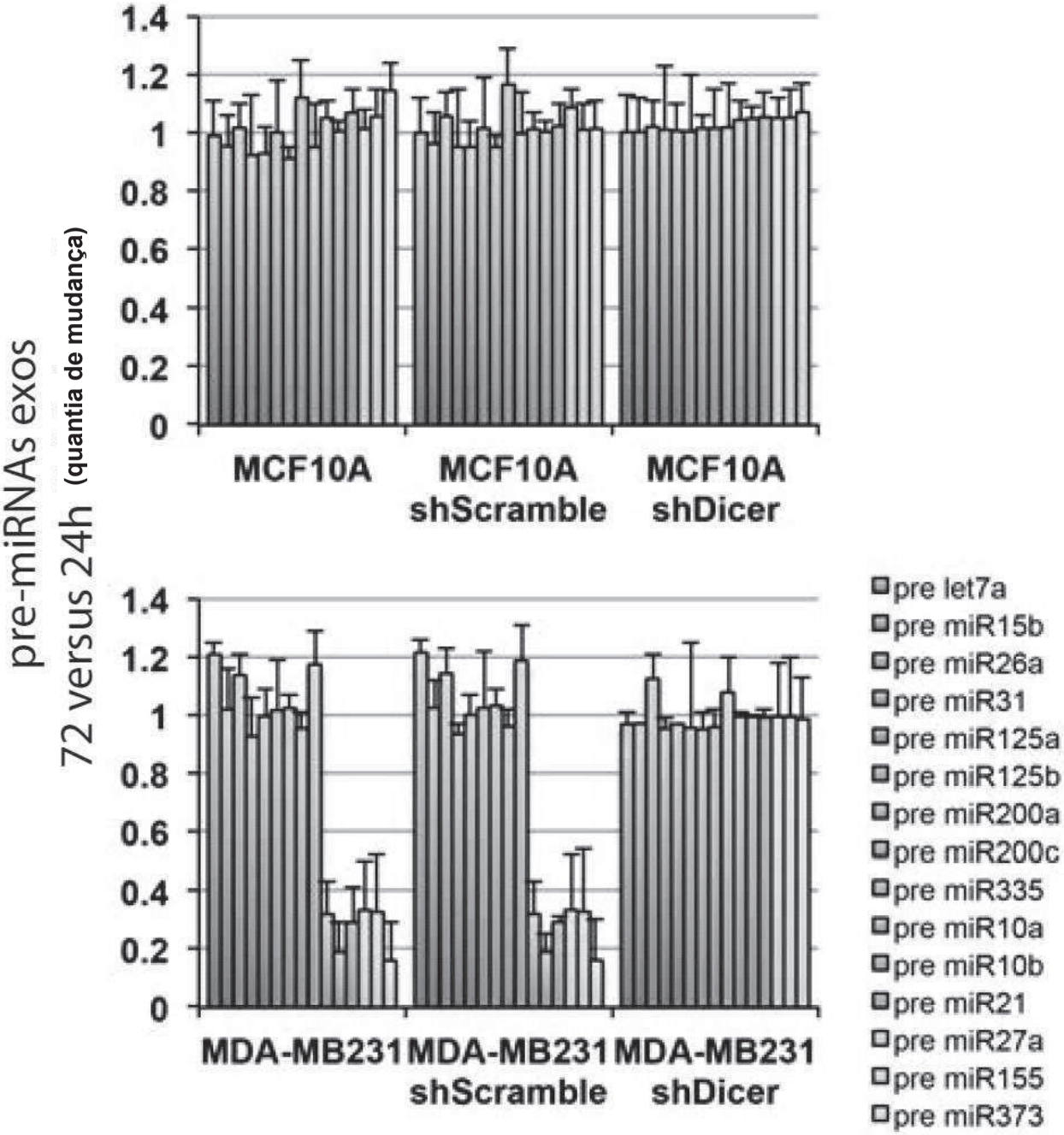

pre-miRNAs exos
72 versus 24h (quantia de mudança)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A shScramble
MCF10A shDicer
MDA-MB231
MDA-MB231 shScramble
MDA-MB231 shDicer
pre let7a
pre miR15b
pre miR26a
pre miR31
pre miR125a
pre miR125b
pre miR200a
pre miR200c
pre miR335
pre miR10a
pre miR10b
pre miR21
pre miR27a
pre miR155
pre miR373

FIG. 5A

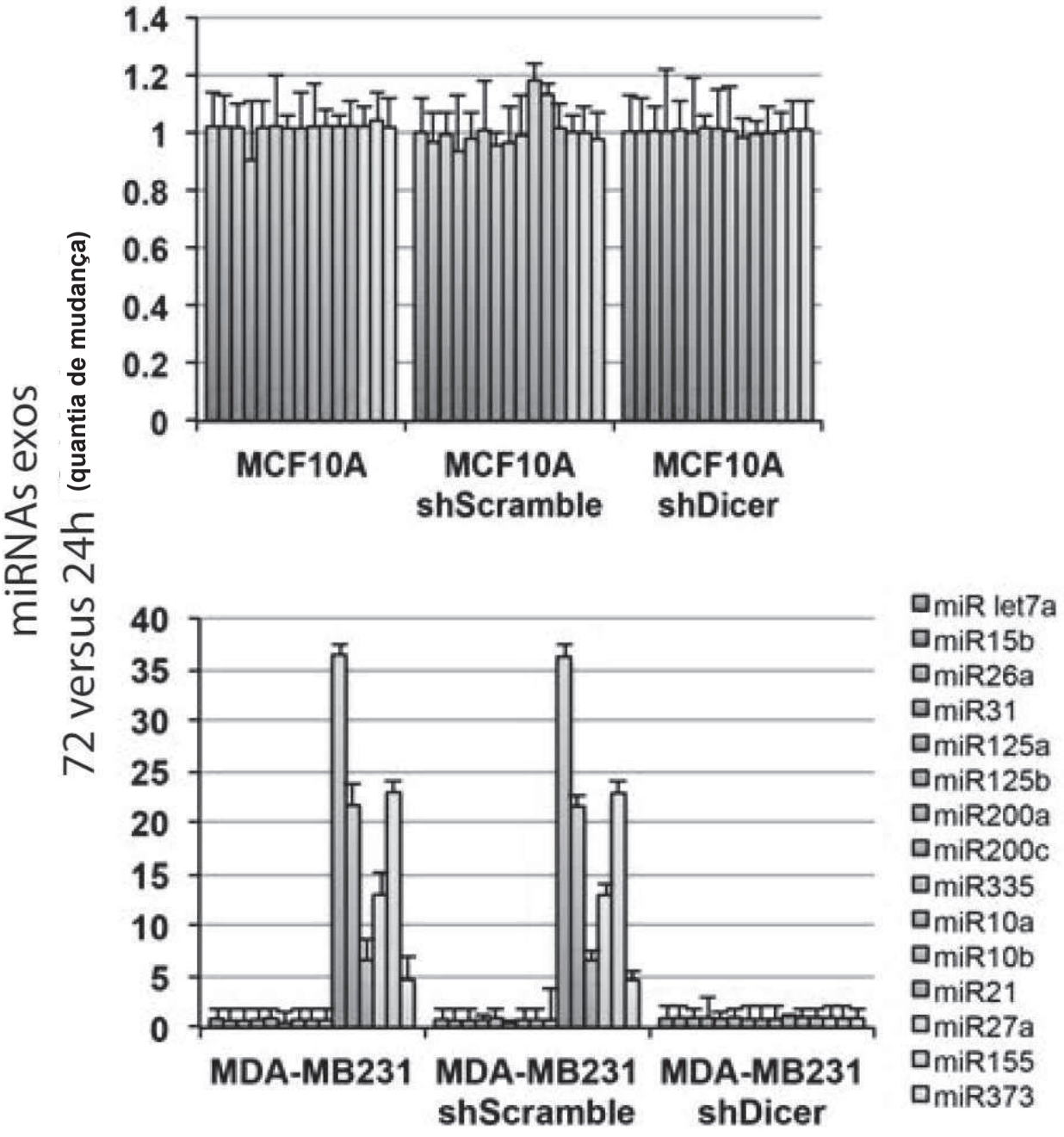

miRNAs exos
72 versus 24h (quantia de mudança)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A shScramble
MCF10A shDicer
40
35
30
25
20
15
10
5
0
MDA-MB231
MDA-MB231 shScramble
MDA-MB231 shDicer
miR let7a
miR15b
miR26a
miR31
miR125a
miR125b
miR200a
miR200c
miR335
miR10a
miR10b
miR21
miR27a
miR155
miR373

FIG. 5B

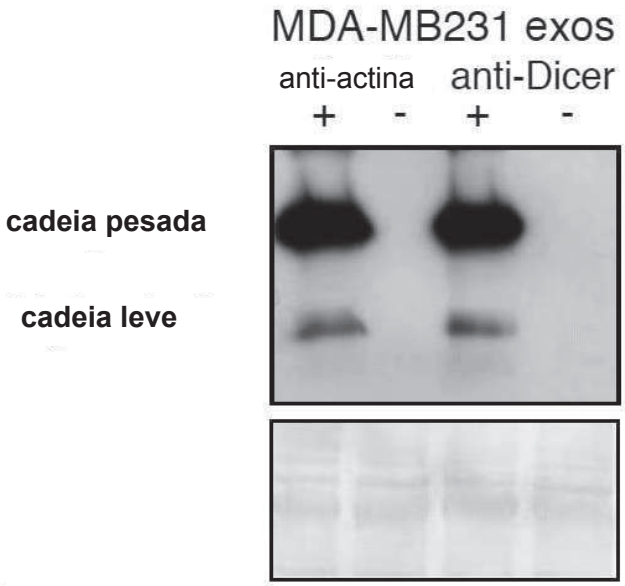

MDA-MB231 exos
anti-actina
anti-Dicer
+
-
+
-
cadeia pesada
cadeia leve

FIG. 5C

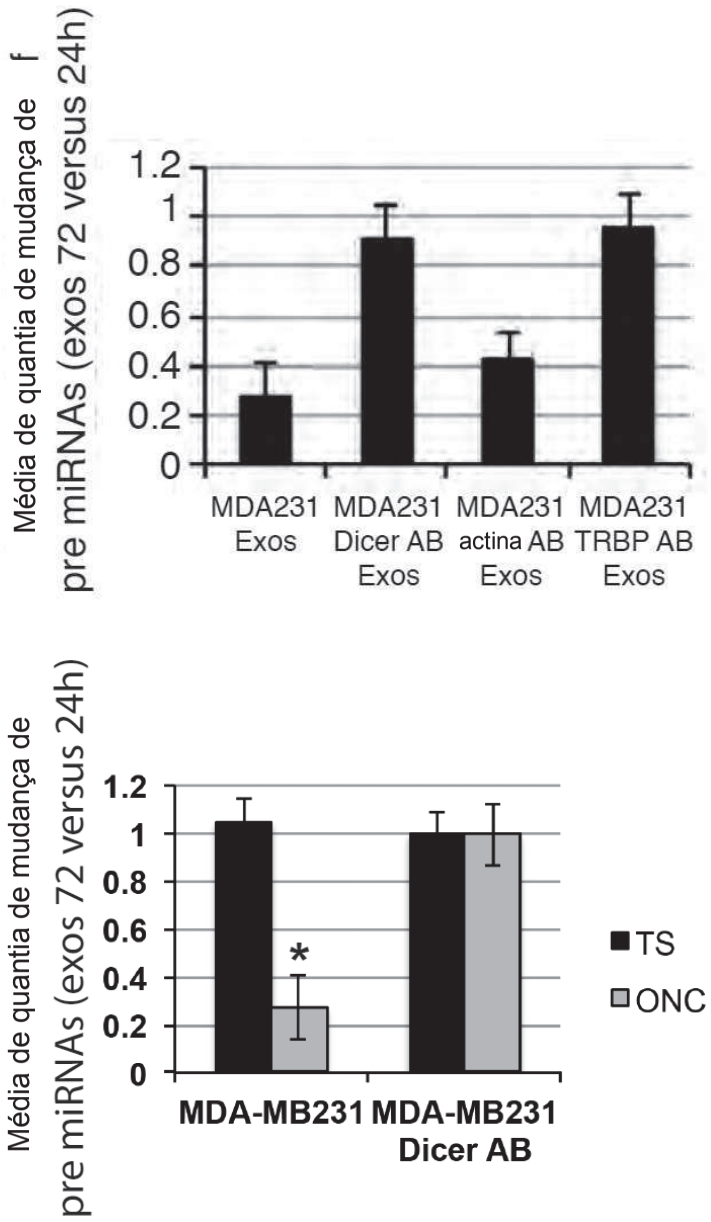

Média de quantia de mudança de f
pre miRNAs (exos 72 versus 24h)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MDA231 Exos
MDA231 Dicer AB Exos
MDA231 actina AB Exos
MDA231 TRBP AB Exos
Média de quantia de mudança de
pre miRNAs (exos 72 versus 24h)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
MDA-MB231
MDA-MB231 Dicer AB
TS
ONC

FIG. 5D

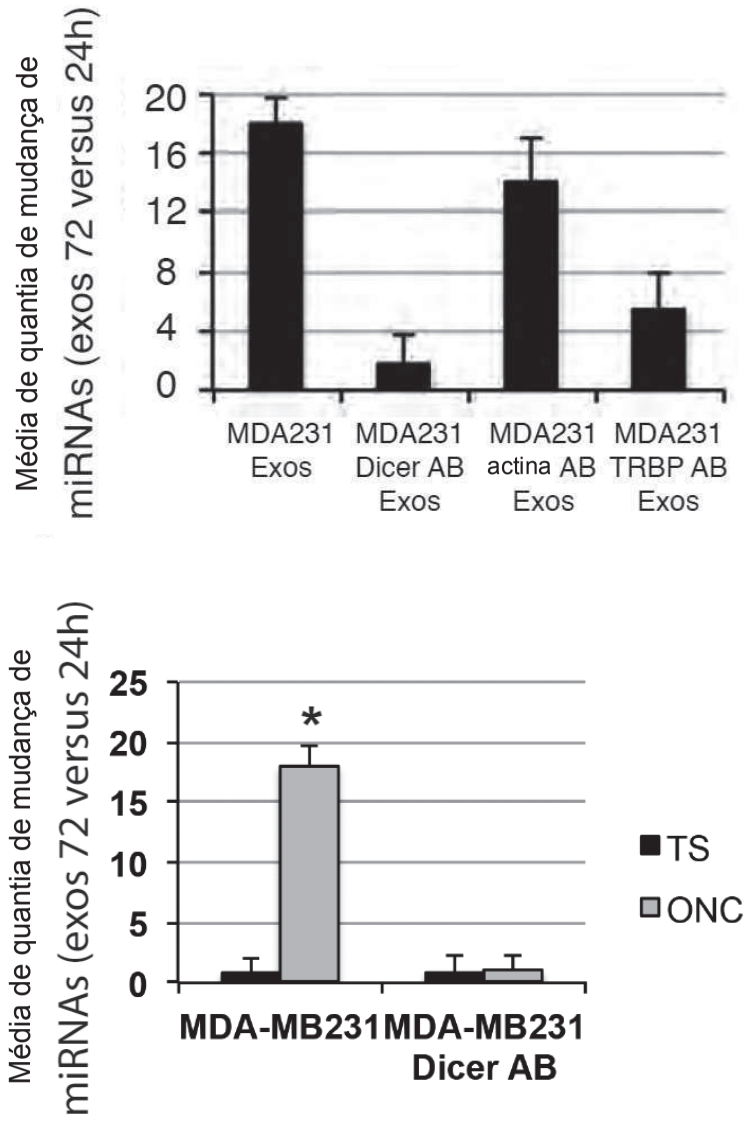

Média de quantia de mudança de miRNAs (exos 72 versus 24h)
20
16
12
8
4
0
MDA231 Exos
MDA231 Dicer AB Exos
MDA231 actina AB Exos
MDA231 TRBP AB Exos
Média de quantia de mudança de miRNAs (exos 72 versus 24h)
25
20
15
10
5
0
*
TS
ONC
MDA-MB231
MDA-MB231 Dicer AB

FIG. 5E

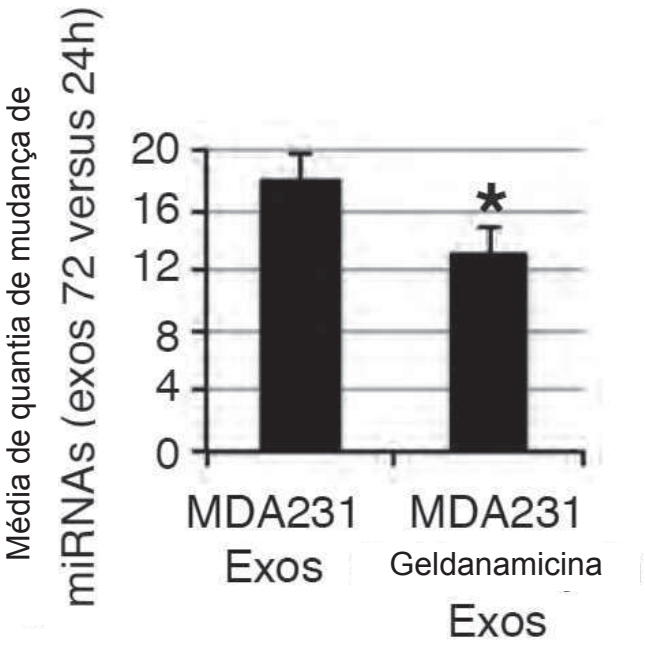

Média de quantia de mudança de miRNAs (exos 72 versus 24h)
20
16
12
8
4
0
*
MDA231 Exos
MDA231 Geldanamicina Exos

FIG. 6A

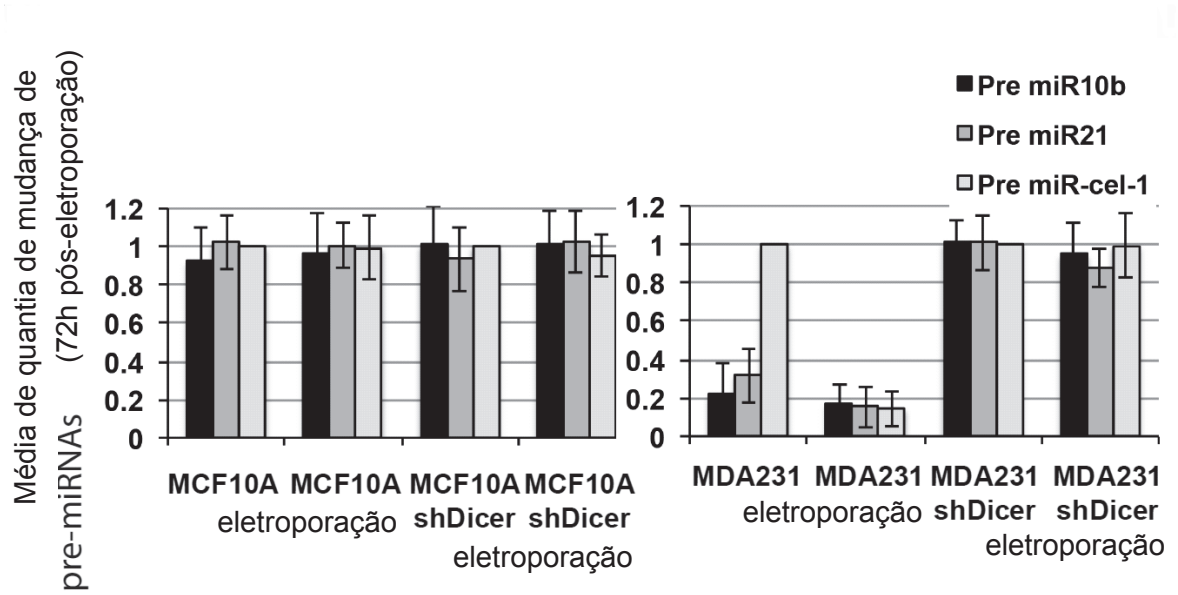

Média de quantia de mudança de pre-miRNAs (72h pós-eletroporação)
Pre miR10b
Pre miR21
Pre miR-cel-1
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A eletroporação
MCF10A shDicer eletroporação
MDA231 eletroporação
MDA231 shDicer eletroporação

FIG. 6B

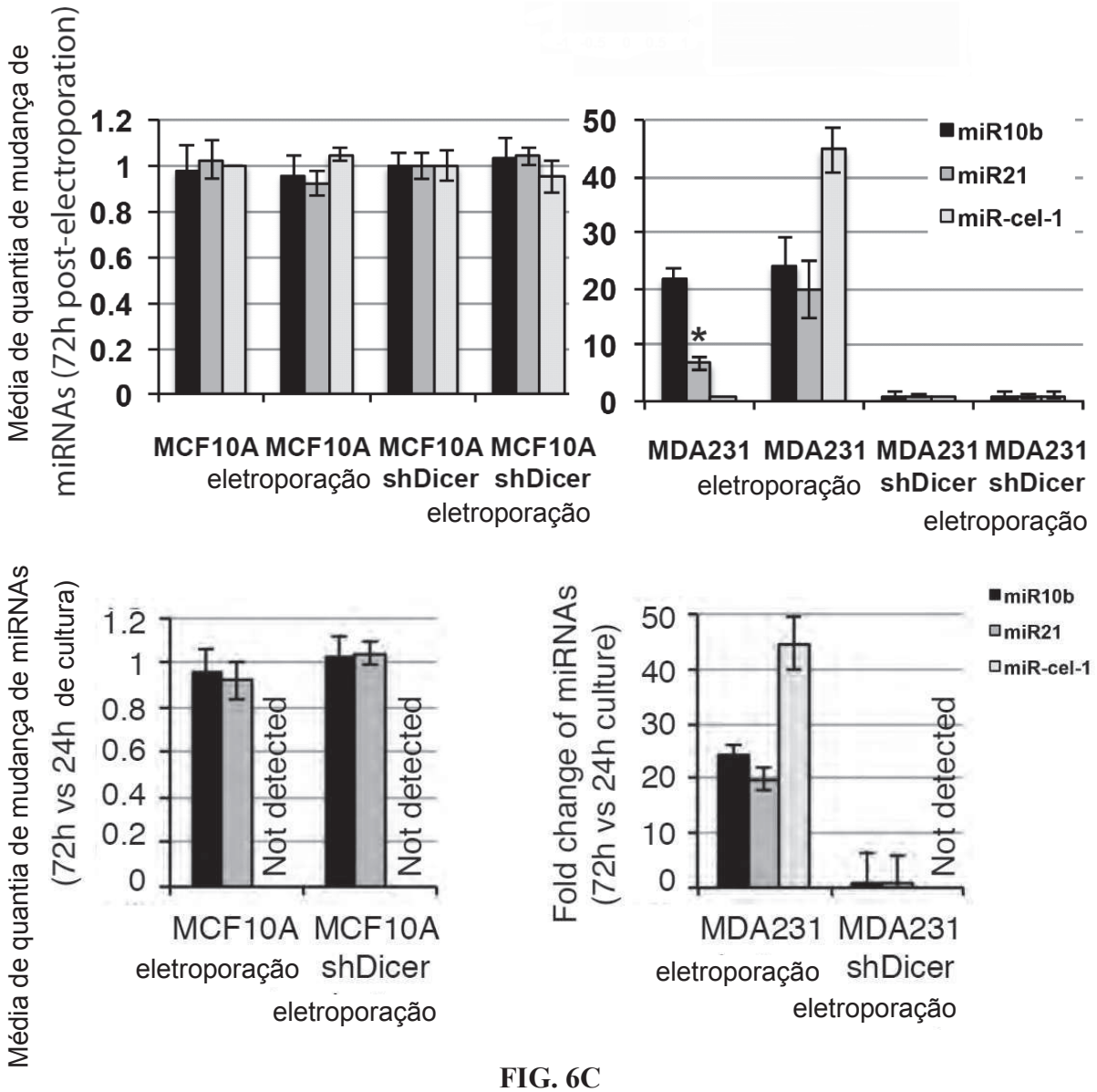

Média de quantia de mudança de miRNAs (72h post-electroporation)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
50
40
30
20
10
0
miR10b
miR21
miR-cel-1
*
MCF10A MCF10A MCF10A MCF10A
eletroporação shDicer shDicer
eletroporação
MDA231 MDA231 MDA231 MDA231
eletroporação shDicer shDicer
eletroporação
Média de quantia de mudança de miRNAs (72h vs 24h de cultura)
Not detected
Not detected
MCF10A MCF10A
eletroporação shDicer
eletroporação
Fold change of miRNAs (72h vs 24h culture)
Not detected
MDA231 MDA231
eletroporação shDicer
eletroporação

FIG. 6C

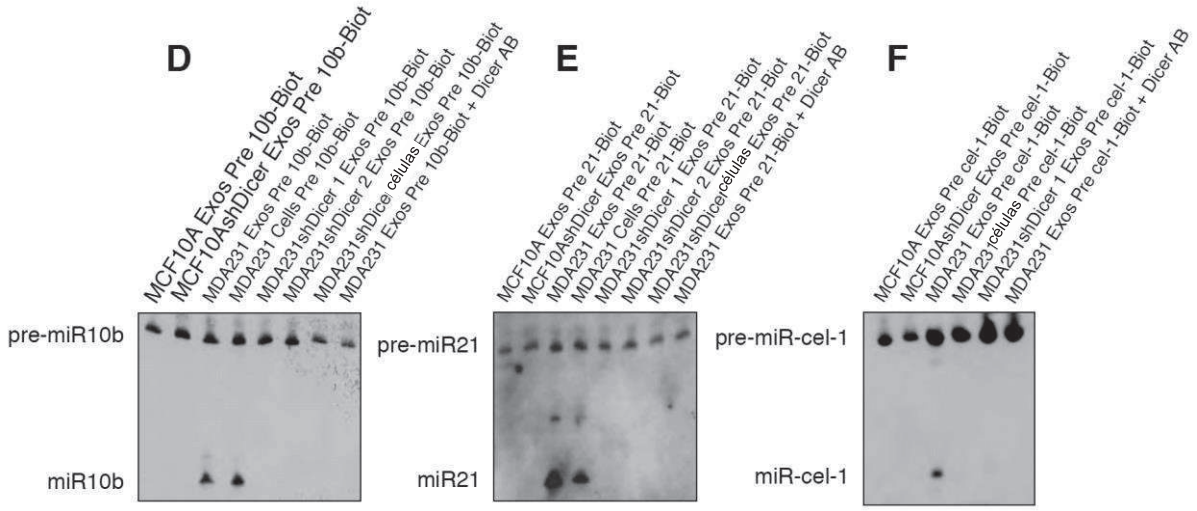

D
MCF10A Exos Pre 10b-Biot
MCF10AshDicer Exos Pre 10b-Biot
MDA231 Exos Pre 10b-Biot
MDA231 Cells Pre 10b-Biot
MDA231shDicer 1 Exos Pre 10b-Biot
MDA231shDicer 2 Exos Pre 10b-Biot
MDA231shDice células Exos Pre 10b-Biot
MDA231 Exos Pre 10b-Biot + Dicer AB
pre-miR10b
miR10b
E
MCF10A Exos Pre 21-Biot
MCF10AshDicer Exos Pre 21-Biot
MDA231 Exos Pre 21-Biot
MDA231 Cells Pre 21-Biot
MDA231shDicer 1 Exos Pre 21-Biot
MDA231shDicer 2 Exos Pre 21-Biot
MDA231shDicercélulas Exos Pre 21-Biot
MDA231 Exos Pre 21-Biot + Dicer AB
pre-miR21
miR21
F
MCF10A Exos Pre cel-1-Biot
MCF10AshDicer Exos Pre cel-1-Biot
MDA231 Exos Pre cel-1-Biot
MDA231células Pre cel-1-Biot
MDA231shDicer 1 Exos Pre cel-1-Biot
MDA231 Exos Pre cel-1-Biot + Dicer AB
pre-miR-cel-1
miR-cel-1

FIG. 6D-F

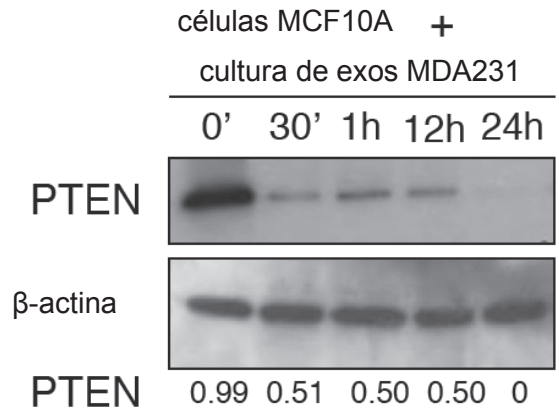

células MCF10A +
cultura de exos MDA231
0' 30' 1h 12h 24h
PTEN
β-actina
PTEN
0.99 0.51 0.50 0.50 0

FIG. 7A

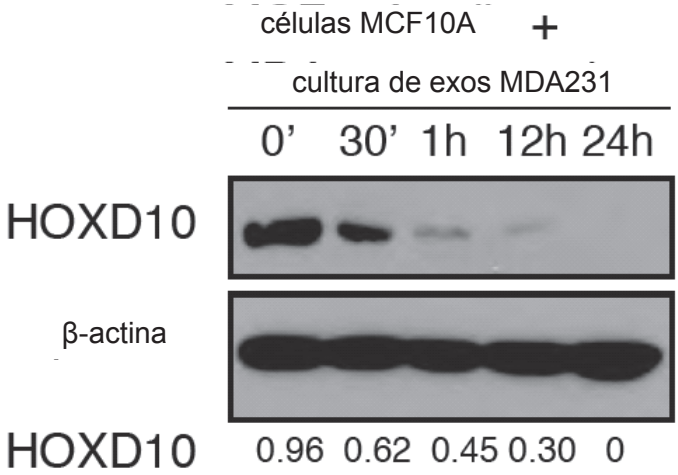

células MCF10A +
cultura de exos MDA231
0' 30' 1h 12h 24h
HOXD10
β-actina
HOXD10
0.96 0.62 0.45 0.30 0

FIG. 7B

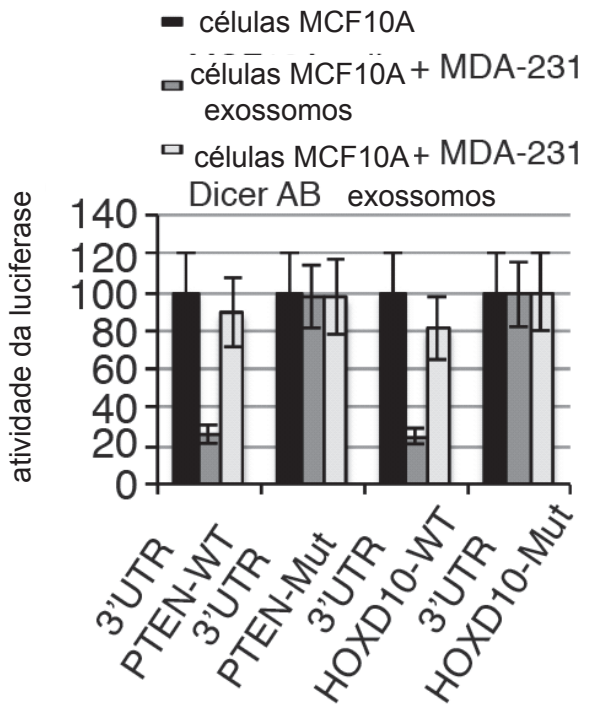

células MCF10A
células MCF10A + MDA-231 exossomos
células MCF10A + MDA-231 Dicer AB exossomos
atividade da luciferase
140
120
100
80
60
40
20
0
3'UTR
PTEN-WT
3'UTR
PTEN-Mut
3'UTR
HOXD10-WT
3'UTR
HOXD10-Mut

FIG. 7C

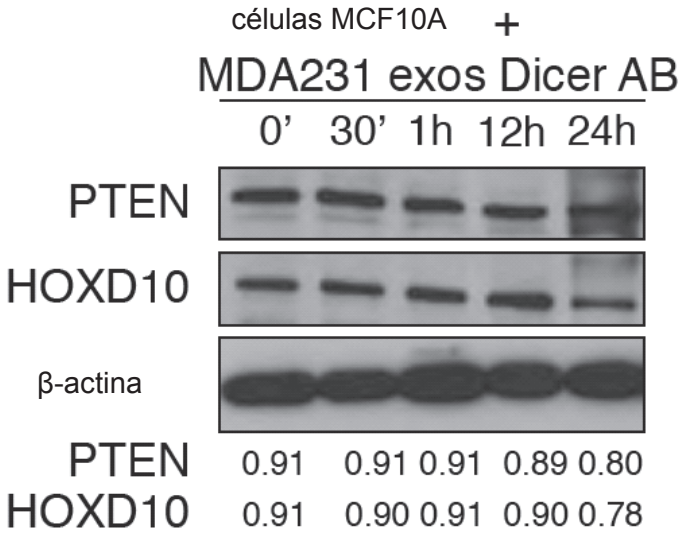

células MCF10A +
MDA231 exos Dicer AB
0' 30' 1h 12h 24h
PTEN
HOXD10
β-actina
PTEN 0.91 0.91 0.91 0.89 0.80
HOXD10 0.91 0.90 0.91 0.90 0.78

FIG. 7D

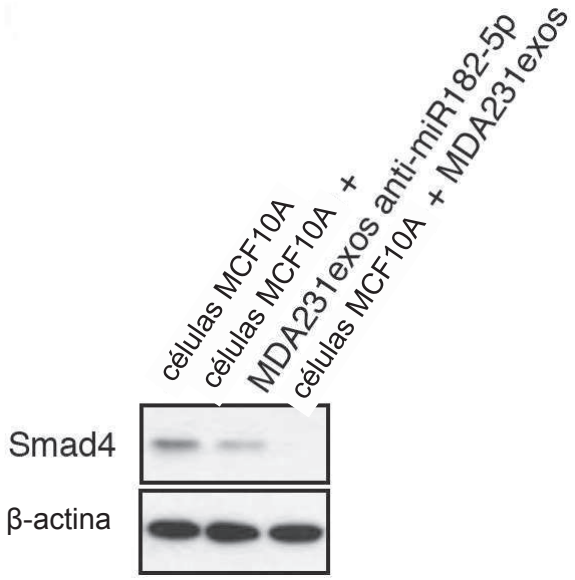

células MCF10A
células MCF10A +
MDA231exos anti-miR182-5p
células MCF10A + MDA231exos
Smad4
β-actina

FIG. 7E

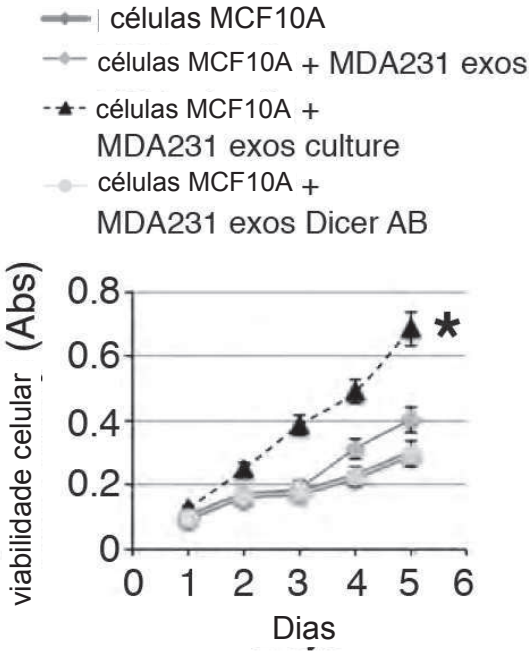

células MCF10A
células MCF10A + MDA231 exos
células MCF10A +
MDA231 exos culture
células MCF10A +
MDA231 exos Dicer AB
viabilidade celular (Abs)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 1 2 3 4 5 6
Dias
*

FIG. 7F

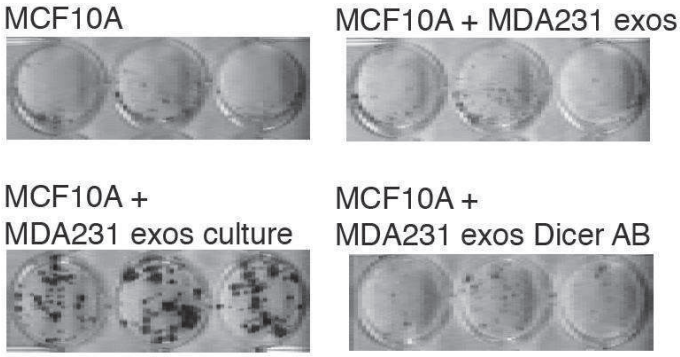

MCF10A
MCF10A + MDA231 exos
MCF10A +
MDA231 exos culture
MCF10A +
MDA231 exos Dicer AB

FIG. 7G

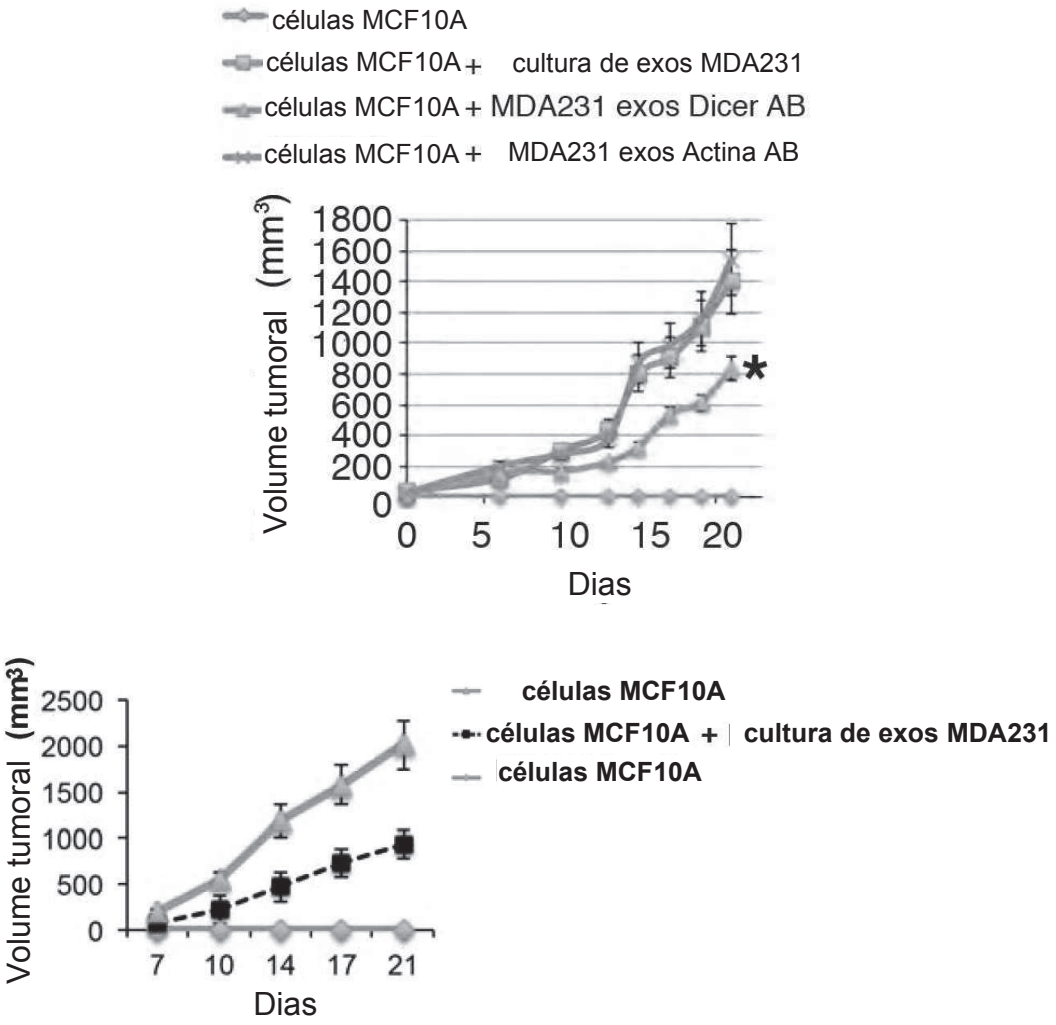

células MCF10A
células MCF10A + cultura de exos MDA231
células MCF10A + MDA231 exos Dicer AB
células MCF10A + MDA231 exos Actina AB
Volume tumoral (mm3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20
Dias
*
Volume tumoral (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
7 10 14 17 21
Dias
células MCF10A
células MCF10A + cultura de exos MDA231
células MCF10A

FIG. 7H

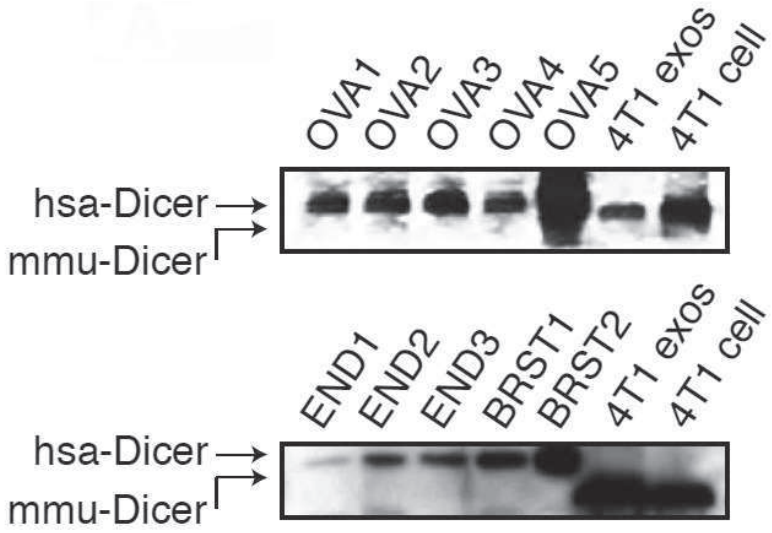

OVA1
OVA2
OVA3
OVA4
OVA5
4T1 exos
4T1 cell
hsa-Dicer
mmu-Dicer
END1
END2
END3
BRST1
BRST2
4T1 exos
4T1 cell
hsa-Dicer
mmu-Dicer

FIG. 8A

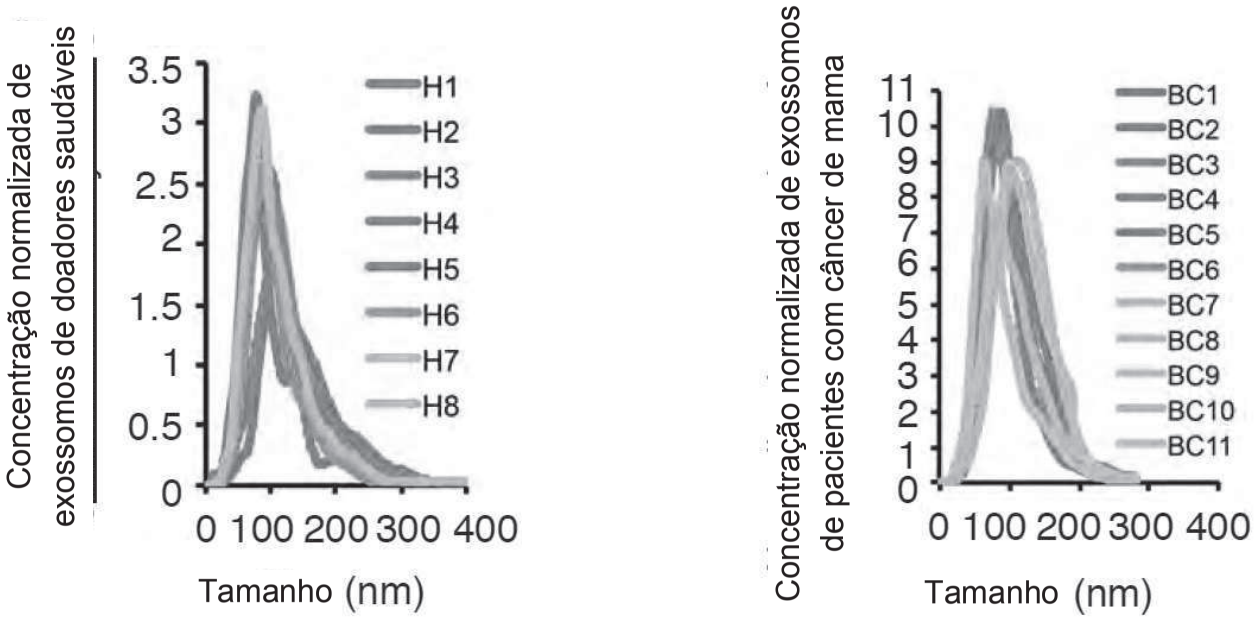

Concentração normalizada de exossomos de doadores saudáveis
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0 100 200 300 400
Tamanho (nm)
H1
H2
H3
H4
H5
H6
H7
H8
Concentração normalizada de exossomos de pacientes com câncer de mama
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0 100 200 300 400
Tamanho (nm)
BC1
BC2
BC3
BC4
BC5
BC6
BC7
BC8
BC9
BC10
BC11

FIG. 8B

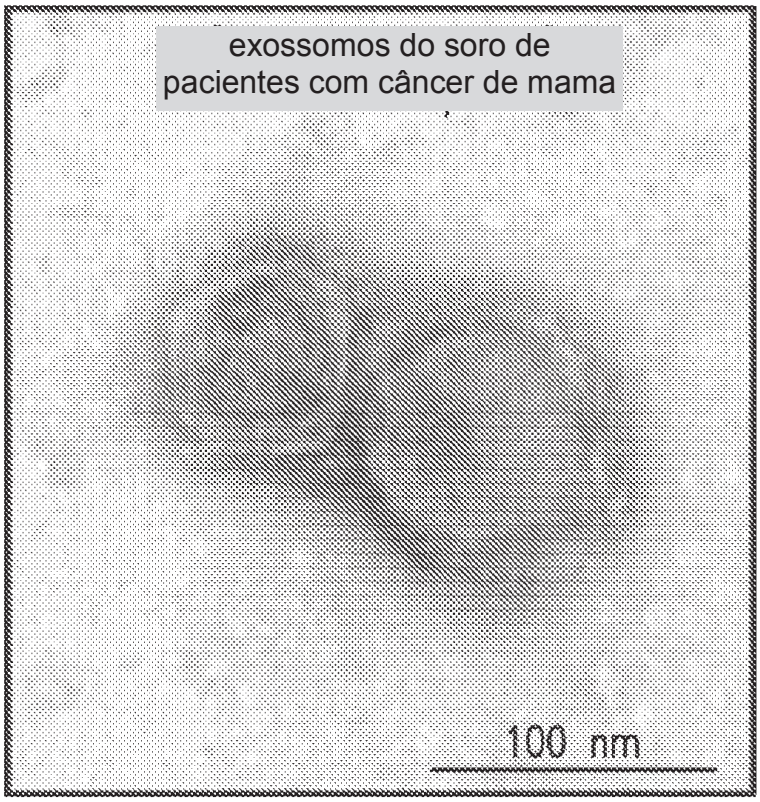


FIG. 8C

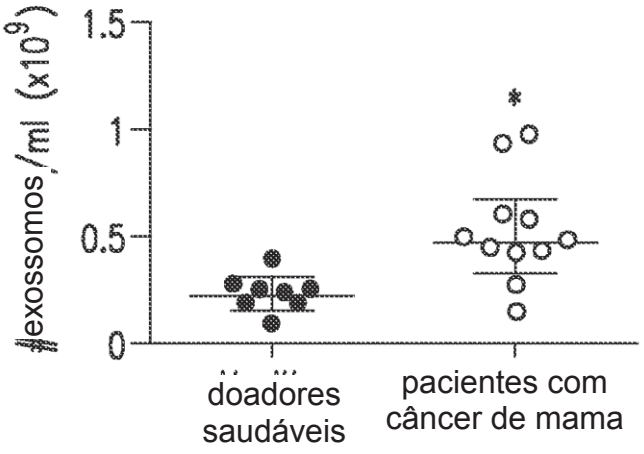

#exossomos/ml (x10^9)
1.5
1
0.5
0
*
doadores saudáveis
pacientes com câncer de mama

FIG.8D

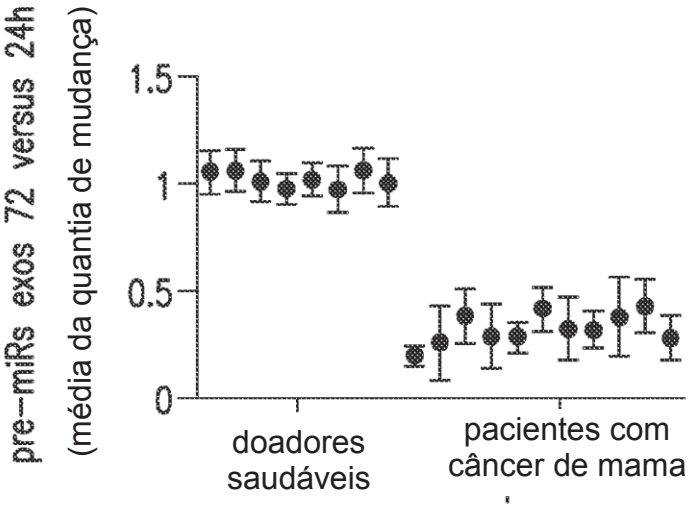

pre-miRs exos 72 versus 24h
(média da quantia de mudança)
1.5
1
0.5
0
doadores saudáveis
pacientes com câncer de mama

FIG.8E

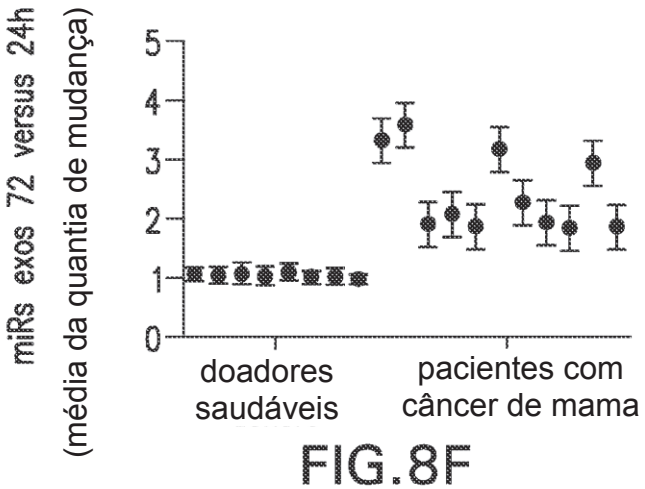
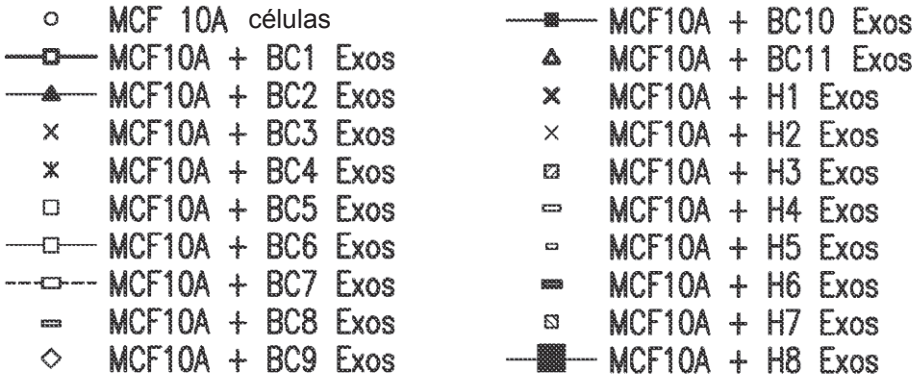

miRs exos 72 versus 24h
(média da quantia de mudança)
5
4
3
2
1
0
doadores saudáveis
pacientes com câncer de mama

FIG.8F


MCF 10A células
MCF10A + BC1 Exos
MCF10A + BC2 Exos
MCF10A + BC3 Exos
MCF10A + BC4 Exos
MCF10A + BC5 Exos
MCF10A + BC6 Exos
MCF10A + BC7 Exos
MCF10A + BC8 Exos
MCF10A + BC9 Exos
MCF10A + BC10 Exos
MCF10A + BC11 Exos
MCF10A + H1 Exos
MCF10A + H2 Exos
MCF10A + H3 Exos
MCF10A + H4 Exos
MCF10A + H5 Exos
MCF10A + H6 Exos
MCF10A + H7 Exos
MCF10A + H8 Exos

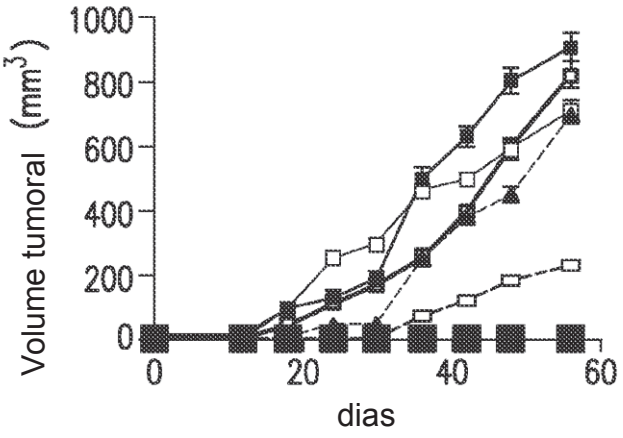

Volume tumoral (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
dias

FIG.8G

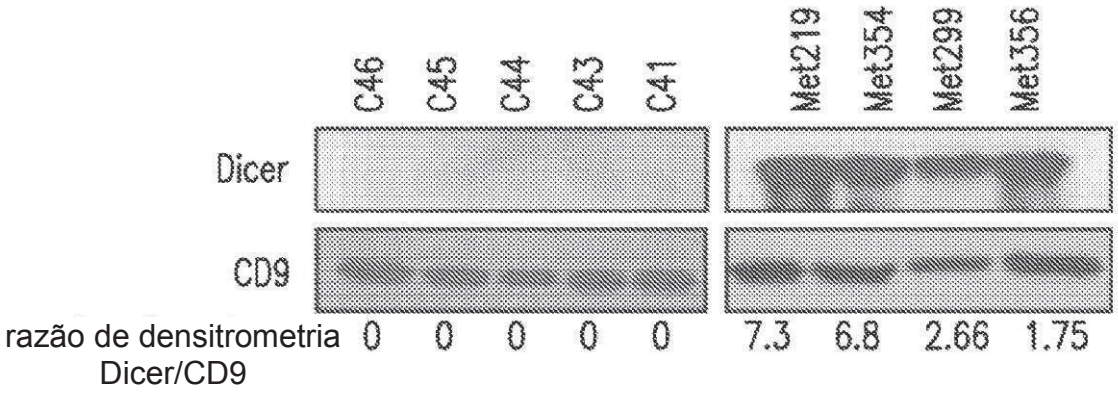

C46
C45
C44
C43
C41
Met219
Met354
Met299
Met356
Dicer
CD9
razão de densitrometria Dicer/CD9
0 0 0 0 0
7.3 6.8 2.66 1.75

FIG.8H

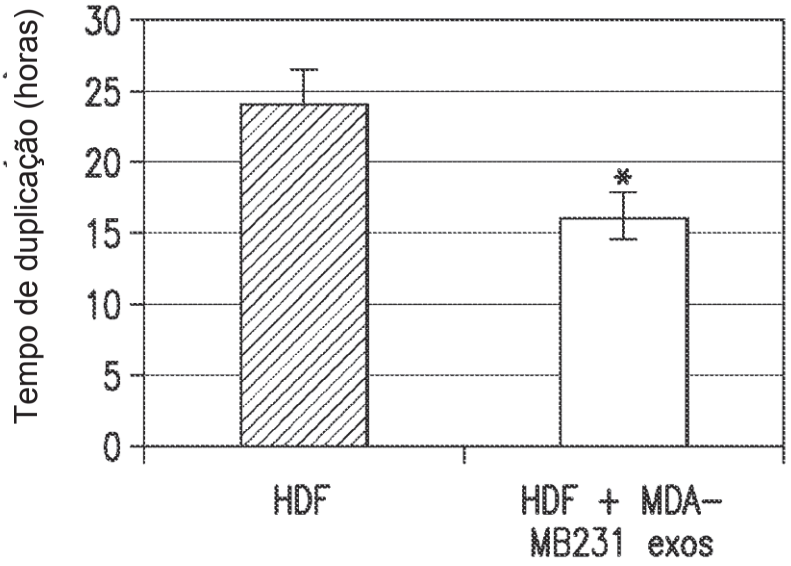

Tempo de duplicação (horas)
30
25
20
15
10
5
0
*
HDF
HDF + MDA-MB231 exos

FIG.8I

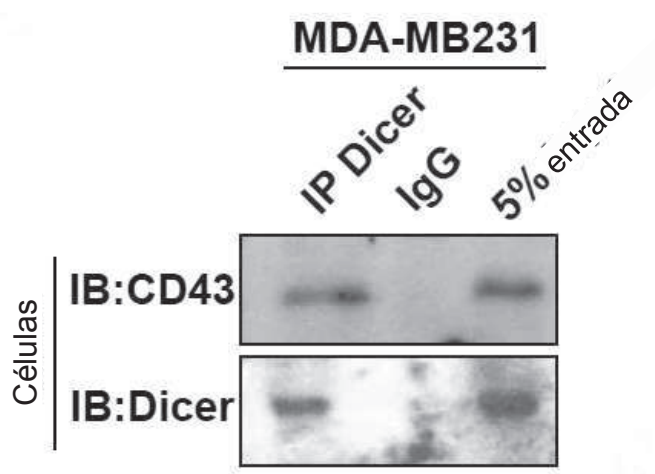

MDA-MB231
IP Dicer
IgG
5% entrada
Células
IB:CD43
IB:Dicer

FIG. 9A

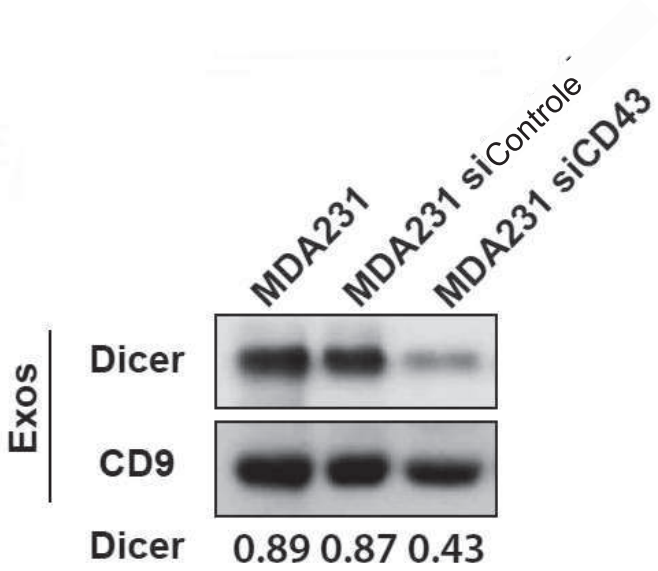

MDA231
MDA231 siControle
MDA231 siCD43
Exos
Dicer
CD9
Dicer
0.89 0.87 0.43

FIG. 9B

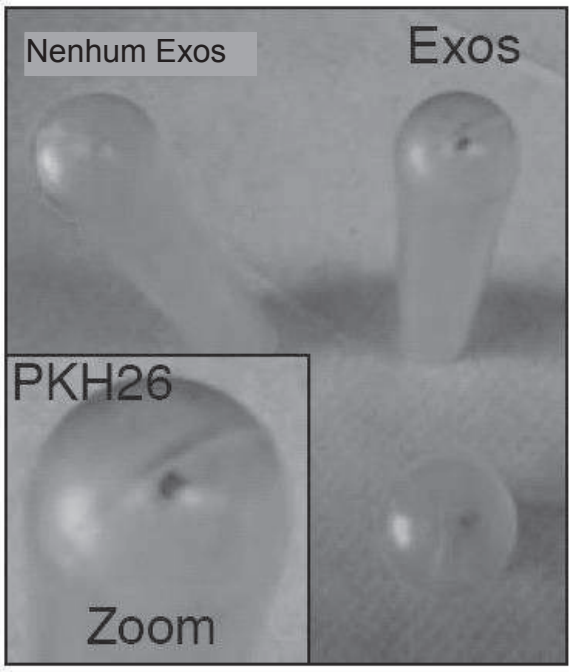


FIG. 10A

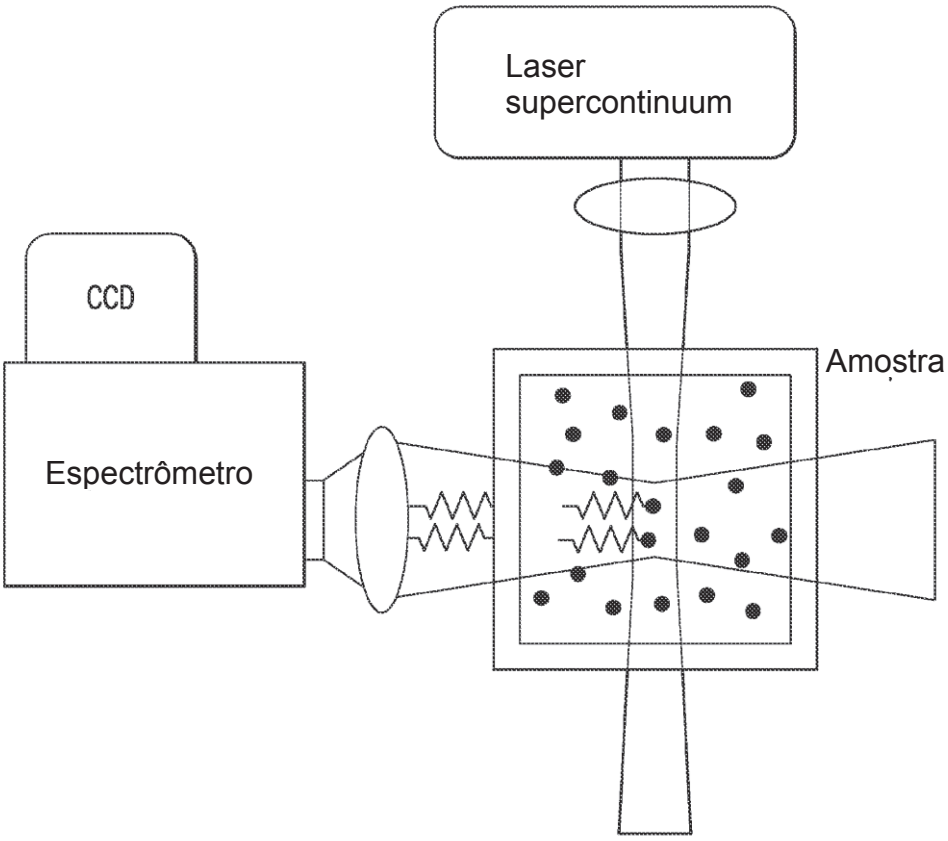


FIG.10B

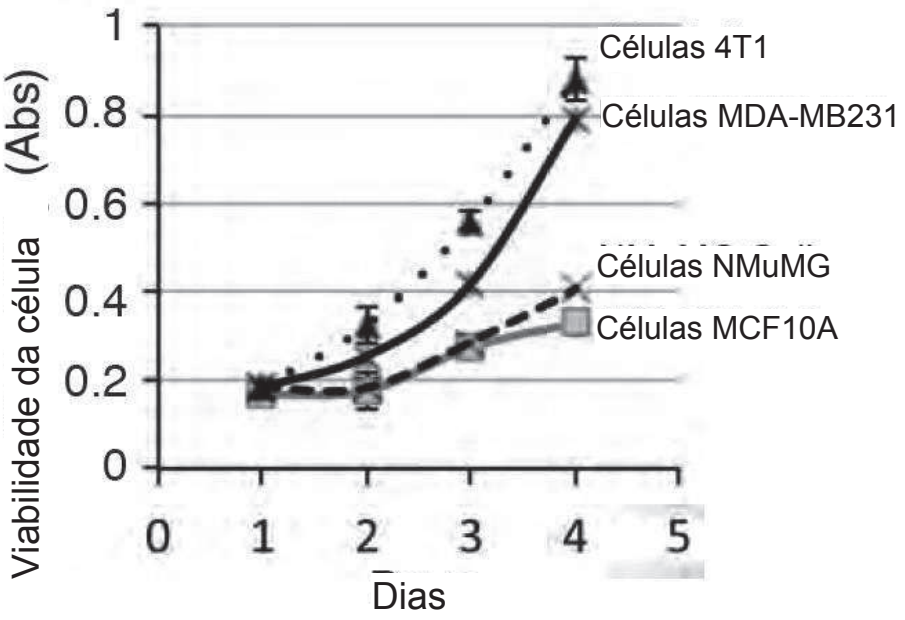

Viabilidade da célula (Abs)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
1
2
3
4
5
Dias
Células 4T1
Células MDA-MB231
Células NMuMG
Células MCF10A

FIG. 10C

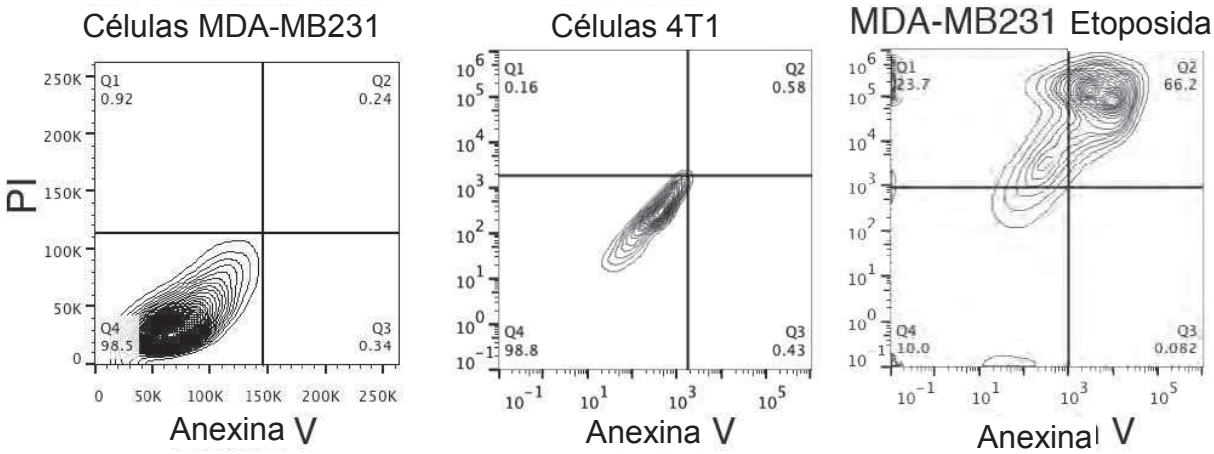

Células MDA-MB231
Células 4T1
MDA-MB231 Etoposida
PI
Anexina V
Q1
0.92
Q2
0.24
Q4
98.5
Q3
0.34
Q1
0.16
Q2
0.58
Q4
98.8
Q3
0.43
Q1
23.7
Q2
66.2
Q4
10.0
Q3
0.082

FIG. 10D

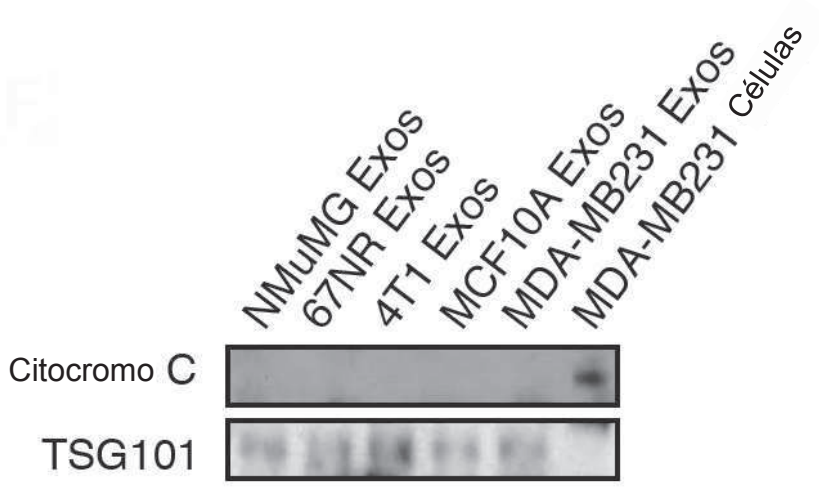

NMuMG Exos
67NR Exos
4T1 Exos
MCF10A Exos
MDA-MB231 Exos
MDA-MB231 Células
Citocromo C
TSG101

FIG. 10E

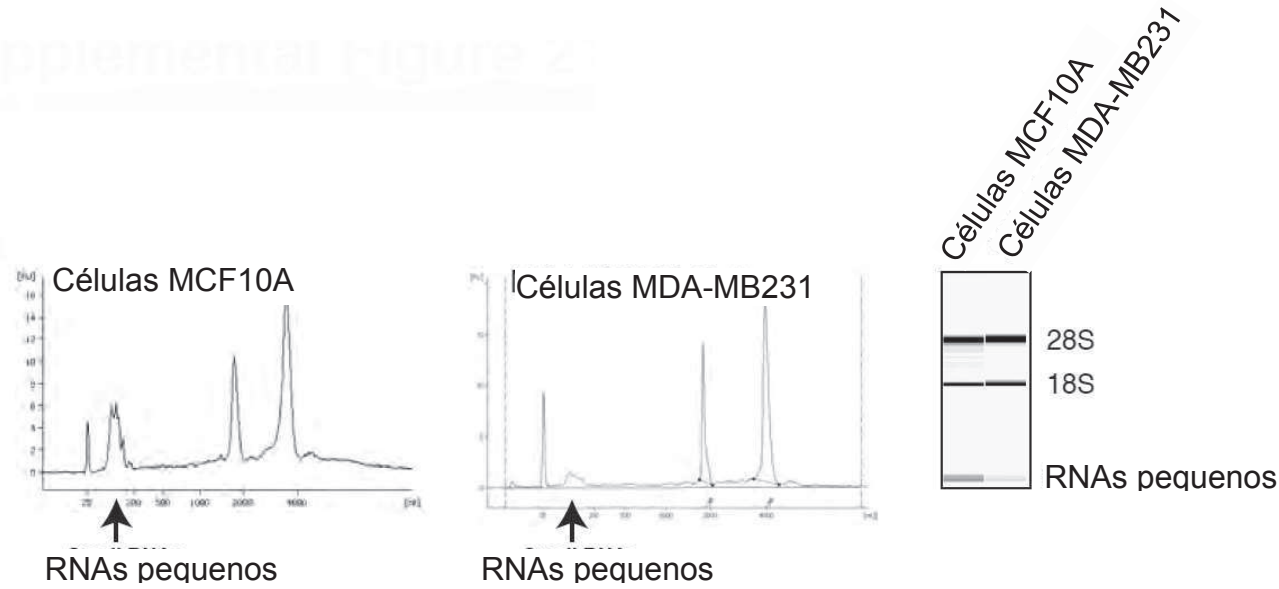
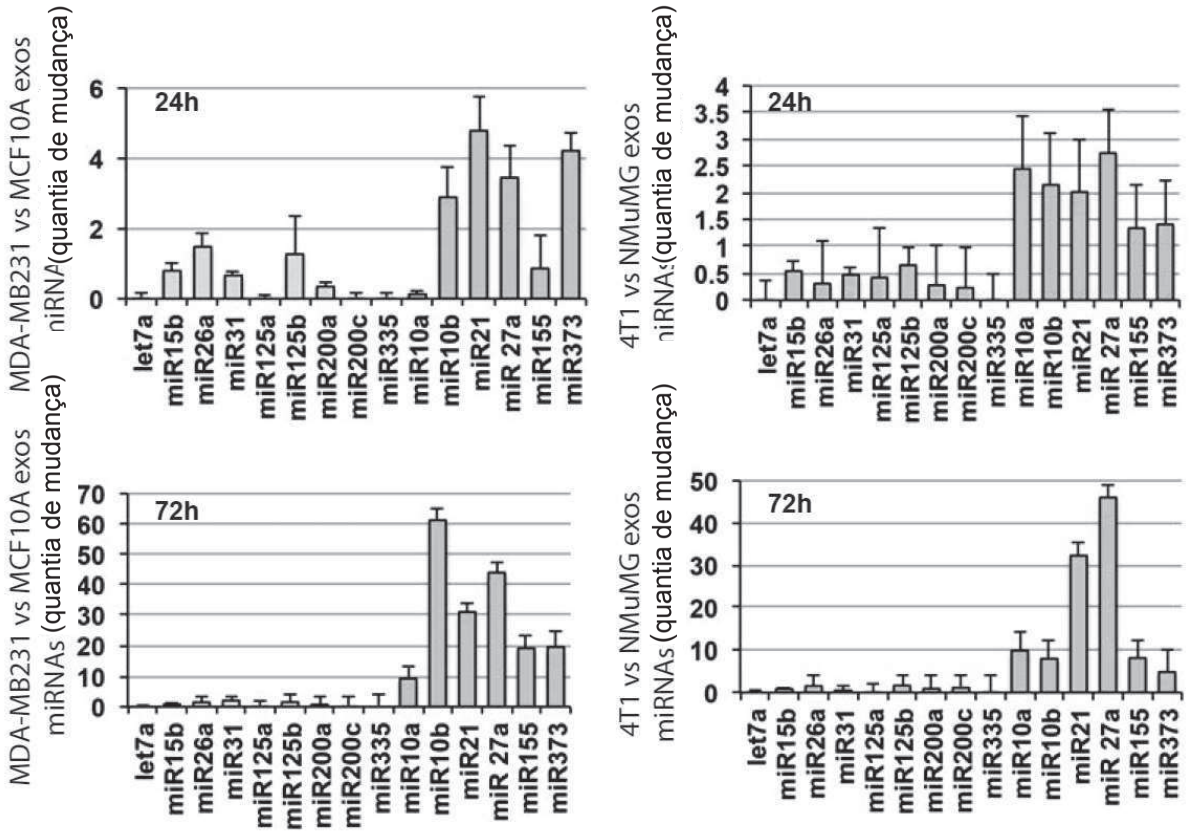

Células MCF10A
RNAs pequenos
Células MDA-MB231
RNAs pequenos
Células MCF10A
Células MDA-MB231
28S
18S
RNAs pequenos

FIG. 11A

FIG. 11B


MDA-MB231 vs MCF10A exos
miRNAs (quantia de mudança)
24h
72h
let7a
miR15b
miR26a
miR31
miR125a
miR125b
miR200a
miR200c
miR335
miR10a
miR10b
miR21
miR 27a
miR155
miR373
4T1 vs NMuMG exos
miRNAs (quantia de mudança)

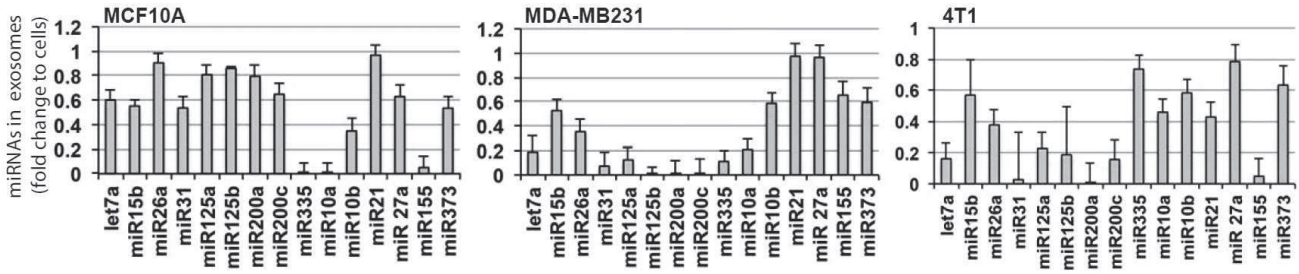

miRNAs in exosomes (fold change to cells)
MCF10A
MDA-MB231
4T1
let7a
miR15b
miR26a
miR31
miR125a
miR125b
miR200a
miR200c
miR335
miR10a
miR10b
miR21
miR 27a
miR155
miR373

FIG. 11C

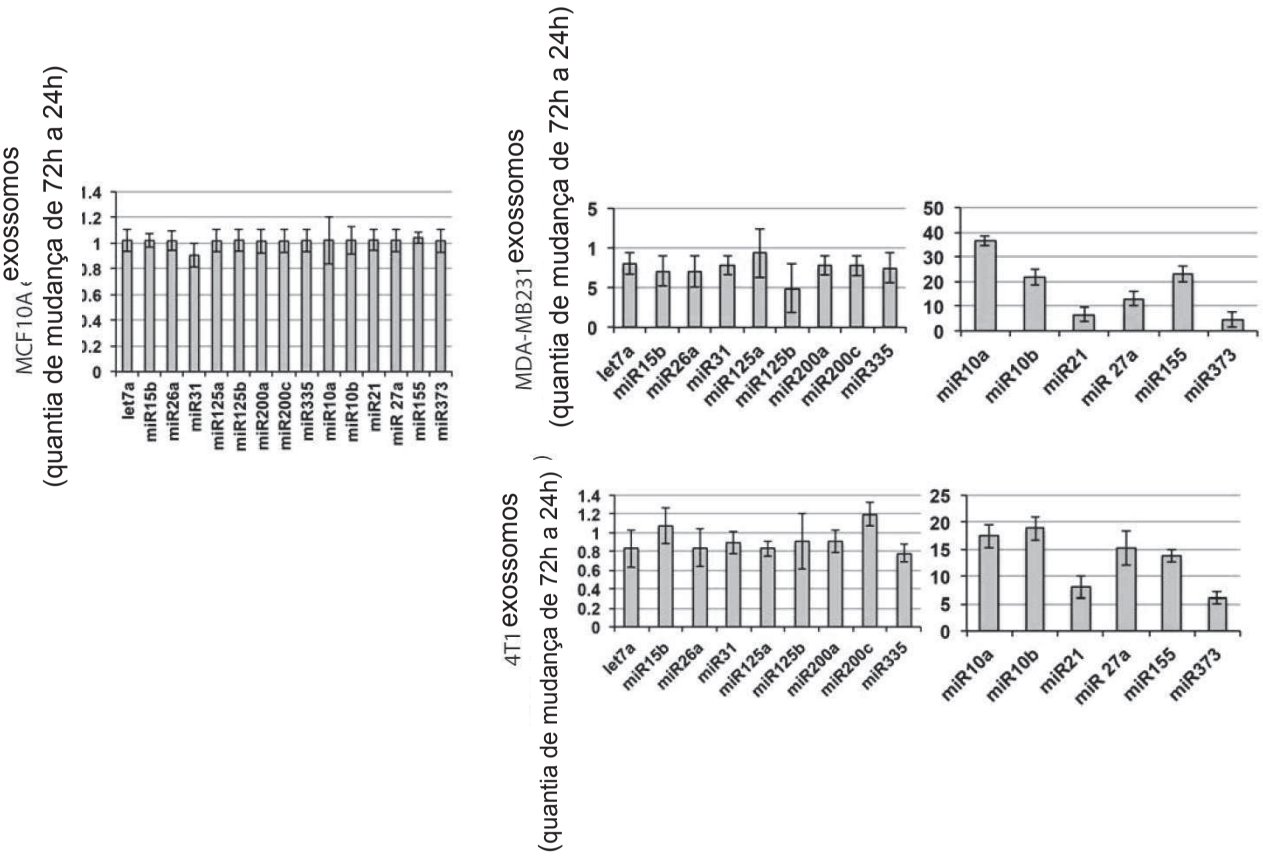

MCF10A exossomos
(quantia de mudança de 72h a 24h)
let7a
miR15b
miR26a
miR31
miR125a
miR125b
miR200a
miR200c
miR335
miR10a
miR10b
miR21
miR 27a
miR155
miR373
MDA-MB231 exossomos
(quantia de mudança de 72h a 24h)
4T1 exossomos
(quantia de mudança de 72h a 24h)

FIG. 11D

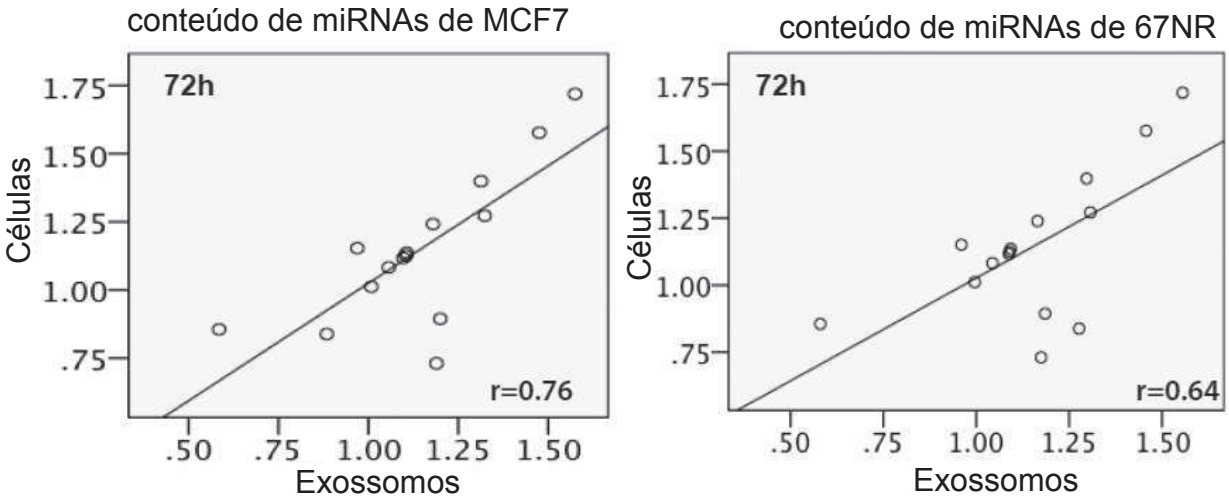

conteúdo de miRNAs de MCF7
72h
r=0.76
Células
Exossomos
1.75
1.50
1.25
1.00
.75
.50
.75
1.00
1.25
1.50
conteúdo de miRNAs de 67NR
72h
r=0.64
Células
Exossomos

FIG. 11E

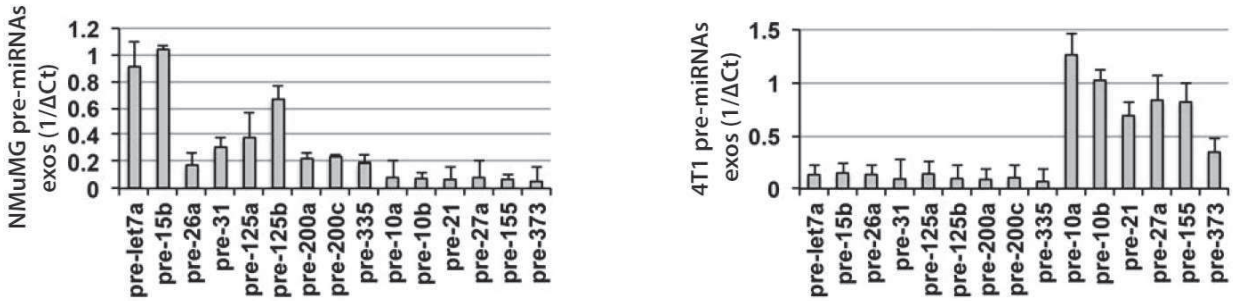


FIG. 12A

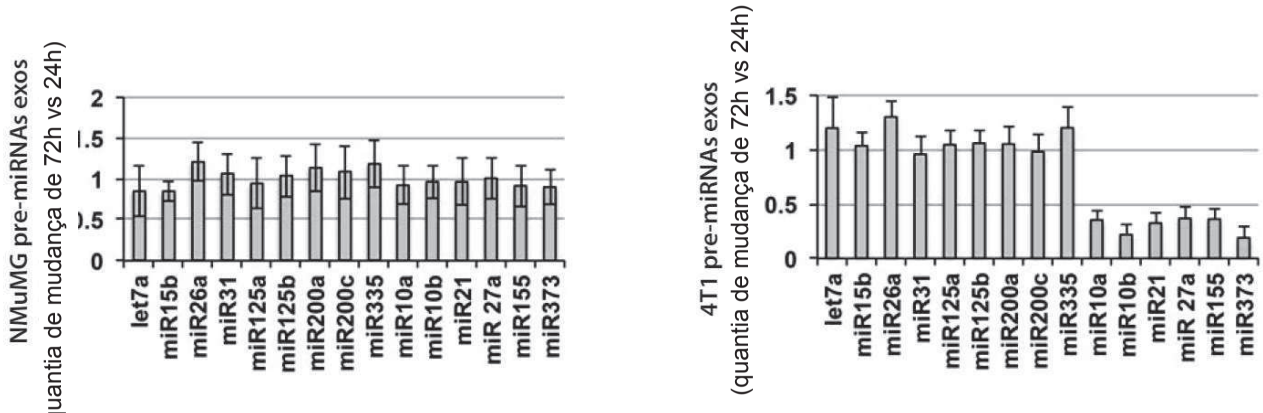


FIG. 12B

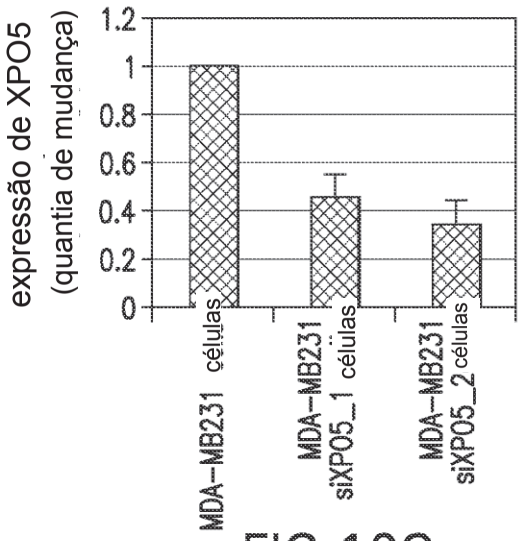


FIG.12C

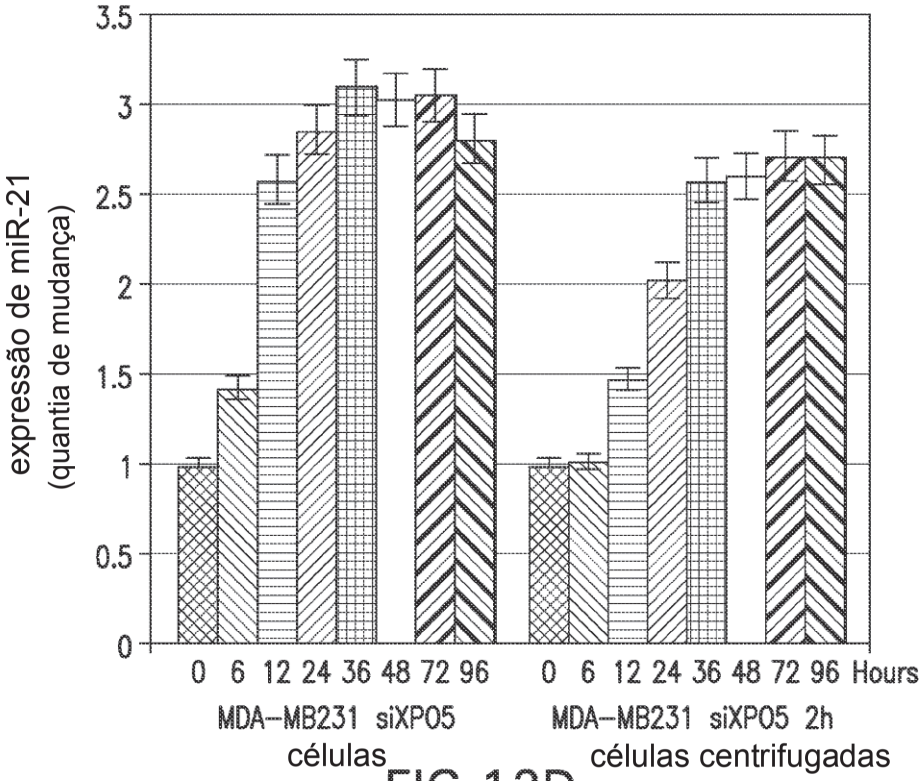


FIG.12D

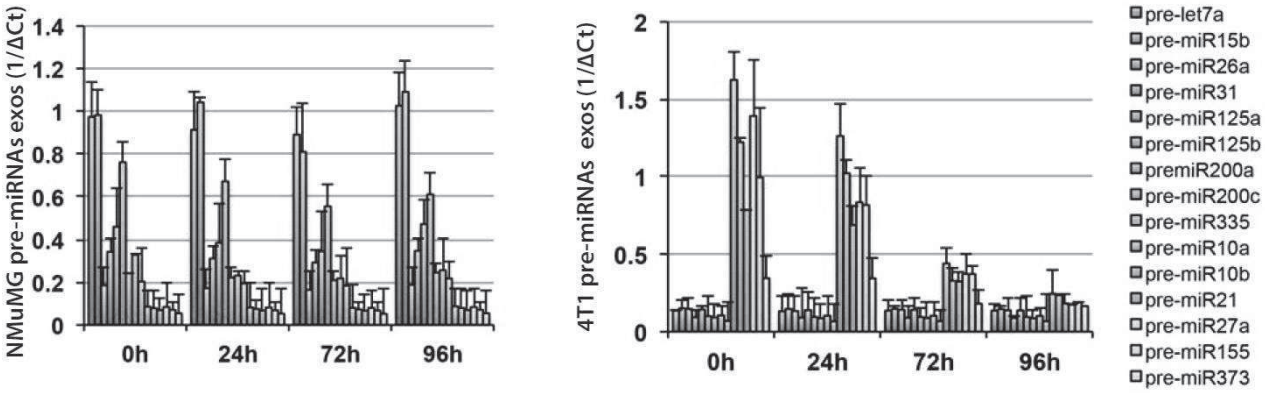

NMuMG pre-miRNAs exos (1/ΔCt)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0h
24h
72h
96h
4T1 pre-miRNAs exos (1/ΔCt)
2
1.5
1
0.5
0
0h
24h
72h
96h
pre-let7a
pre-miR15b
pre-miR26a
pre-miR31
pre-miR125a
pre-miR125b
premiR200a
pre-miR200c
pre-miR335
pre-miR10a
pre-miR10b
pre-miR21
pre-miR27a
pre-miR155
pre-miR373

FIG. 12E

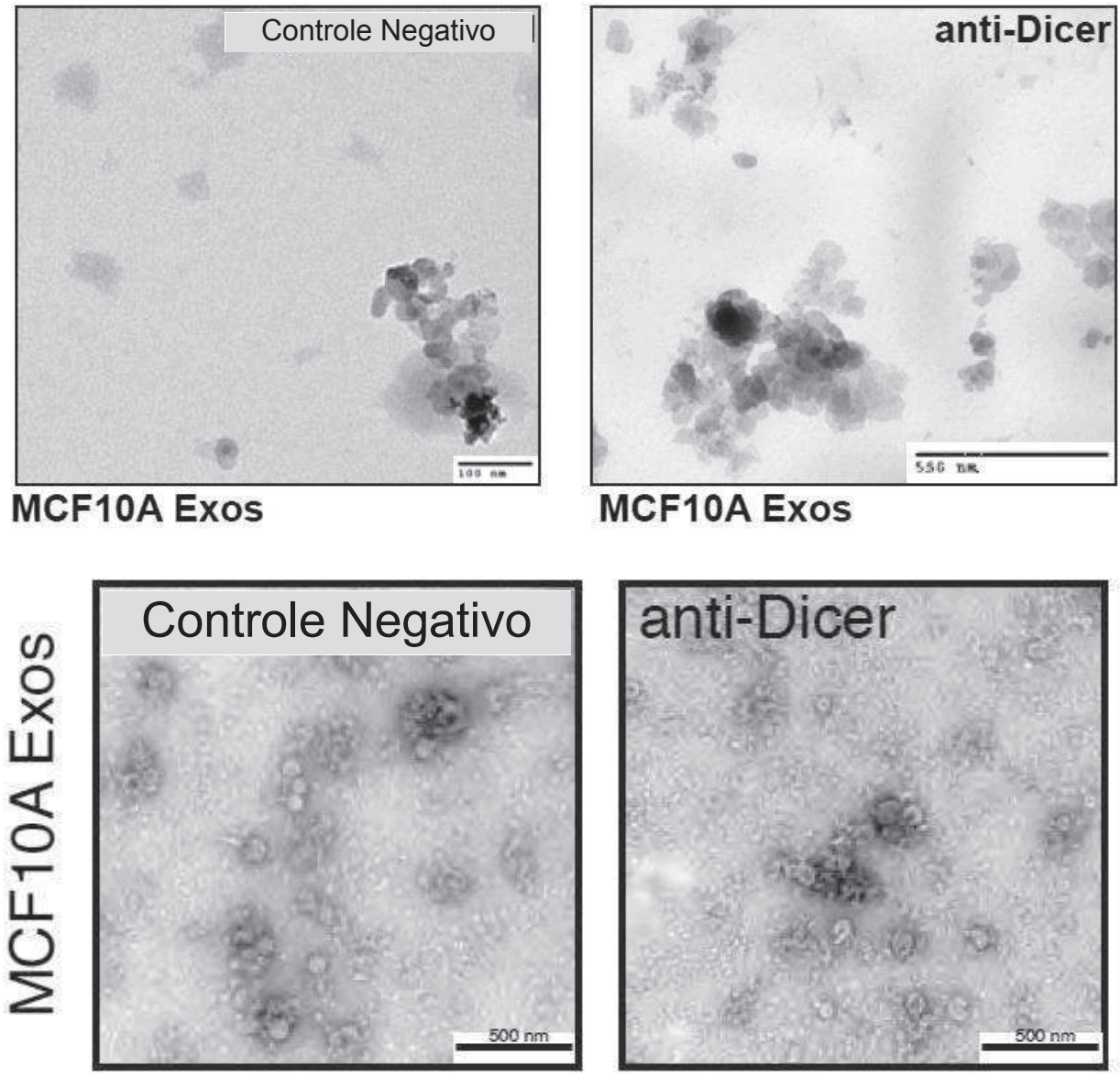

Controle Negativo
anti-Dicer
MCF10A Exos
MCF10A Exos
MCF10A Exos
Controle Negativo
anti-Dicer
500 nm
500 nm

FIG. 13A

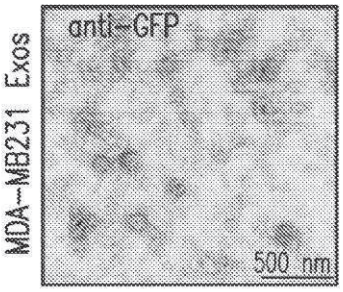


FIG.13B

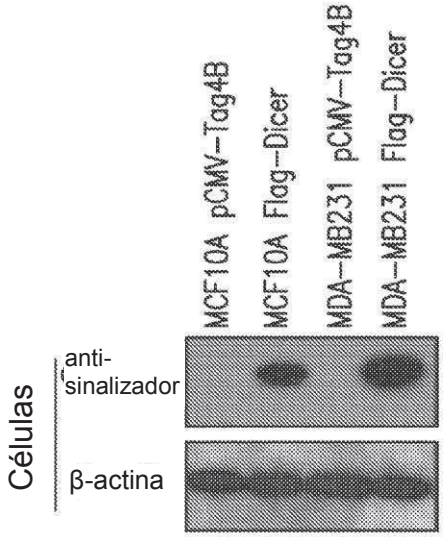


FIG.13C

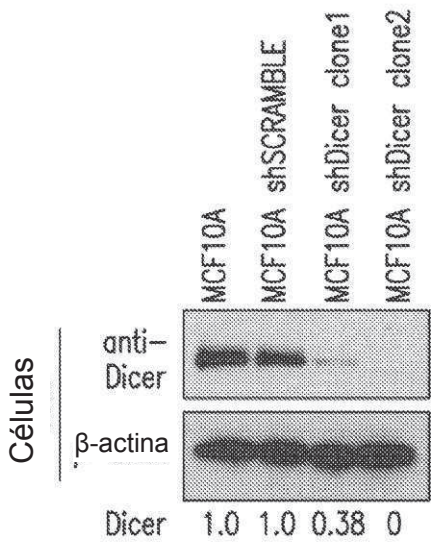


FIG.13D



FIG.13E

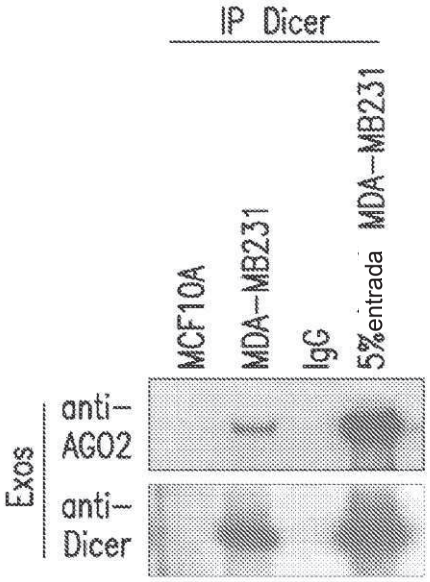


FIG.13F

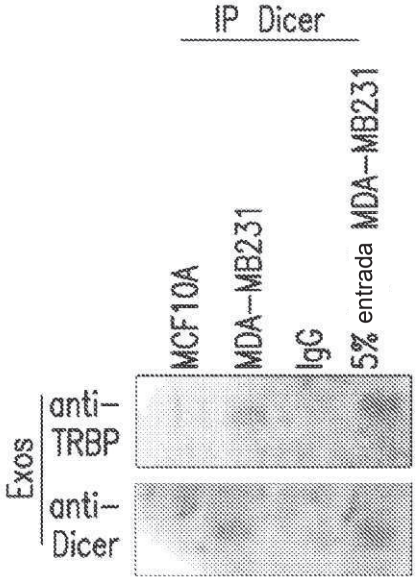


FIG.13G

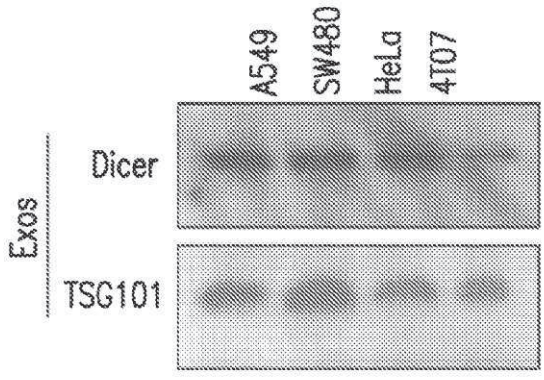


FIG.13H

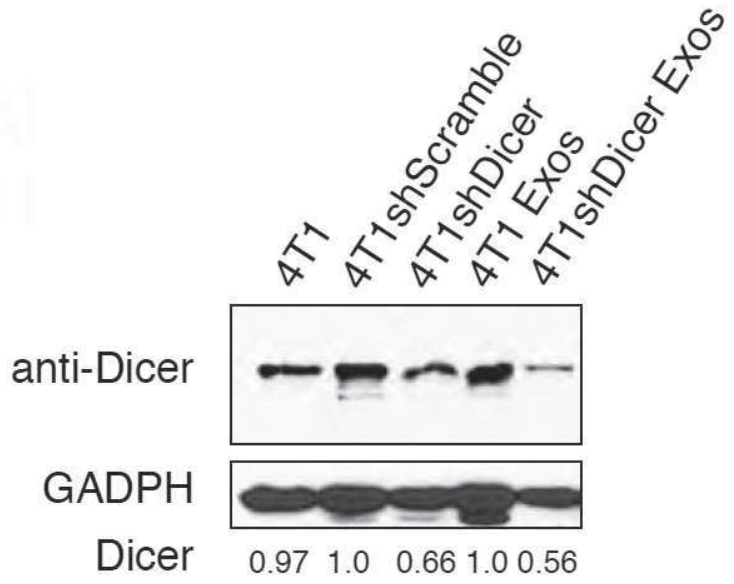


FIG. 14A

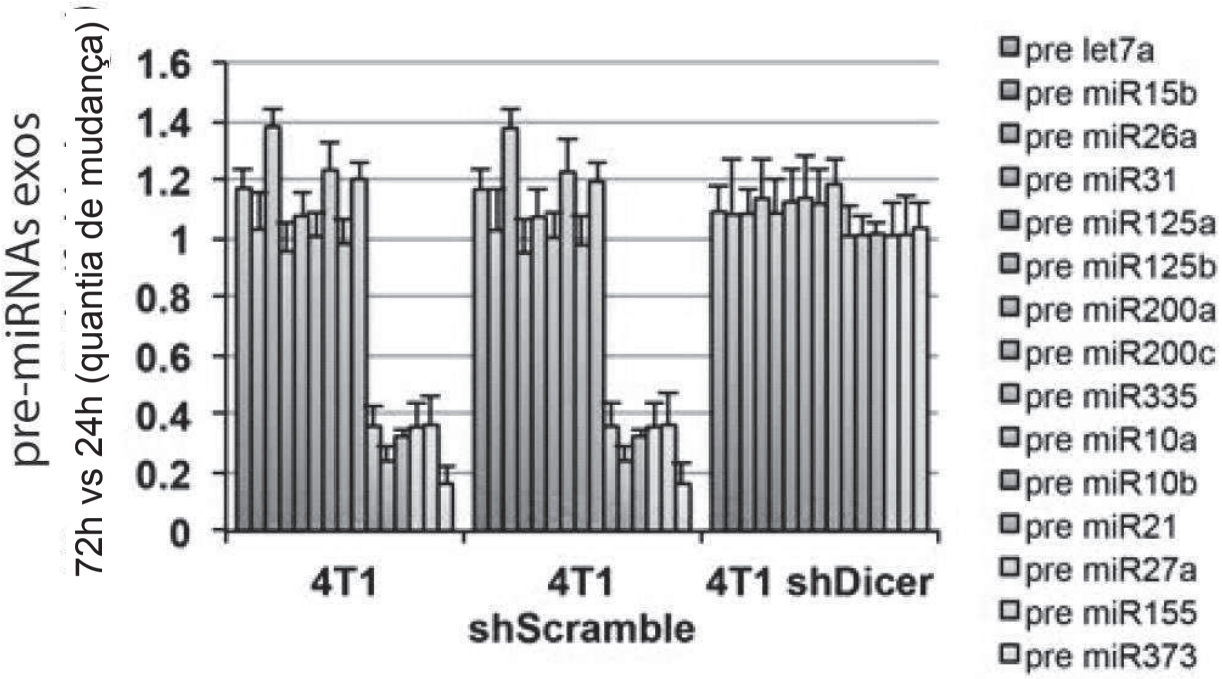


FIG. 14B

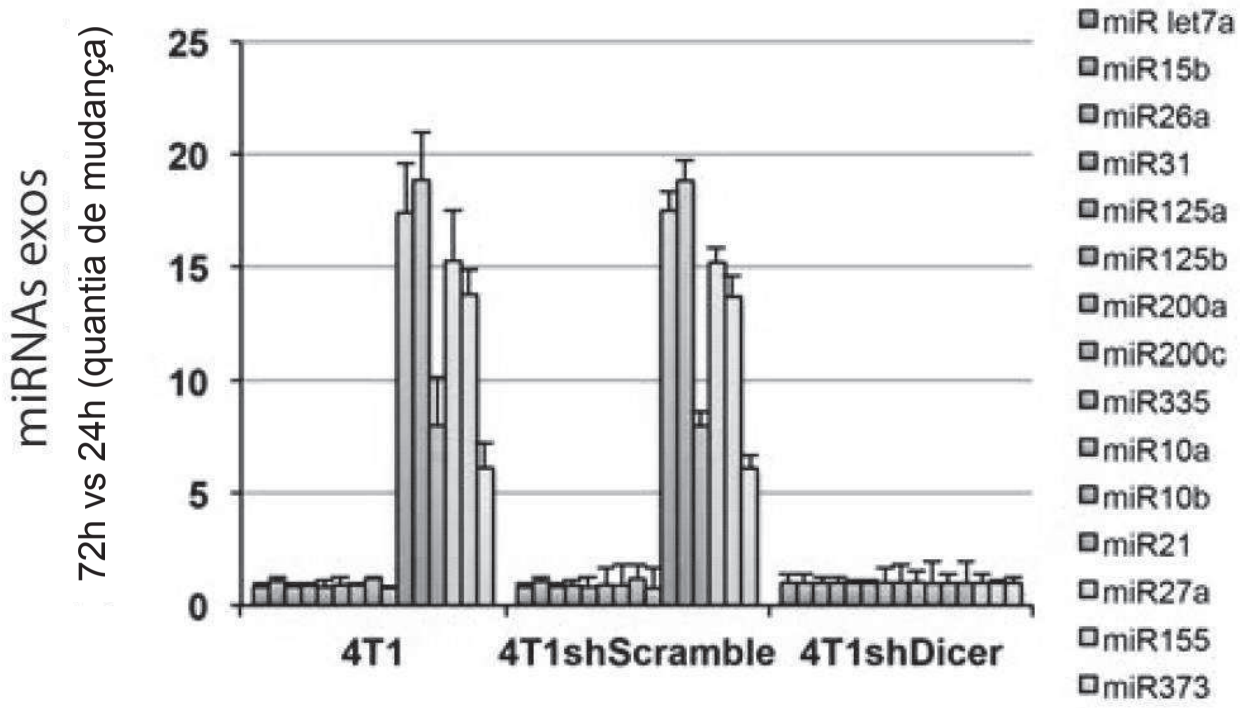


FIG. 14C

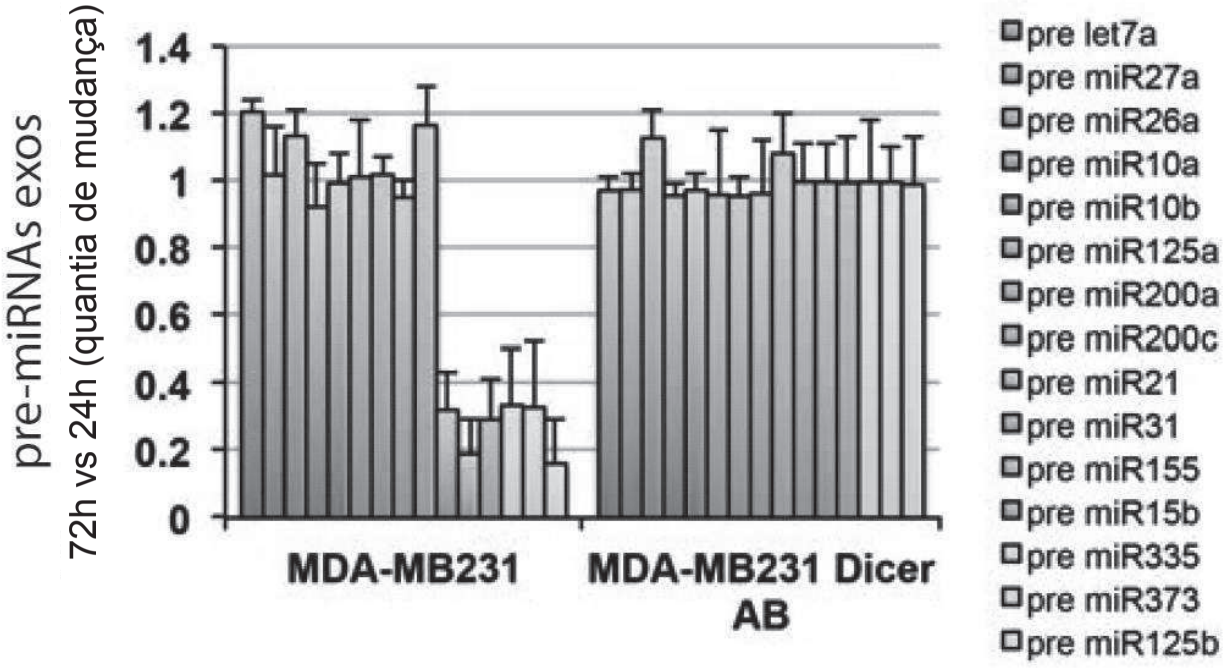


FIG. 14D

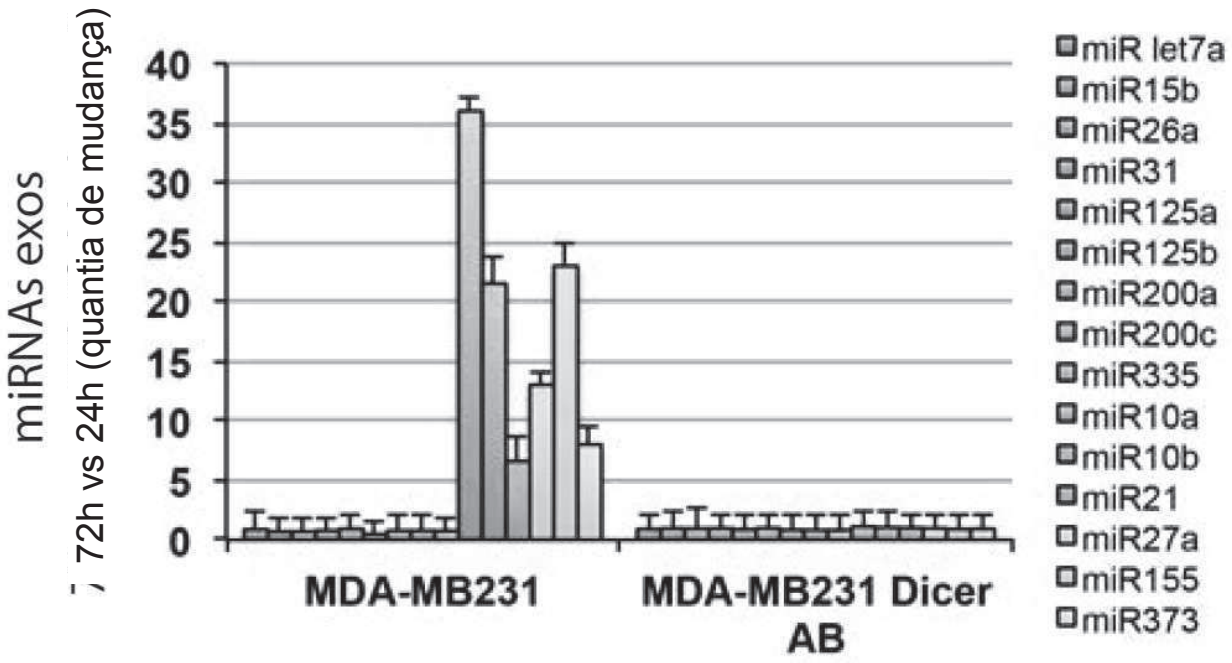


FIG. 14E



FIG. 14F

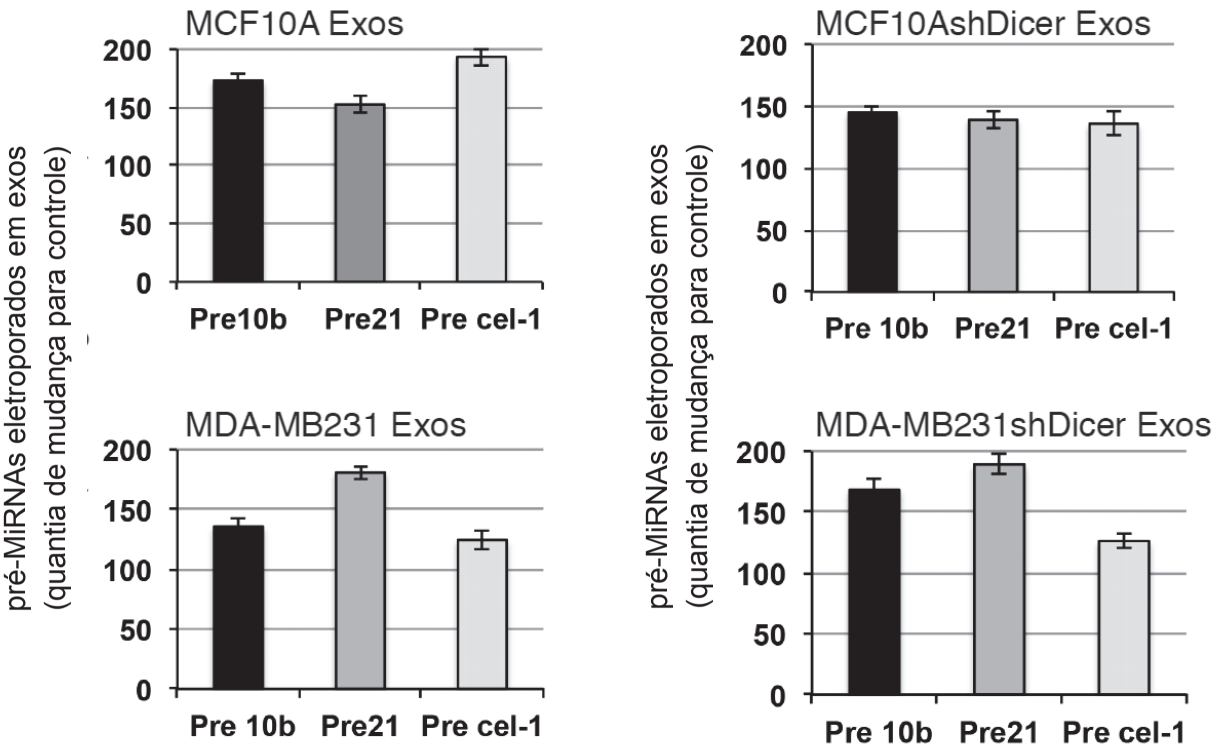

MCF10A Exos
MCF10AshDicer Exos
MDA-MB231 Exos
MDA-MB231shDicer Exos
pré-MiRNAs eletroporados em exos
(quantia de mudança para controle)
200
150
100
50
0
Pre10b
Pre21
Pre cel-1
Pre 10b

FIG. 15A

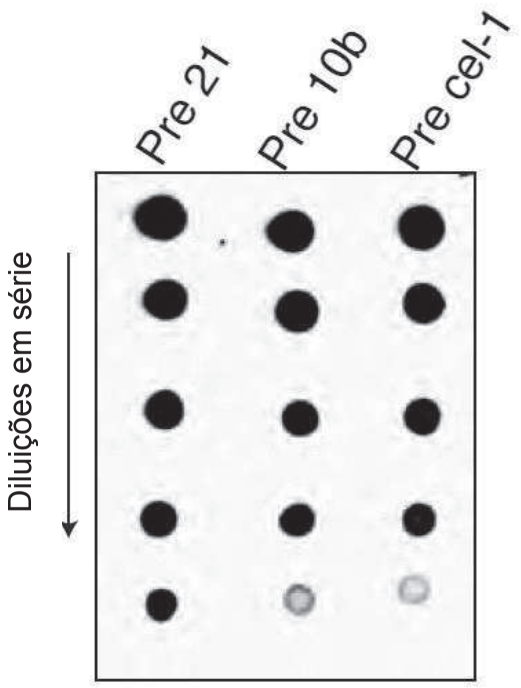


FIG. 15B

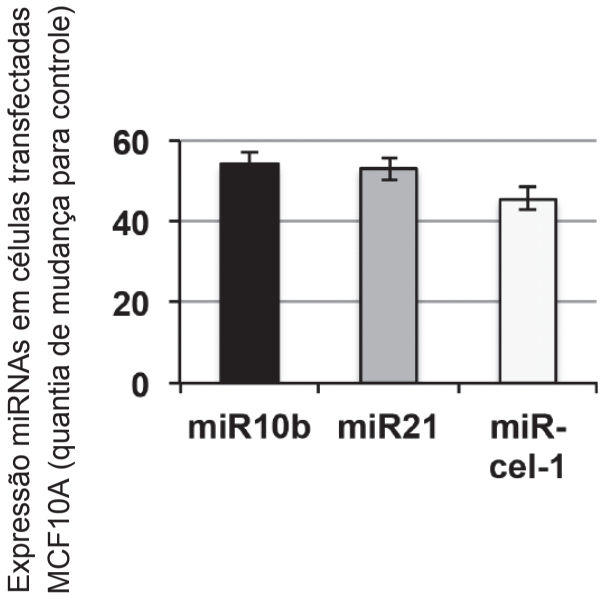


FIG. 15C

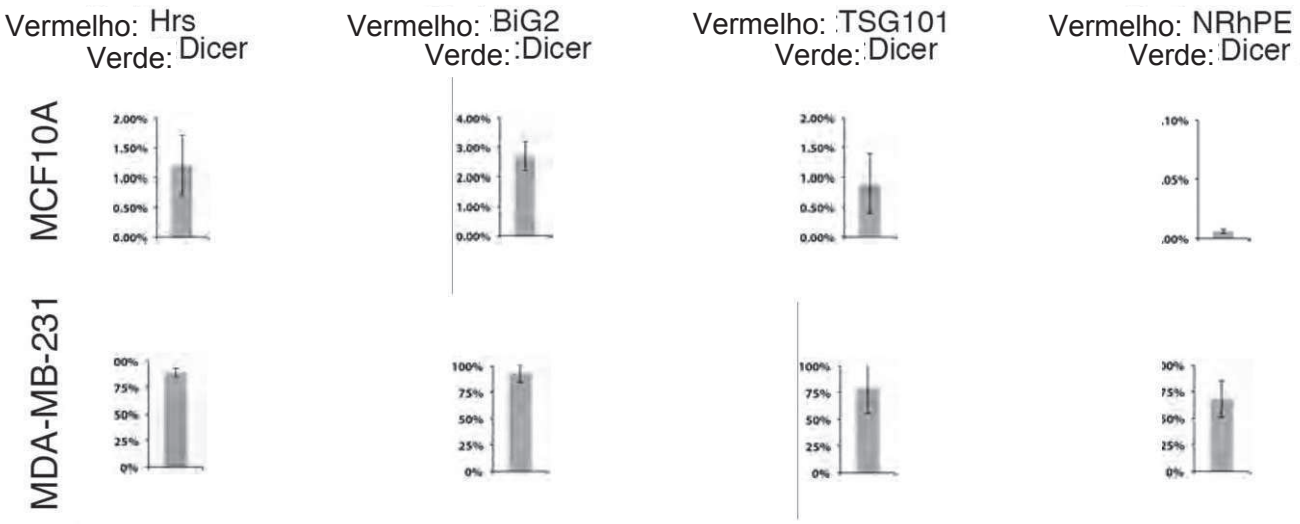

Vermelho: Hrs
Verde: Dicer
Vermelho: BiG2
Verde: Dicer
Vermelho: TSG101
Verde: Dicer
Vermelho: NRhPE
Verde: Dicer
MCF10A
MDA-MB-231

FIG. 16A

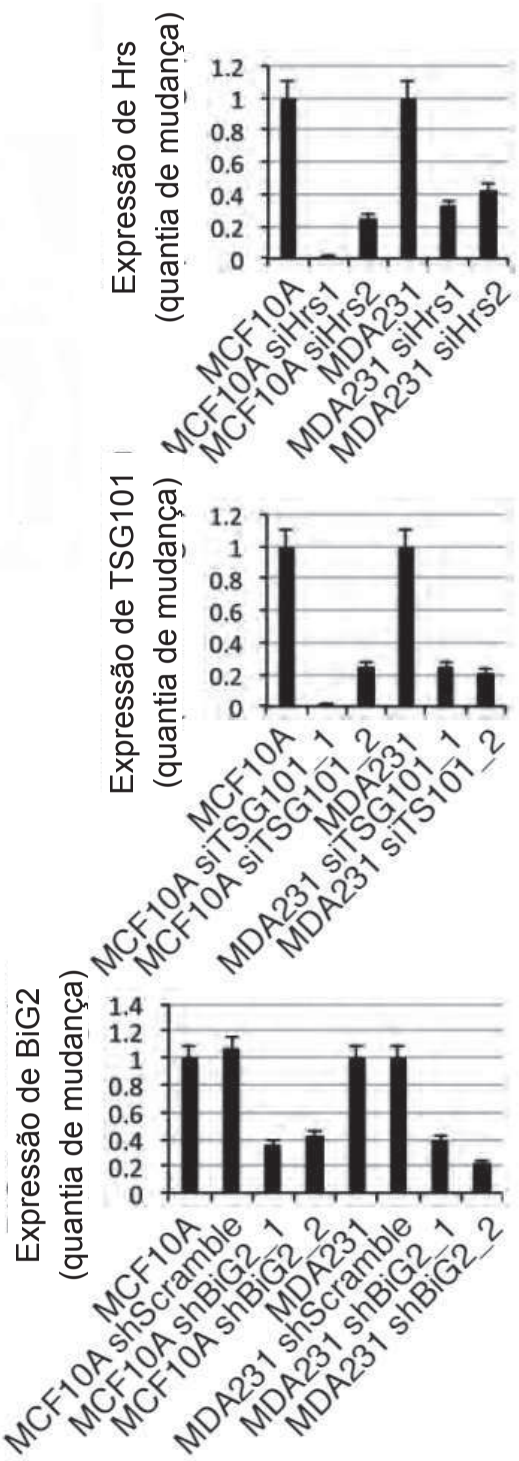

Expressão de Hrs
(quantia de mudança)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A siHrs1
MCF10A siHrs2
MDA231
MDA231 siHrs1
MDA231 siHrs2
Expressão de TSG101
(quantia de mudança)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A siTSG101_1
MCF10A siTSG101_2
MDA231
MDA231 siTSG101_1
MDA231 siTS101_2
Expressão de BiG2
(quantia de mudança)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A shScramble
MCF10A shBiG2_1
MCF10A shBiG2_2
MDA231
MDA231 shScramble
MDA231 shBiG2_1
MDA231 shBiG2_2

FIG. 16B

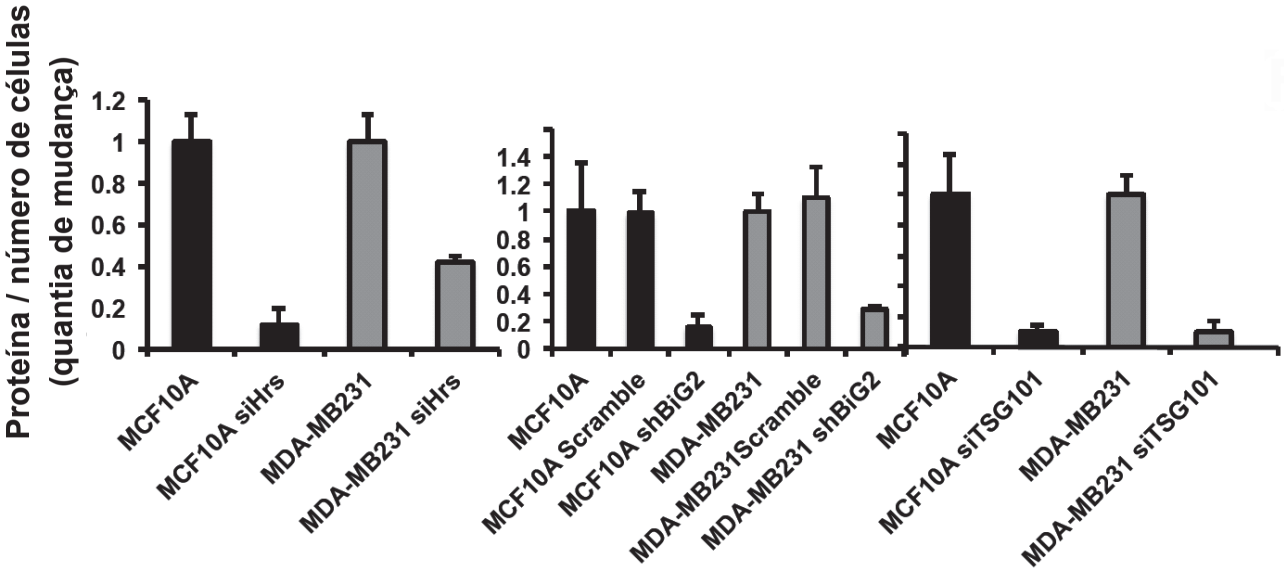

Proteína / número de células
(quantia de mudança)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A siHrs
MDA-MB231
MDA-MB231 siHrs
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A Scramble
MCF10A shBiG2
MDA-MB231
MDA-MB231Scramble
MDA-MB231 shBiG2
MCF10A
MCF10A siTSG101
MDA-MB231
MDA-MB231 siTSG101

FIG. 16C

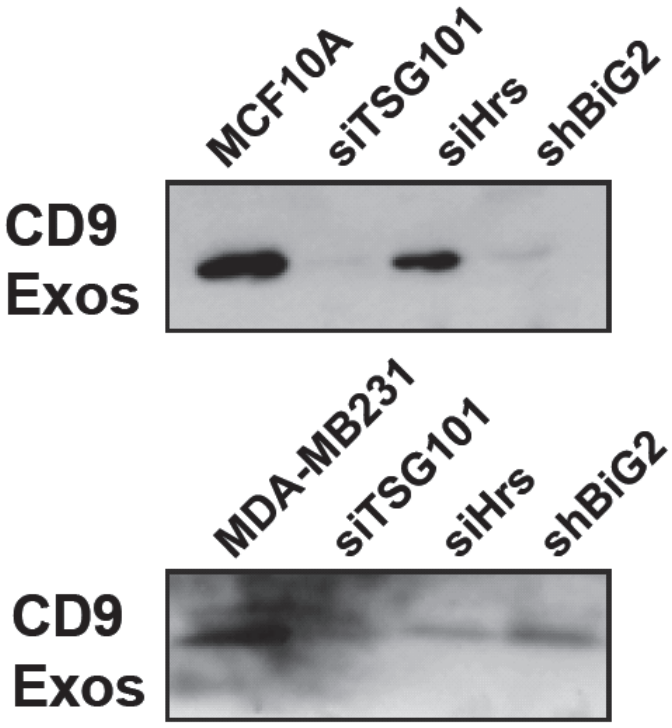


FIG. 16D

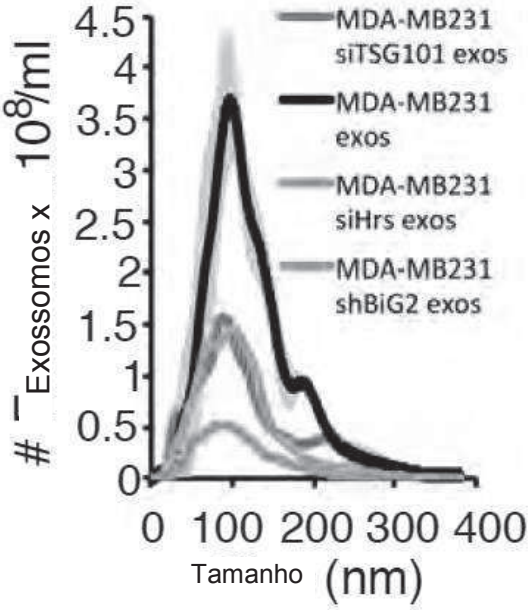


FIG. 16E

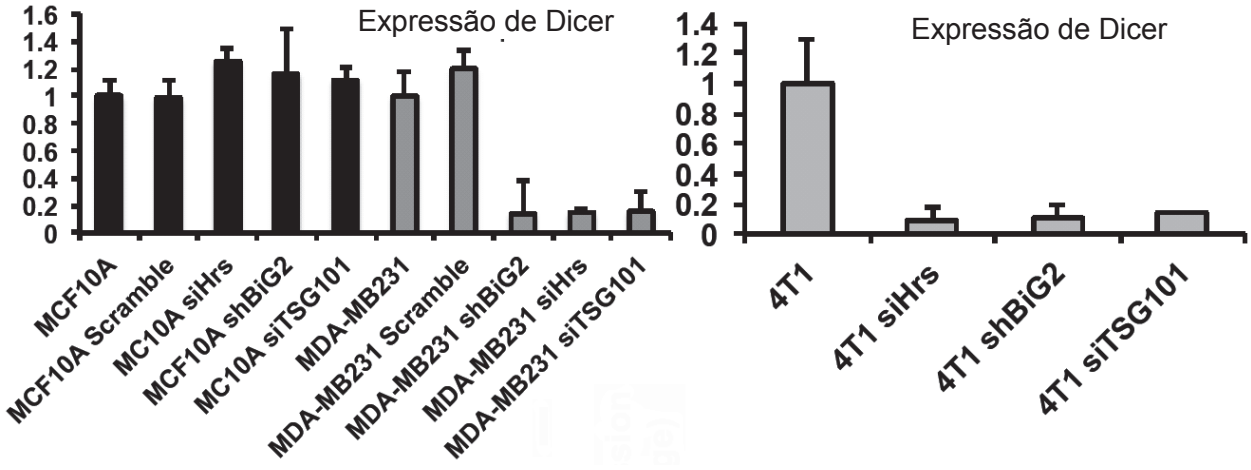

Expressão de Dicer
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
MCF10A
MCF10A Scramble
MC10A siHrs
MCF10A shBiG2
MC10A siTSG101
MDA-MB231
MDA-MB231 Scramble
MDA-MB231 shBiG2
MDA-MB231 siHrs
MDA-MB231 siTSG101
Expressão de Dicer
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
4T1
4T1 siHrs
4T1 shBiG2
4T1 siTSG101

FIG. 16F

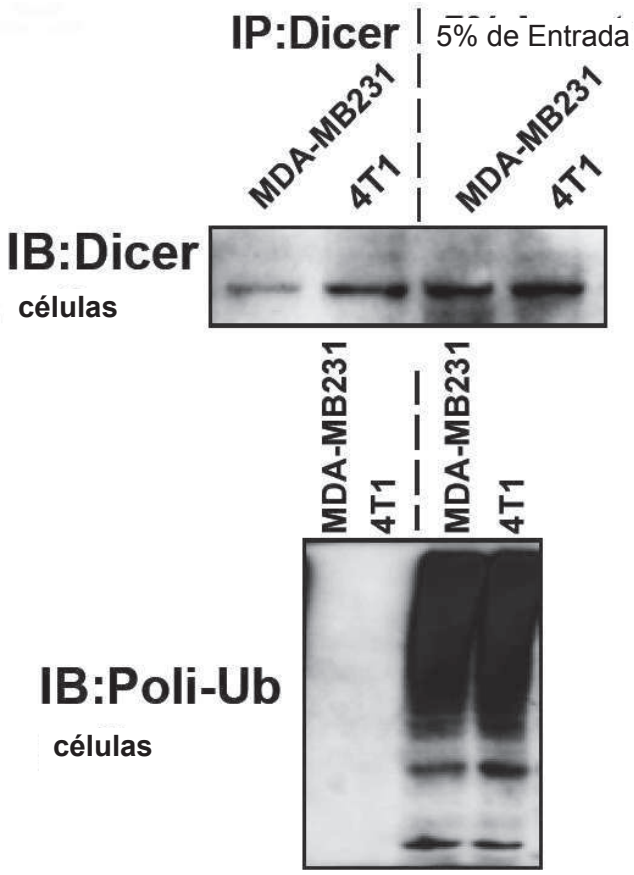

IP:Dicer
5% de Entrada
MDA-MB231
4T1
MDA-MB231
4T1
IB:Dicer
células
MDA-MB231
4T1
MDA-MB231
4T1
IB:Poli-Ub
células

FIG. 16G

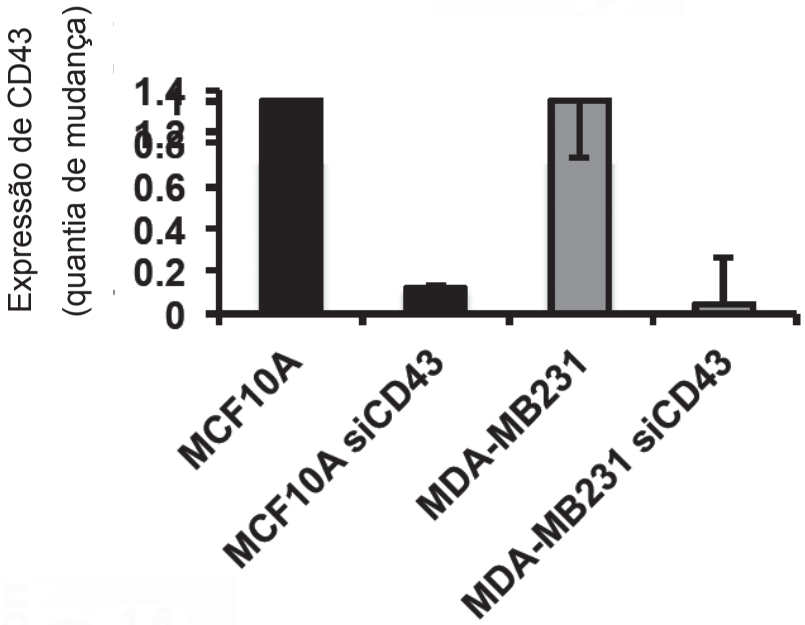


FIG. 16H

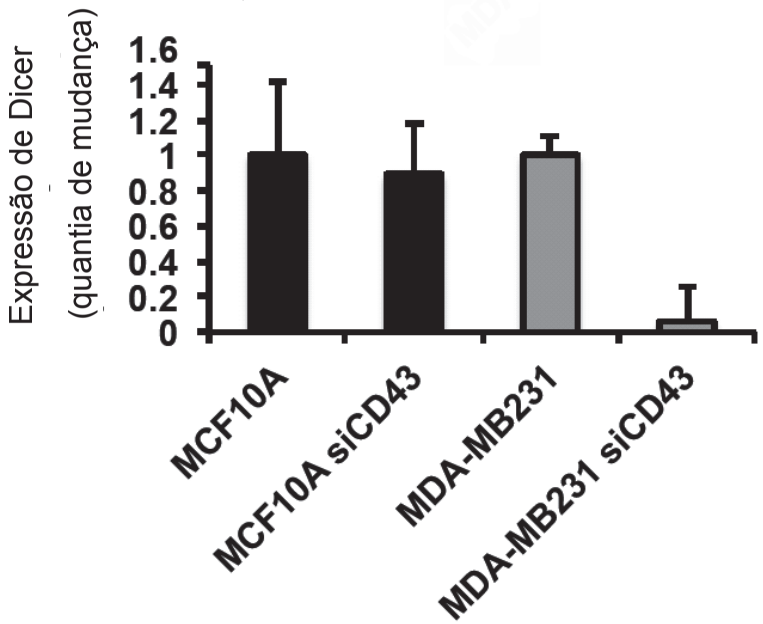


FIG. 16I

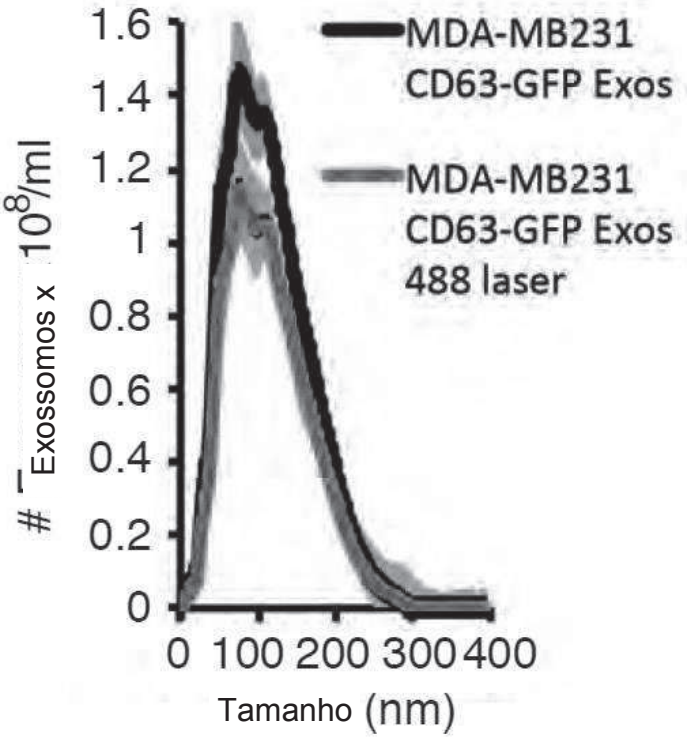

1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Exossomos x 10^8/ml
0 100 200 300 400
Tamanho (nm)
MDA-MB231
CD63-GFP Exos
MDA-MB231
CD63-GFP Exos
488 laser

FIG. 17A

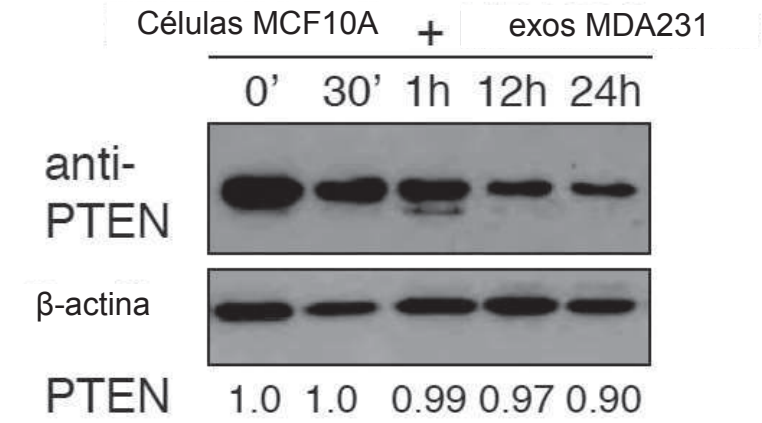


FIG. 17B

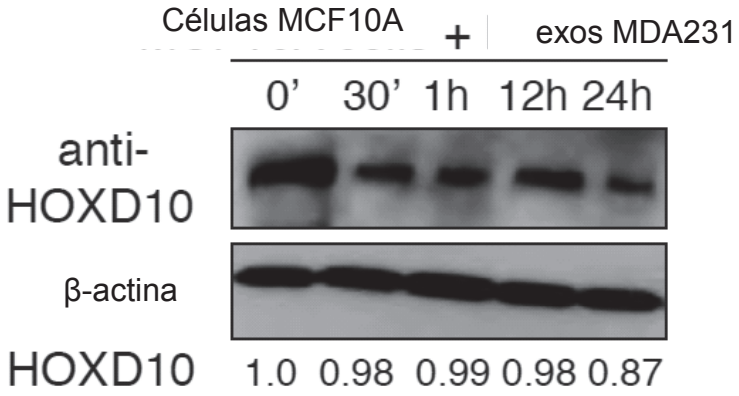


FIG. 17C

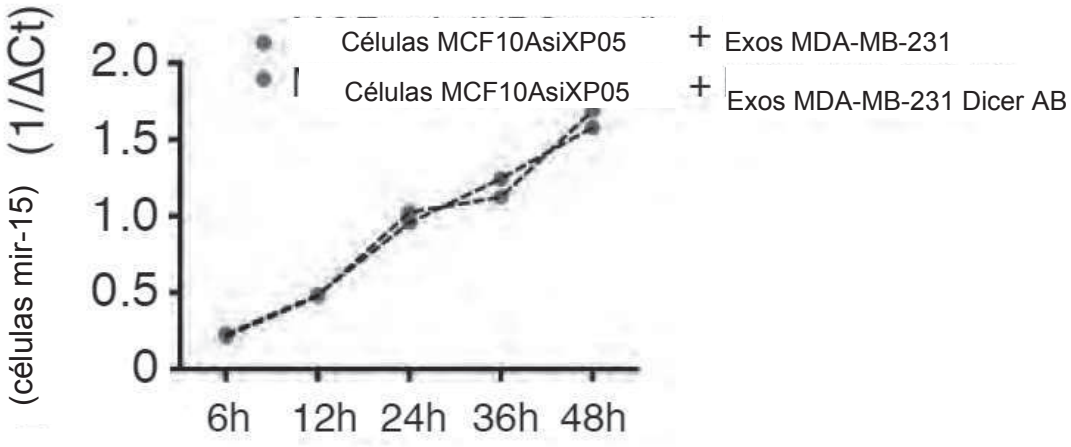


FIG. 17D

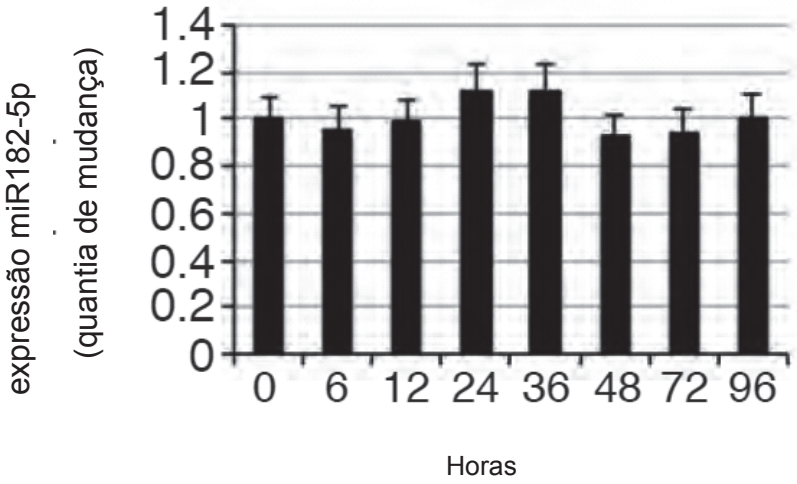


FIG. 17E

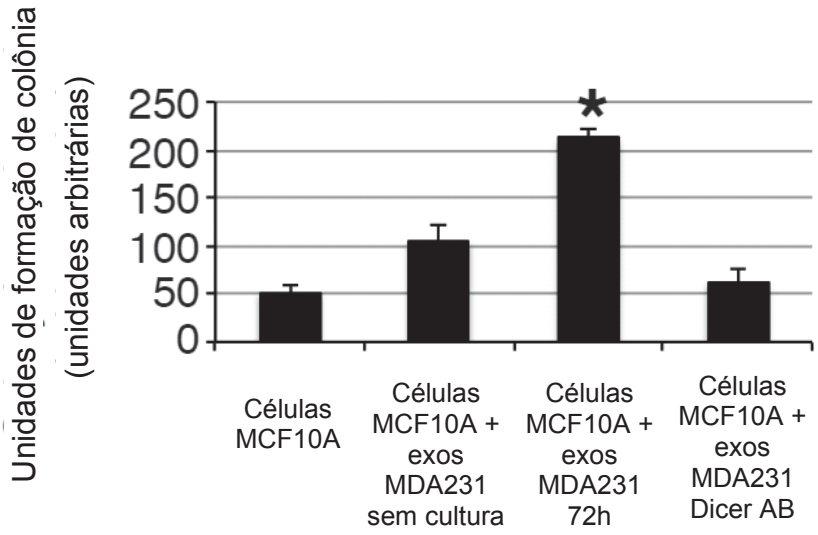


FIG. 17F

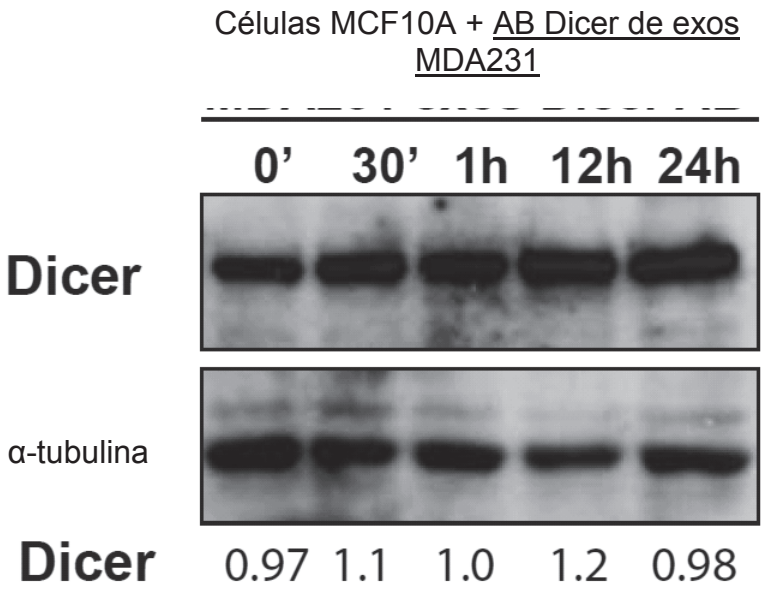


FIG. 17G

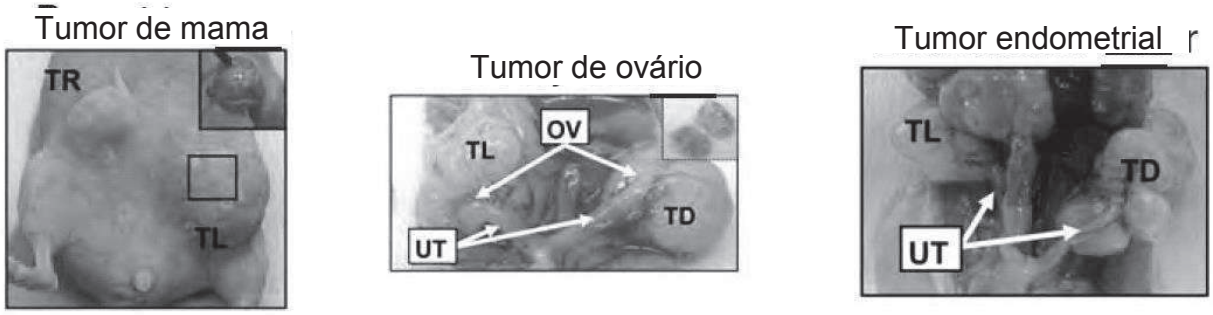

Tumor de mama
TR
TL
Tumor de ovário
OV
TL
TD
UT
Tumor endometrial
TL
TD
UT

FIG. 18A

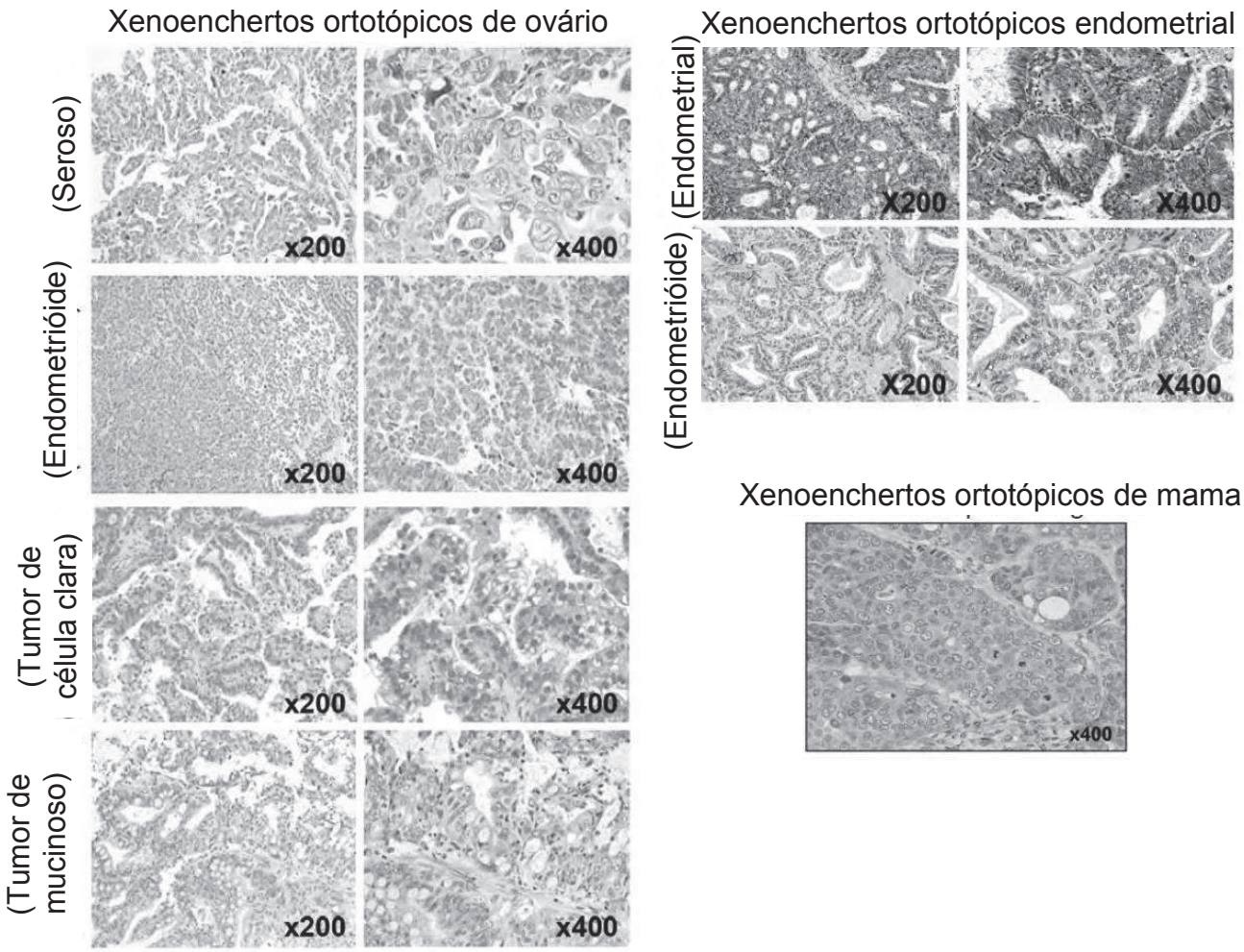

Xenoenchertos ortotópicos de ovário
(Seroso)
(Endometrióide)
(Tumor de célula clara)
(Tumor de mucinoso)
x200
x400
Xenoenchertos ortotópicos endometrial
(Endometrial)
(Endometrióide)
X200
X400
Xenoenchertos ortotópicos de mama
x400

FIG. 18B

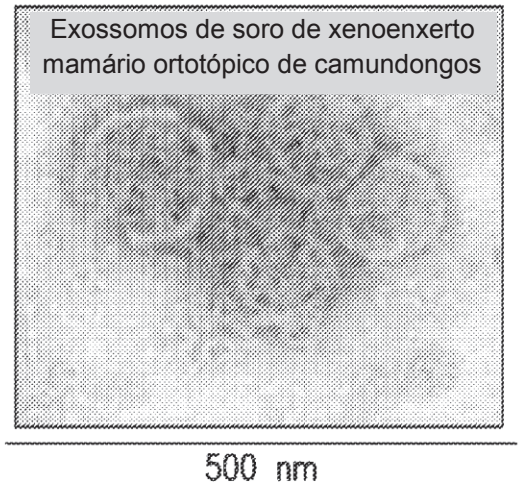


FIG.18C

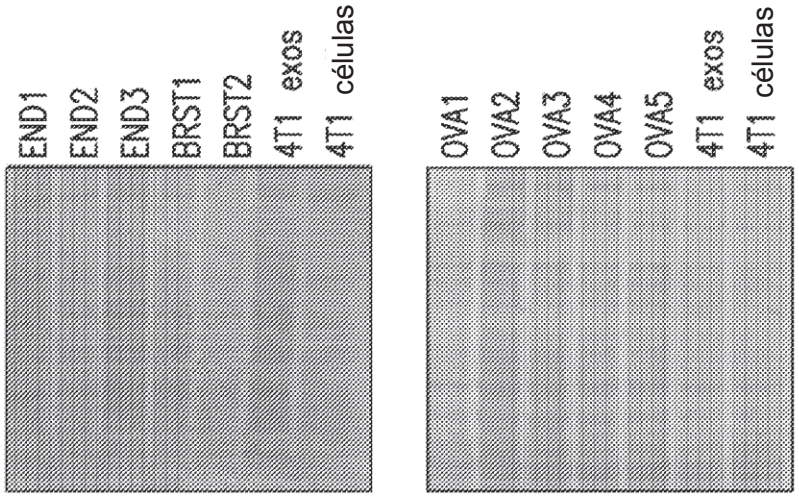


FIG.18D