

TAINÁ MACHERINI MARQUES

**SEQUENCIAMENTO GLOBAL DE MICRORNAS EM SORO DE
MEDULA ÓSSEA AO DIAGNÓSTICO E AO SEGUIMENTO DO
TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)**

BRASÍLIA, 2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAINÁ MACHERINI MARQUES

**SEQUENCIAMENTO GLOBAL DE MICRORNAS EM SORO DE
MEDULA ÓSSEA AO DIAGNÓSTICO E AO SEGUIMENTO DO
TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Professor Doutor Rinaldo Wellerson Pereira

Brasília, 2013

TAINÁ MACHERINI MARQUES

**SEQUENCIAMENTO GLOBAL DE MICRORNAS EM SORO DE
MEDULA ÓSSEA AO DIAGNÓSTICO E AO SEGUIMENTO DO
TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 25 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Rinaldo Wellerson Pereira – (presidente)
Universidade Católica de Brasília e Universidade de Brasília

Professor Doutor Robert Pogue
Universidade Católica de Brasília

Professora Doutora Andrea Barretto Motoyama
Universidade Católica de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, irmão e tias por acreditarem em mim e pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador, Rinaldo Wellerson Pereira, pela oportunidade de trabalhar com o que eu gosto e pela realização desse sonho.

Ao Luis Sakamoto, pela paciência e pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

Ao professor Gabriel Fernandes pela ajuda nas análises.

Aos amigos e companheiros de laboratório Nídia, Virgílio, Shelly, Ohana, Daniel, Carol, Tailce, Tulio, Getúlio, Tati, Betulia, Jessica, Daiva, Débora, Lana, Felipe, Renato, Stephan, Iara, Ana Bárbara e Julia, por todos nossos momentos divertidos mesmo estando todos desesperados.

Um agradecimento especial à Clarissa, pela valiosa ajuda nos experimentos e pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos comigo.

Aos meus amigos de infância, Marcia e Rodrigo, por todo o carinho, amizade, companheirismo e muita paciência ao longo desses anos.

Aos meus amigos queridos Mariana, Andréa, Julia, Silvia, Carol Igreja, Sara, Priscila, Carol Pinto, Ana Cecília, Adriana, Emerson, Marco Antônio, Cássio e Jacque, por todo o apoio durante a realização desse sonho.

À professora Márcia Renata Mortari, pela concessão da bolsa de mestrado e pela oportunidade em aumentar meus conhecimentos.

À CAPES, CNPq e FAPDF pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto.

Dedico esse trabalho aos meus pais que me ensinaram que sonhos bons são aqueles que sonhamos todos juntos e à Vó Jandira que me ilumina lá do céu...

RESUMO

MicroRNAs circulantes são encontrados em todos os fluidos corporais e podem ser associados com a modulação do microambiente tumoral e progressão de doenças. Na presença de células cancerosas, componentes presentes no microambiente normal, tornam-se desregulados, promovendo a sobrevivência celular, a progressão da doença e resistência às drogas. Vários microRNAs atuam como participantes no processo de desenvolvimento de leucemia, quer aumentando ou diminuindo os níveis de expressão. Aqui, mostramos dados onde microRNAs circulantes foram identificados no soro de medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). Foram investigados, por smallRNA seq a presença de microRNAs no microambiente do tumor em amostras de soro de quatro pacientes, colhidos ao diagnóstico (fase um) e durante o seguimento do tratamento quimioterápico (fase dois e três). No total, foram identificados 946 microRNAs conhecidos, apenas os microRNAs com o mínimo de cinco leituras por milhões em uma das fases foram consideradas, totalizando 391 microRNAs. Após a análise estatística, somente microRNAs com diferença de expressão entre as fases de tratamento com um valor de p em 0,05 foram considerados. Entre eles, 258 apresentaram número de leituras com diferença significativa entre a fase um e a fase dois, 199 entre a fase um e três e 237 comparando fase dois e três. Os seis microRNAs com diferença mais significativa entre as fases foram relacionados em outras doenças com a atuação como proto-oncogenes, progressão, invasão, angiogênese, metástase tumoral, inibição de apoptose e promotor de crescimento celular. O miR-486-5p foi o maior em quantidade de leituras (*reads*) e aquele com a maior diferença significativa entre as fases, diminuindo durante o tratamento, com exceção do paciente com recidiva da doença. Sugerindo que este microRNA 486-5p, possa ser utilizado como biomarcador associado ao resultado do tratamento. O microRNA 423, descrito como participante no crescimento celular, possibilitou a estratificação entre os grupos de risco, indicando sua possível utilização como marcador na classificação de risco dos pacientes. Esse estudo é o primeiro a relacionar os microRNAs circulantes em microambiente tumoral durante as etapas de tratamento quimioterápico e a sugerir o uso como biomarcadores.

Palavras-chaves: microRNA circulante; leucemia linfóide aguda; soro; biomarcador; sequenciamento.

ABSTRACT

Circulating microRNAs have been found in all body fluids and could be associated with modulation of tumor microenvironment and progression of diseases. In the presence of cancer cells, components present in normal microenvironment, become deregulated, promoting cell survival, disease progression and drug resistance. Several microRNAs act as participants in the process of development of leukemia either increasing or decreasing the expression levels. Here, we show data where circulating microRNAs were found in bone marrow serum from acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. We investigated, by smallRNA seq the presence of microRNAs in tumor microenvironment from four patients, collected at diagnosis (phase one) and during sequence chemotherapy treatment (phase two and three). In totally, 946 known microRNAs were identified, only microRNAs with minimum of five reads per million in one of phases were considered, totaling 391 microRNAs. After statistical analysis, only microRNAs with expression difference between treatment phases with a p value under 0,05 were considered. Among them, 258 presented significant difference expression between phase one and two, 199 between phase one and three and 237 comparing phase two to three. The six more different expressed microRNAs have been linked with other diseases acting as proto-oncogenes, progression, invasion, angiogenesis, tumor metastasis, inhibition of apoptosis and cell growth promoter. The miR-486-5p was the largest in number of reads and the one with the most significant difference between the phases, decreasing during treatment, except for patients with relapsed disease. Suggesting that this microRNA 486-5p could be used as biomarker associated to treatment outcome. The microRNA 423, described as participating in cell growth, was able to stratify risk among groups, indicating its possible use as a biomarker in the risk classification. This study is the first to relate the circulating microRNAs in the tumor microenvironment during the stages of chemotherapy and suggested their use as biomarkers.

Keywords: circulating microRNA; acute lymphoblastic leukemia; serum; biomarker; sequencing.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 HEMATOPOIESE.....	9
1.2 MICROAMBIENTE MEDULAR	11
1.3 LEUCEMIA.....	13
1.4 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA.....	14
1.5 ALTERAÇÕES GENÉTICAS	15
1.6 TRATAMENTO	16
1.7 MICROAMBIENTE TUMORAL	17
1.8 microRNAs.....	19
1.9 microRNAs E NEOPLASIAS	22
1.10 microRNAs E LEUCEMIA	23
1.11 microRNAs CIRCULANTES.....	25
1.12 microRNAs E BIOMARCADORES	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. MÉTODOS.....	31
4.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	31
4.2 EXTRAÇÃO DE RNA.....	31
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE RNA	32
4.4 SEQUENCIAMENTO GLOBAL DE microRNAs.....	33
4.5 ANÁLISE DE microRNA SEQ	34
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4.7 PREDIÇÃO DE GENES ALVO	35
4.8 <i>ENRIQUECIMENTO DE VIAS (GENE ENRICHMENT)</i>	35
4.9 COMITÊ DE ÉTICA.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	63
ANEXO B - MICRORNAS CONHECIDOS	64
ANEXO C - MICRORNAS COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA	99

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento normal da hematopoiese é direcionado por uma cascata de sinalizações do ciclo celular que se inicia com o estímulo de fatores de crescimento liberados no microambiente da medula óssea por células adjacentes. O conhecimento dessas interações células-microambiente, ainda não completamente elucidadas, permite o entendimento sobre o comportamento alterado de células tumorais e a liberação de estímulos que propiciam a iniciação e a progressão de doenças.

O comprometimento em alguma das etapas durante o desenvolvimento das células sanguíneas pode acarretar o acúmulo de células incapazes de se diferenciarem em células maduras ou o acúmulo de células quase maduras na medula óssea, situações que caracterizam leucemias, neoplasia que acomete crianças e adultos.

Os mecanismos genéticos desregulados responsáveis pela iniciação e pela progressão da leucemia ainda não foram totalmente esclarecidos. Para melhoria na qualidade do tratamento e o aumento da taxa de sobrevivência, busca-se o entendimento de quais fatores sofrem alterações e como contribuem para o desenvolvimento de neoplasias. O conhecimento possibilita criação de novos alvos terapêuticos e de novos protocolos de tratamento mais específicos.

1.1 HEMATOPOIESE

A medula óssea é um órgão hematopoiético, no qual acontece a formação das células sanguíneas, sendo estas derivadas de uma célula-tronco comum multipotente. Três linhagens celulares são resultantes da diferenciação desta célula

tronco: as plaquetas, as células vermelhas e as células brancas. As plaquetas participam do reparo de vasos lesionados e no auxílio ao processo de coagulação. As células vermelhas dão origem às hemácias ou eritrócitos, que são responsáveis pelos transportes de O₂ e CO₂ ligados à hemoglobina. As células brancas são responsáveis pela produção de leucócitos, que atuam no sistema imunológico combatendo as infecções. Os leucócitos são armazenados na medula óssea até que sejam necessários na corrente sanguínea para atuação nos processos imunológicos (1, 2).

As células-tronco multipotentes se diferenciam em progenitoras multipotentes, que se dividem em duas linhagens de células progenitoras: linfoide e mieloide. As células progenitoras comprometidas então se diferenciam em células maduras: da linhagem linfoide em células NK, células T, células B e célula dendrítica; da linhagem mieloide origina as células maduras como macrófago, eosinófilo, basófilo, plaquetas e eritrócitos (2).

Para ocorrer a hematopoiese é necessário haver um microambiente normal favorável, com a presença de fatores de crescimento responsáveis pelo estímulo à proliferação e à diferenciação das células imaturas, pela atividade funcional das células maduras, pela acomodação das células em desenvolvimento, pelas interações entre células de diferentes tipos, e entre as células e o microambiente (3).

A célula-tronco hematopoiética não passa diretamente de um estado multipotente para seu estado diferenciado final, ela sofre uma série de etapas de restrições. Essas etapas são correlacionadas com a mudança na expressão de genes específicos de proteínas regulatórias, as quais são necessárias para a produção de subgrupos diferentes de células sanguíneas. Apesar dessa diferenciação não estar totalmente elucidada nos níveis moleculares, sabe-se que enquanto os genes para diferenciação começam a ser ativados em algumas vias, o acesso a outras é desativado (4).

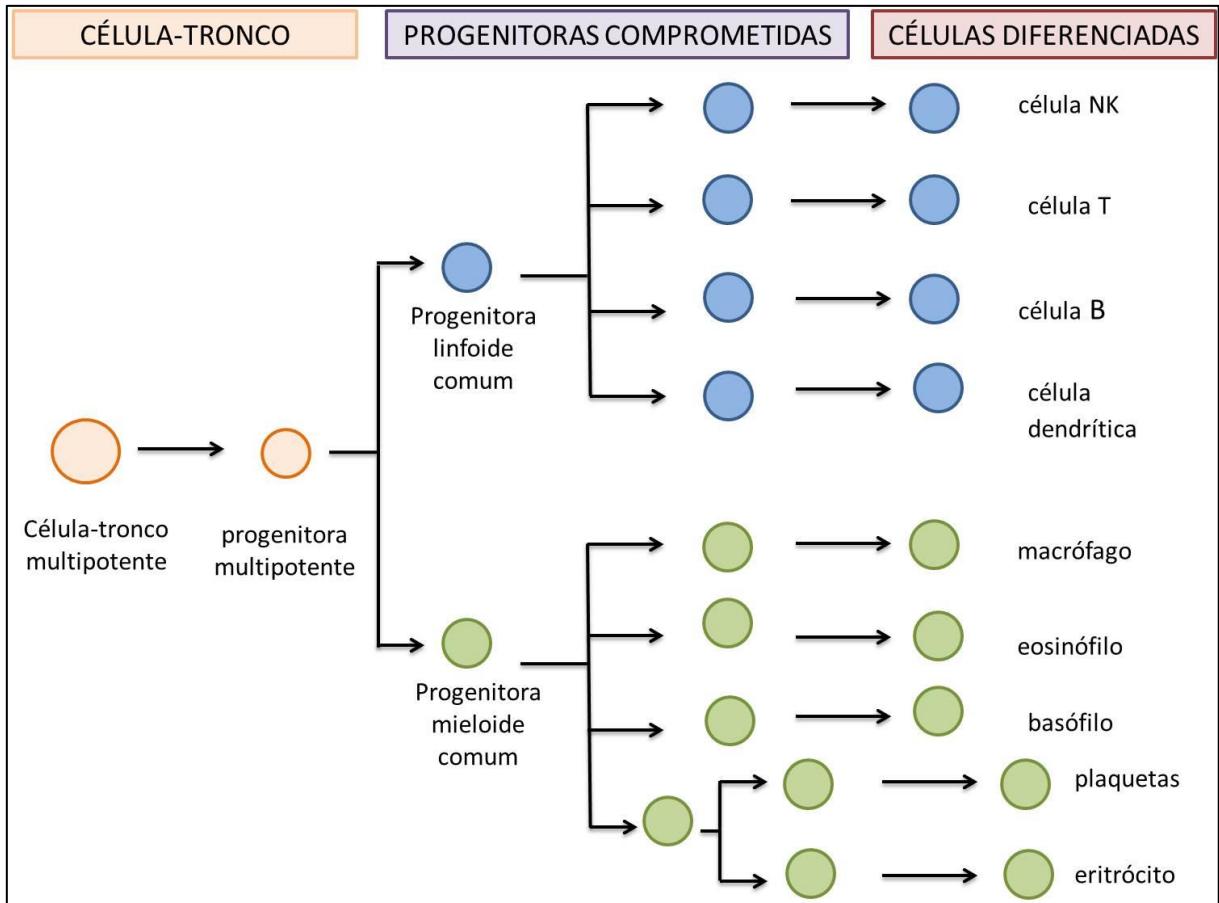


Figura 1 Esquema de hematopoiese. As células-tronco multipotentes se diferenciam em progenitoras multipotentes, que se dividem em duas linhagens de células progenitoras: linfoide e mieloide. As células progenitoras comprometidas então se diferenciam em células maduras: da linhagem linfoide em células NK, células T, células B e célula dendrítica; da linhagem mieloide origina as células maduras como macrófago, eosinófilo, basófilo, plaquetas e eritrócitos.

1.2 MICROAMBIENTE MEDULAR

O microambiente medular é uma estrutura complexa, consistindo de uma rede de tecido conjuntivo e uma variedade de tipos celulares, incluindo células tronco mesenquimais (MSC), osteoclastos, adipócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e matriz extracelular, que tem por função a sustentação das células hematopoiéticas e a produção de fatores de crescimento, de fatores ligantes e de outras substâncias,

algumas dessas com funções depressoras sobre a produção hematopoiética. A regulação da hematopoiese ocorre pela secreção de fatores de crescimento e pelas interações célula-célula e célula-estroma medular (3).

Na medula óssea normal, as etapas de proliferação e de diferenciação da hematopoiese são estritamente controladas pelo microambiente indutivo, em função da produção de glicoproteínas solúveis, citocinas, de sinais intracelulares iniciados, da adesão celular, que juntos controlam a mitose e a diferenciação das células hematopoiéticas (5).

As células tronco mesenquimais indiferenciadas são capazes de regeneração e de originarem diferentes linhagens celulares como adipócitos, osteócitos e fibroblastos, sendo também responsáveis pela expressão de RNA mensageiros (mRNA) que codificam genes de interleucinas (IL) 6 e 11, fator inibitório de leucemia (LIF), fator estimulante de formação de colônias de macrófagos (M-CSF), fatores de crescimento (SCF), fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF) e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (6).

Osteoclastos, derivados das células tronco mesenquimais, durante o processo de desenvolvimento do esqueleto produzem fatores de crescimento, incluindo os fatores estimulantes de colônia de granulócitos (6). Na hematopoiese, além da produção de fatores de crescimento que estimulam a diferenciação, atuam como nichos de reserva de células multipotentes (7).

Os adipócitos, também diferenciados das células-tronco mesenquimais da medula óssea, foram correlacionados com o microambiente medular no suporte de células linfoides e na secreção de leptina, uma citocina, responsável pela regulação do metabolismo de gordura (6).

A desregulação de qualquer um dos processos pode originar patologias. Sendo assim, o acúmulo de progenitores das linhagens linfóide ou mieloide, no microambiente medular, incapazes de se diferenciarem em células maduras ou o acúmulo de células maduras ou quase maduras na medula óssea caracterizam leucemias.

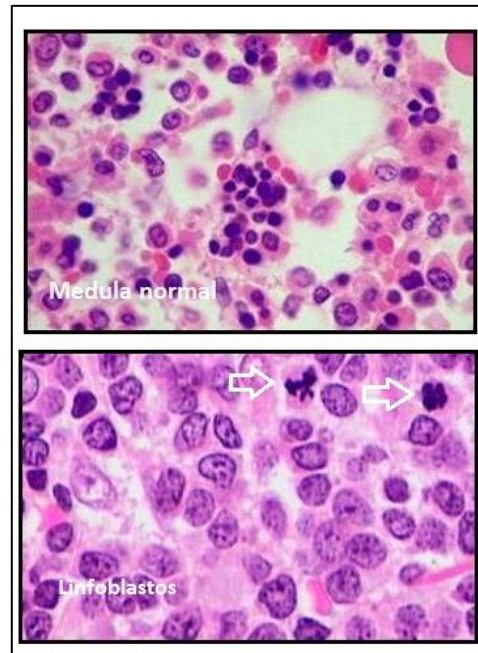


Figura 2 Microambiente medular. Lâminas histológicas da medula normal (foto superior), na inferior com seta indicando linfoblastos em desenvolvimento normal. Fonte: <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/medula-ossea/>

1.3 LEUCEMIA

A leucemia é uma neoplasia maligna, caracterizada pela produção exacerbada de precursores hematopoiéticos anormais na medula óssea. À semelhança do que ocorre durante a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas, as células leucêmicas podem apresentar características morfológicas da linhagem linfoide ou mieloide (8).

Existem diversos tipos de leucemias, cada uma com características distintas e tratamentos diferentes, sendo, desta forma, o termo leucemia uma designação muito ampla. Esta neoplasia pode ser classificada de acordo com o grau de maturação das células na medula óssea: leucemia aguda, quando constituída de células imaturas; leucemia crônica, quando caracterizada por células maduras. Pode ainda ser

classificadas como leucemias do tipo B ou T quando, respectivamente, a população de células neoplásicas é de Linfócitos T ou Linfócitos B (9).

O diagnóstico é baseado na análise morfológica das células do aspirado da medula óssea, normalmente retirado da crista íliaca. São aplicados testes de imunofenotipagem com uso de anticorpos para identificar o estágio de diferenciação e de citogenética de translocações de cromossomos (10, 11).

1.4 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

Dentre os tipos, a Leucemia Linfoide Aguda (LLA) é considerada o tipo mais grave e mais comum de câncer infantil, representando aproximadamente 25% dos casos e 75% dos casos de leucemia aguda em crianças, com pico de incidência em crianças de 2 a 5 anos de idade e com predominância do sexo masculino (12).

A LLA se caracteriza pelo aumento excessivo, na medula óssea, de linfoblastos anormais, que se assemelham morfológica e imunofenotipicamente a células precursoras das linhagens B e T (8).

A melhora do prognóstico deve-se à descoberta de medicamentos com eficaz ação antileucêmica e ao desenvolvimento de protocolos de tratamento com o uso combinado de quimioterápicos, possibilitando maior controle da doença. Os avanços na compreensão do funcionamento da célula leucêmica também foram fundamentais para a determinação da duração e da intensidade de cada etapa do tratamento (12, 13).

Por se tratar de uma doença com diversas origens, muitas pesquisas foram desenvolvidas ao longo dos anos para aprimorar os exames, os tratamentos e aumentar a taxa de sobrevivência. No entanto, devido ao grau de complexidade da doença, o estabelecimento de protocolo padrão de tratamento é muito difícil (14).

A classificação de risco se baseia em características clínicas e alterações presentes nas células leucêmicas. Pacientes com LLA são classificados como de alto ou de baixo risco quanto à idade, contagem de leucócitos e infiltração no sistema nervoso central (SNC). A estratificação dos grupos é necessária para adequação da intensidade e da dosagem dos medicamentos utilizados no tratamento (15). São considerados como alto risco os pacientes com idade menor que dois anos e maior que nove anos, contagem de leucócitos acima de 50 mil e infiltração no sistema nervoso central; no grupo de baixo risco estão os pacientes com idade entre dois e nove anos e leucócitos até 50 mil, sem presença de infiltração. Após o início do tratamento, se houver presença de blastos leucêmicos, os pacientes devem ser considerados de alto risco (16, 17).

1.5 ALTERAÇÕES GENÉTICAS

Dentre os casos de LLA, apenas cinco por cento estão relacionados com predisposições genéticas como Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, ataxia-telangiectasia, Síndrome de quebra de Nijmegen, radiação ionizante ou exposição a drogas quimioterápicas específicas; os outros permanecem desconhecidos (12).

Um dos mecanismos envolvidos na leucemogênese consiste na alteração de genes envolvidos com o controle do ciclo celular. Dentre esses estão os oncogenes, que codificam, em geral, proteínas envolvidas com a reprodução desordenada de células e com a resistência à apoptose (17). Mutações em sequências de DNA podem causar grandes variações estruturais no genoma, promovendo a ativação de oncogenes ou a inativação de genes com atividade supressora de tumor (18).

A presença de alterações cromossômicas tem grande importância no prognóstico. Dentre elas as translocações apresentam grande efeito, pois permitem que oncogenes, antes não ativos, possam ser ativados por promotores depois da fusão com outros genes. Além disso, variações em sequência podem alterar genes

que codificam enzimas metabolizadoras de drogas, transportadores, receptores e alvo de fármacos, resultando em diferenças farmacológicas durante o tratamento quimioterápico (12).

Alterações genéticas específicas, como ganho ou perda de cromossomos, translocações cromossomais, deleções e inativações de genes supressores de tumor são encontradas em 60 a 75% das células leucêmicas. O reconhecimento dessas alterações proporciona o entendimento sobre a patologia e a classificação de risco (10).

As alterações cromossômicas mais comuns, como hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos nos blastos leucêmicos e a translocação dos cromossomos 12 e 21 com a fusão do gene TEL-AML1, correspondem a aproximadamente 50% dos casos em crianças e representam um bom prognóstico. Enquanto maus prognósticos estão associados à presença da translocação t(9;22), conhecida como translocação Filadélfia ou BCR-ABL, e translocação t(4;11) com fusão do gene MLL-AF4 (16).

1.6 TRATAMENTO

Vários protocolos já foram propostos para tratamento de LLA, porém não há um protocolo padrão mundial estabelecido, ficando a determinação a critério dos países. No Brasil, grande parte dos centros de tratamento segue o protocolo fornecido pelo Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI-99). O tratamento com quimioterápicos é realizado em três etapas: indução, consolidação e manutenção.

A primeira, com duração de um mês, consiste na indução da remissão citológica, da recuperação medular e da proteção da doença no sistema nervoso central, buscando o retorno da hematopoiese à normalidade. Com a terapia de

indução cerca de 90% a 95% das crianças e 75% dos adultos atingem a remissão completa (9).

A segunda etapa, também chamada de intensificação, tem duração de cinco meses, visa à consolidação do estado de remissão, da proteção contra infiltração no SNC e da prevenção contra doença residual mínima (9).

A terceira etapa é realizada ao longo de dois anos de tratamento para manutenção da remissão.

1.7 MICROAMBIENTE TUMORAL

No microambiente tumoral, componentes presentes no estroma normal tornam-se desregulados na presença de células cancerígenas, favorecendo a sobrevivência dessas células, a progressão da doença e a resistência a drogas quimioterápicas. Alterações nos fatores de crescimento liberados no estroma medular podem modular o ambiente favorecendo a proliferação, diferenciação e maturação desordenada de células cancerígenas, inclusive inibindo apoptose (19-21).

Como em outras patologias, o microambiente da medula óssea quando alterado se torna permissivo ao desenvolvimento e progressão de leucemia. As interações entre as células leucêmicas e o estroma medular produzem fatores de crescimento, angiogênese, aumento de fibroblastos e sinais anti apoptóticos, o que torna o ambiente favorável inclusive à resistência ao tratamento (7).

A capacidade das células-tronco mesenquimais de produzir citocinas contribui para o desenvolvimento das células leucêmicas, porém, os níveis de alterações na produção dessas substâncias e das funções desses elementos em várias desordens hematológicas ainda permanecem incertos (6).

Ghosh *et al.* (2010) demonstraram a importância da comunicação entre as células cancerígenas e o microambiente através de microvesículas. Nesse estudo foi indicada a capacidade de fatores transportados em microvesículas de induzir aumento na produção de determinadas moléculas, as quais podem modular o microambiente em favor da sobrevivência das células tumorais, aumentando a resistência à quimioterapia no ambiente medular em pacientes com leucemia linfóide crônica.

Sugere-se o uso de biomarcadores em microambiente tumoral de medula com as seguintes finalidades: como indicadores de prognóstico, como preditivos de progressão da doença ou de sucesso do tratamento, para compreensão de resistência ao tratamento e para desenvolvimento de novos tratamentos (7).

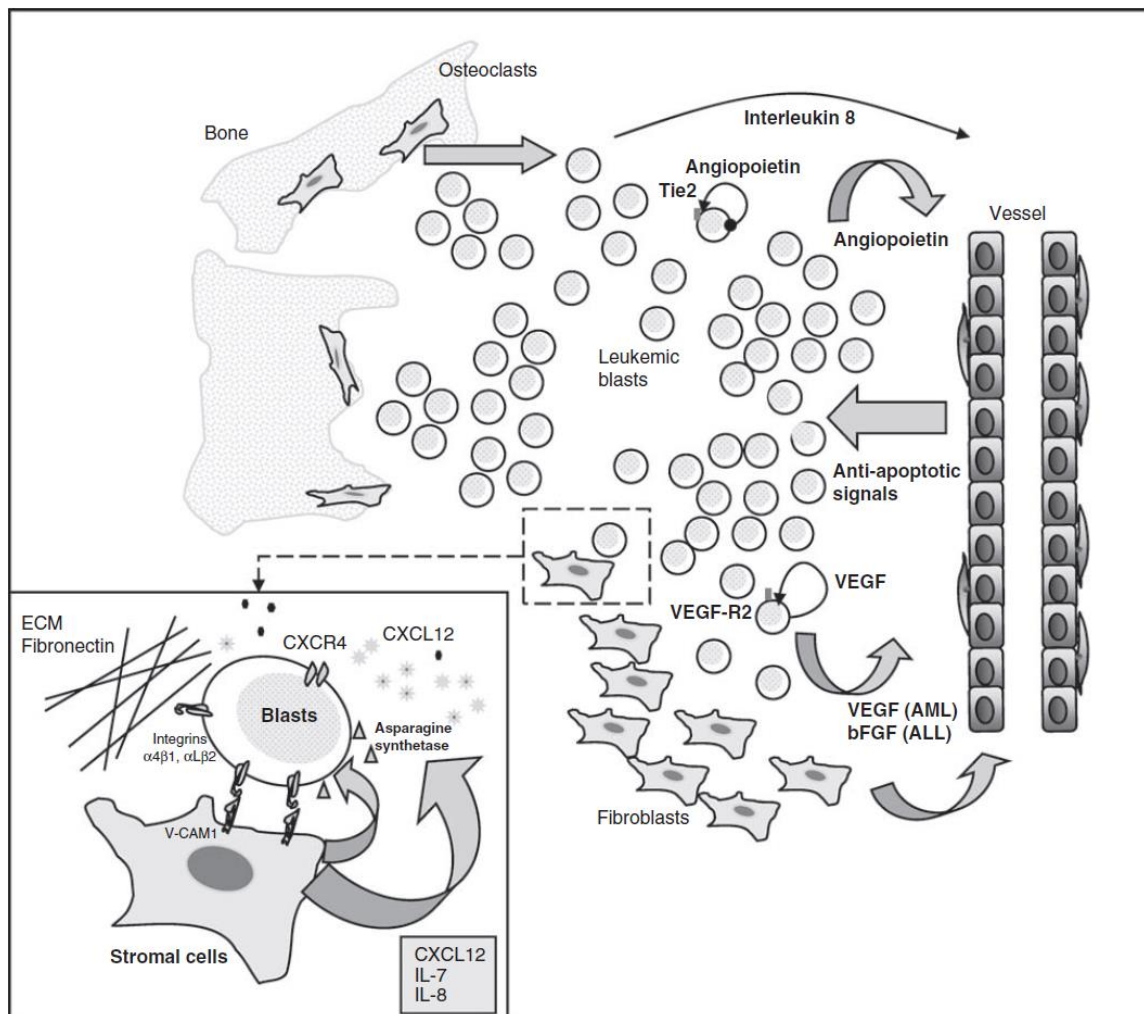


Figura 3 Microambiente tumoral e interações. Representação das interações entre blasts leucêmicos e o microambiente tumoral com a liberação de sinais que estimulam a proliferação descontrolada de

blastos e a adaptação dos mesmo ao microambiente tumoral até a migração para a circulação sanguínea. Adaptado de Ayala et al.

Recentemente, na última década, foi descoberto que parte da regulação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tumores pode ser feita por moléculas de RNAs não codificantes (ncRNAs) - chamados de RNAs pequenos (siRNAs), RNAs longos (lncRNAs) e microRNAs (miRNAs) -, tendo estes função regulatória em vários mecanismos celulares (22, 23).

1.8 microRNAs

microRNAs (miRNAs) são a classe de ncRNAs mais conhecida, com tamanho aproximado de 18 a 25 nucleotídeos, e participam da regulação pós-transcricional de proteínas, silenciando genes em animais, plantas e vírus (24). Amplamente expressos em organismos eucariotos, os microRNAs são responsáveis pelo controle negativo em grande variedade de processos biológicos, como controle celular, diferenciação, desenvolvimento e metabolismo (25-27).

Os microRNAs são codificados por genes que foram transcritos primeiramente sozinhos ou em arranjos, que são depois transformados em microRNAs maduros por uma complexa maquinaria celular envolvendo grandes complexos proteicos (27).

O gene que codifica microRNA é transcrito pela RNA Polimerase II formando uma estrutura secundária em forma de grampo (*stem loop*), denominado primicroRNA. Ainda no núcleo, são processados pelo complexo Drosha removendo a cauda desse microRNA primário, resultando no pré-microRNA, que em seguida é exportado para o citoplasma pela ligação com a proteína exportina-5. Uma vez no citoplasma, o pré-microRNA dissocia-se da proteína e se liga ao complexo Dicer, o qual remove o *stem loop*, formando um dúplex de RNA não simétrico de 20 a 25

nucleotídeos, sendo agora separados pela enzima helicase, originando o microRNA maduro. Os microRNAs maduros são incorporados a um complexo de ribonucleoproteína denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA-*induced silence complex* - RISC) que é guiado até o RNA alvo (Figura 4) (27).

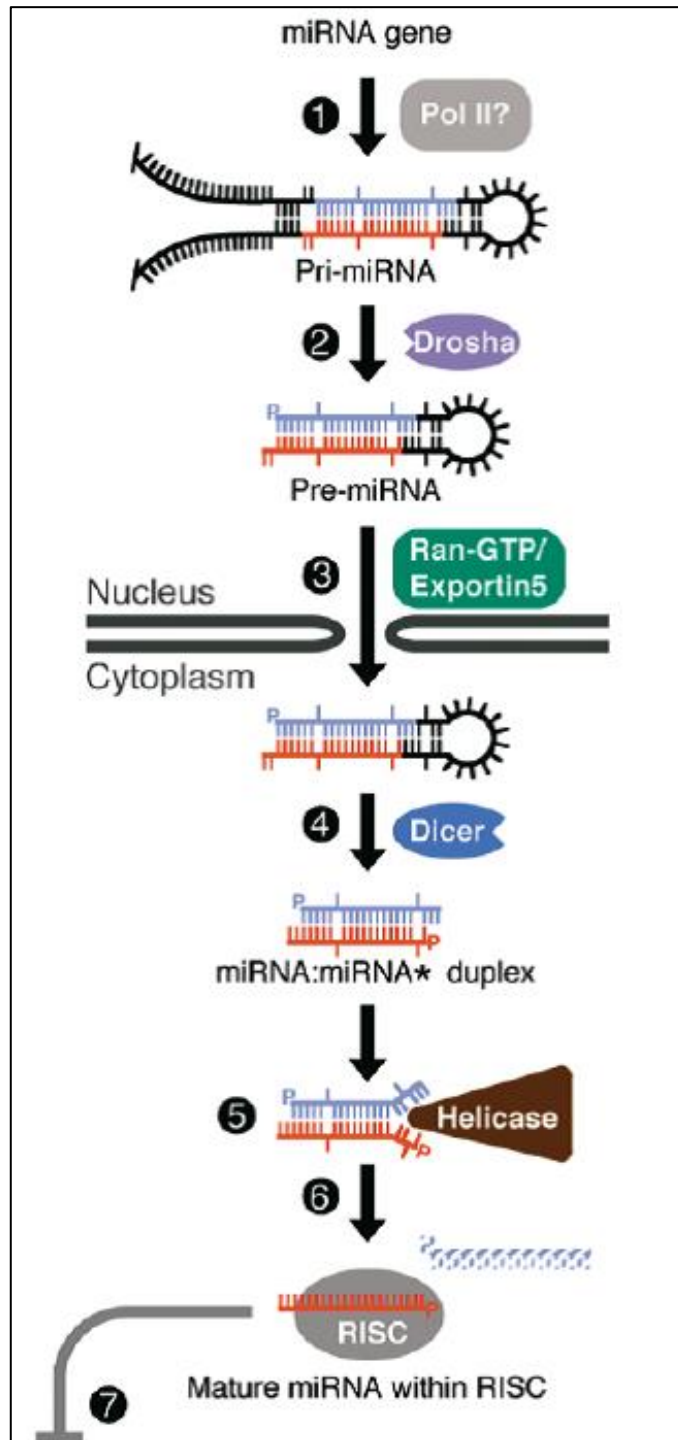


Figura 4 Biogênese de microRNAs. Transcrição do gene codificante de microRNA pela RNA polimerase II, formando a o pri-microRNA com formato de grampo, que é processado pela Drosha

para remoção da cauda, resultando no pré-microRNA, o qual é transportado para o citoplasma pela exportina-5. Após a dissociação, se liga ao complexo Dicer, para retirada da sequência em grampo, formando um dúplice não simétrico. A separação das fitas é feita pela helicase, originando o microRNA maduro que então se liga ao complexo RISC para ligação com o RNA alvo. Adaptado de Bartel et al. (27)

A regulação pós-transcricional exercida pelos microRNAs depende do grau de complementaridade com o RNA mensageiro-alvo na região 3' não traduzida (UTR). A sequência *seed* corresponde à sequência inicial na terminação 5' do microRNA, que sempre é constante e, por isso, é possível prever os possíveis sítios de ligações dos microRNAs com diversos RNAs mensageiros (RNAm). O processamento pós-inibição pela ligação do microRNA ao RNAm ocasiona a desestabilização do RNAm, em função do dobramento com proteínas, fato que impede a tradução dos RNAm pelos ribossomos, que posteriormente podem ser encaminhados para degradação (26).

Devido à sequência *seed*, diversos sítios de ligação são possíveis em diversos RNAm, portanto, um único microRNA pode afetar a expressão de centenas de genes e cada um deles, por sua vez, pode ser controlado por inúmeros microRNAs (28).

Três métodos são mais comumente utilizados para estudo de perfis de microRNAs, são eles: quantificação por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR), microarranjo (*microarray*) e sequenciamento de segunda geração (*next generation sequencing* – NGS).

A técnica de RT-qPCR, baseada na marcação fluorescente, permite quantificação simultânea da expressão de um gene em diversas amostras para um número limitado de genes e, ao utilizar microRNAs já conhecidos, possibilita um perfil mais individualizado para cada amostra. (29).

O microarranjo é um método em larga escala que faz análise paralela de centenas de microRNAs, comparando o nível de expressão entre as amostras e os tecidos normais utilizados para normalização (30). Portanto, a escolha entre as duas técnicas depende da quantidade de microRNAs alvo.

O sequenciamento de segunda geração, também conhecido como sequenciamento global, é a mais recente dentre as técnicas e tem o grande potencial de identificar novos microRNAs e de localizar mutações, sendo possível estimar a abundância de microRNAs baseada na frequência das sequências lidas, bem como ser realizada em várias amostras simultaneamente (30).

Todas as técnicas citadas possuem vantagens e desvantagens, porém, o desenvolvimento das três possibilitou a análise de mais de mil tumores, relacionando-os com alterações na expressão de microRNAs, características comuns e desenvolvimento de doenças (22).

1.9 microRNAs E NEOPLASIAS

Devido ao grande papel dos microRNAs no controle celular, foi descoberta sua importante função no mecanismo de desenvolvimento de neoplasias (23, 30), estando presentes nas mudanças de expressões nas fases na iniciação, progressão, metástase de tumores e inibição de apoptose (31, 32).

Diferenças na expressão de microRNAs foram encontradas primeiramente em amostras de sangue periférico de pacientes com leucemia linfóide crônica (33). Em seguida, diversos grupos relacionaram alterações na expressão de microRNAs quando comparados tumores com tecidos normais (30, 34). A alteração na atividade de microRNAs está relacionada às mesmas descritas para alterações em genes codificantes de proteínas, como rearranjos cromossômicos, ampliações ou deleções e mutações. Em alguns tumores, pode-se identificar variações tanto nos genes codificantes de proteínas como em microRNAs (22).

Segundo Borze et al. (2010), microRNAs atuam como oncogenes ou supressores de tumores de acordo com os genes alvo e cerca de metade deles estão localizados em áreas oncogênicas em cromossomos. De acordo com a

especificidade e os mecanismos regulatórios, um mesmo microRNA pode agir como oncogene em um tipo de tumor e ser um supressor de tumor em outro (35).

O estudo de Calin e Croce (22) propôs três mecanismos que tentam explicar a expressão diferencial de microRNAs em tumores: a localização de microRNAs em regiões do genoma associadas ao câncer; os mecanismos epigenéticos; e alteração no processamento do microRNA ou na maquinaria de transcrição. Quaisquer alteração nesses mecanismos podem levar a produção desregulada e originar disfunções celulares.

Wentz-Hunter e Potashkin (36), no estudo sobre carcinomas e microRNAs associados a alterações no microambiente, descreveram a possível transferência entre células de microRNAs contidos em microvesículas, que poderia alterar a quantidade de expressão dos microRNAs nas células receptoras no microambiente tumoral e, talvez, até torná-las tumorais.

1.10 microRNAs E LEUCEMIA

Desde a primeira identificação de microRNAs em câncer em leucemia por Calin *et al.* (33) diversas pesquisas buscaram identificar diferenças nas expressões de microRNAs presentes em células leucêmicas, comparando-os com a expressão em células normais em cultura, permitindo assim também diferenciar a expressão de microRNAs entre os tipos de leucemia e os respectivos subtipos (37-39).

Vários microRNAs já foram identificados como participantes do processo de desenvolvimento de leucemias. Calin *et al.* (40), utilizando microarranjo com 190 genes, identificou alteração de treze genes. Dentre esses genes, estão os que codificam os microRNAs hsa-miR-16-1 e hsa-miR-15a, descritos como supressores de tumor em leucemia linfóide crônica. A perda deles resulta no aumento de expressão do gene anti apoptótico BCL2. Mudanças como essas nas sequências de

microRNAs podem estar relacionadas com alterações em várias funções nas células leucêmicas.

Bhatia *et al.* (41) buscou avaliar a alteração de microRNAs nas regiões envolvidas em translocação genética característica de LLA tipo B, observou-se a atividade do hsa-miR-196b como supressora de tumor. Sugerindo seu uso como possível alvo terapêutico para o tratamento da neoplasia.

O estudo de Wang *et al* (42) relacionou a presença ou aumento da expressão, por PCR em tempo real, de microRNAs com a taxa de sobrevida de pacientes com leucemia aguda (AML e ALL). Foi observado que a expressão do hsa-miR-146a está inversamente relacionada com a taxa de sobrevida dos pacientes, sugerindo que esse microRNA possa ser utilizado como controle, como biomarcador, para diagnóstico, classificação de risco e progressão da doença.

O gene que codifica o microRNA 125b-1 está envolvido em translocações como, t(11;14)(q24;q32) relacionada a LLA tipo B. Esse microRNA, já descrito como participante do controle do ciclo celular, foi utilizado no estudo de Bousquet *et al.* (43) com ratos transplantados com células expressando este microRNA. Em resposta ao aumento de expressão, todos os ratos desenvolveram LLA tipo B e T, sugerindo forte relação com a hematopoiese

Fulci *et al.* (28) avaliou microRNAs em amostras de pacientes com LLA por microarranjo e identificou a estratificação entre as linhagens T e B, assim como também foi possível a discriminação entre subtipos.

Em seguida, Schotte *et al.* (37, 44), utilizando a técnica de sequenciamento global em amostras de diferentes tipo de leucemias, observou que diversos microRNAs tiveram seu perfil de expressão alterados na doença quando comparados com células normais e foram descobertos novos, e assim, inclusive puderam ser utilizados para caracterizar, diferenciar e classificar os diferentes subtipos de LLA.

A importância de microRNAs em LLA ainda não foi totalmente elucidada, pois a doença é heterogênea e caracterizada por várias anormalidades genéticas (37, 44)

1.11 microRNAs CIRCULANTES

Devido à presença de microRNAs em todos os tecidos já pesquisados e às alterações de expressões encontradas em tumores, sugeriu-se que microRNAs pudessem ser utilizados como biomarcadores em métodos menos invasivos para detecção e classificação de doenças. O grupo de Lawrie *et al.*(45) foi responsável pela primeira descrição de microRNAs circulantes livres de células (*cell-free microRNA*) em soro e por relacioná-los com marcadores tumorais. O estudo comparou os microRNAs miR-155, miR-210 e miR-21 no soro de pacientes com linfoma com os do grupo controle. Todos apresentaram expressão mais elevada quando comparados ao controle. O miR-21, em especial, foi associado à taxa de sobrevivência dos pacientes (45).

Mitchell *et al.* (46) detectaram a presença do microRNA circulante em plasma de sangue periférico de pacientes diagnosticados com câncer de próstata, sendo que o mesmo não foi detectado em indivíduos saudáveis. O estudo foi baseado em duas hipóteses: (i) a expressão de microRNAs desregulada em câncer; (ii) a expressão de microRNAs em câncer humano parece ser tecido-específica. (46).

Os mesmos autores testaram a estabilidade dos microRNAs presentes em plasma por PCR em tempo real introduzindo três microRNAs sintéticos de *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39, celmiR-54, e cel-miR-238). As sequências sintéticas foram introduzidas diretamente em plasma humano, antes e depois de adicionar solução desnaturante que inibe a ação de enzima degradante de RNA (RNase). Foi observado que os microRNAs inseridos antes da desnaturação sofreram ação de RNase e foram rapidamente degradados, enquanto os inseridos após desnaturação se mantiveram constantes. Esse estudo confirma a atividade de RNases no plasma e a degradação de microRNAs desprotegidos, sugerindo a existência de algum mecanismo de proteção durante o transporte de microRNAs no plasma. Um dos prováveis mecanismos consiste no transporte dentro de exossomos, que também foram encontrados nesse estudo (46).

O grupo de Zen e Zhang (47) utilizou a técnica de PCR em tempo real para detecção de microRNAs em amostras de soro de humanos, ratos, camundongos, cachorro e bovinos. Após a quantificação, observou-se que microRNAs em soro são altamente estáveis, mesmo em temperaturas e pH extremos, sendo facilmente recuperados após grandes períodos de congelamento. A característica mais peculiar é a resistência à digestão por RNases quando comparados com microRNAs de tecidos ou células.

Esse grupo foi o primeiro a reportar a utilização do sequenciamento de segunda geração para entender o perfil de expressão de microRNAs em soro humano. Foram utilizados dois conjuntos de amostras: de um grupo de indivíduos saudáveis e de outro grupo de indivíduos com tipos diversos de câncer. Os resultados demonstraram a heterogeneidade de microRNAs em ambos os tipos de amostras. Continuando o estudo, foram sequenciadas amostras separadas de pacientes de diferentes tipos de câncer, observando-se que cada uma delas apresentou um perfil específico de microRNAs. Também foram evidenciadas diferenças entre o perfil de microRNAs sequenciados do soro e o de células sanguíneas de pacientes com câncer de pulmão, o que não foi semelhante em indivíduos saudáveis. Esse achado sugere que alguns microRNAs de amostras cancerígenas não derivam de células sanguíneas e sim de tecidos associados ao câncer (47).

Desde então, vários grupos identificaram a presença de microRNAs em fluidos, tais como a saliva, urina, suor, soro e plasma de sangue periférico, placenta e em microambiente tumoral (48-50). A liberação de microRNAs para a circulação ainda não foi completamente elucidada, porém, três mecanismos foram previstos como possíveis: (i) secreção direta pelas células, similar ao que ocorre com hormônios; (ii) empacotamento por micropartículas específicas, como lipoproteínas; (iii) liberação em microvesículas, como exossomos (Figura 5) (47).

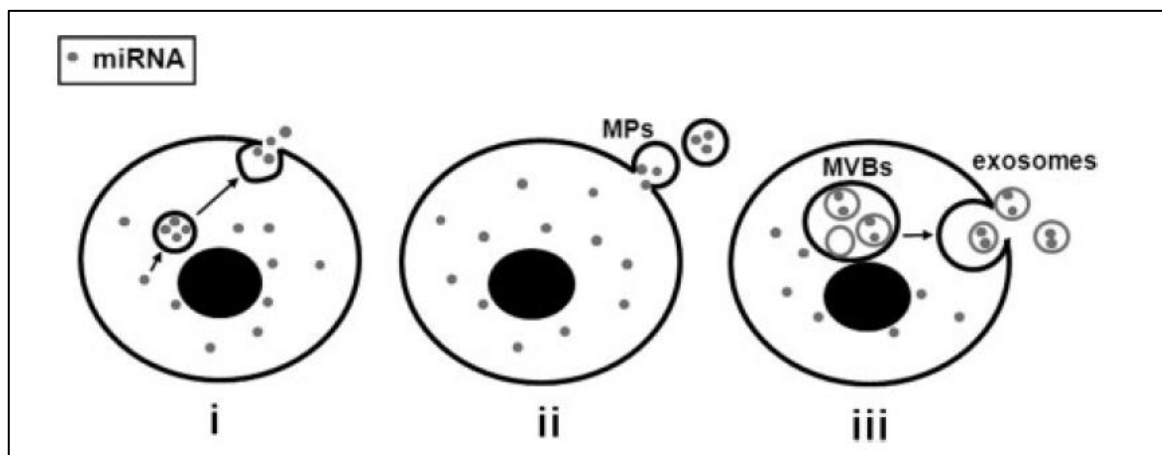


Figura 5 Mecanismos propostos para liberação de microRNAs na circulação (i) secreção direta pelas células, similar ao que ocorre com hormônios; (ii) empacotamento por micropartículas específicas, como lipoproteínas; (iii) liberação em microvesículas, como exossomos. Adaptado de Zen e Zhang (47)

Presume-se que parte destes microRNAs encontrados circulando dentro de microvesículas foram liberados para circulação em resposta a estímulos celulares (47). Assim, este tipo de transporte horizontal permite comunicação entre células, com transferência de microRNAs com atividade funcional que nas células receptoras podem alterar o perfil de microRNAs atuantes, promovendo alterações no funcionamento celular (51).

Mecanismos como esses, na hematopoiese, podem influenciar durante as etapas de proliferação, diferenciação e maturação celular das células vizinhas, modulando o estroma medular para o desenvolvimento das células sanguíneas.

1.12 microRNAs E BIOMARCADORES

Atualmente, os estudos de microRNAs em leucemias são feitos com amostras de sangue periférico e de aspirados de medula óssea, usualmente com blastos.

Pesquisas recentes mostram o uso de microRNAs como biomarcadores e propõem a detecção deles por métodos alternativos e menos invasivos, como sua extração em amostras de plasma e soro de pacientes (46).

O entendimento das mudanças ocasionadas pelos blastos leucêmicos no microambiente tumoral de doenças hematológicas proporciona a identificação de novos alvos quimioterápicos nos blastos leucêmicos e em outras células envolvidas no microambiente que, de alguma forma, participem da progressão da doença e da resistência aos tratamentos (6).

O mapeamento do perfil de microRNAs em tumores pode ser usado para classificá-los e diferenciá-los, bem como pode ser usado em estudos para criação de medicamentos que bloqueiam ou imitam a expressão e função dos microRNAs para tratamento de pacientes (31).

A descoberta de microRNAs que podem ser utilizados como biomarcadores permitem a utilização destes para determinação do grau de risco da doença, análise de progressão da doença, e mudança no protocolo de tratamento. Em função dessa relação, faz-se importante a análise da presença de microRNAs circulantes no microambiente tumoral que possam estar envolvidos no desenvolvimento de LLA em soro de medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Como objetivo geral, buscou-se avaliar o perfil de microRNAs em soro de medula óssea de pacientes com LLA tipo B durante três momentos do tratamento quimioterápico: ao diagnóstico e aos 15 e 29 dias após o início do tratamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliação global por sequenciamento de segunda geração dos microRNAs presentes nas três etapas de tratamento quimioterápicos;
- b) Relacionar a expressão de microRNAs com a classificação de risco dos pacientes.
- c) Relacionar a expressão de microRNAs com a resposta ao tratamento quimioterápico.

3. JUSTIFICATIVA

A expressão diferencial de microRNAs é objeto de estudo em várias doenças e nos últimos anos buscou-se a identificação de microRNAs que pudessem ser utilizados como biomarcadores em métodos menos invasivos para diagnósticos. Percebeu-se então a relação destes com o transporte horizontal permitindo a comunicação entre células. Nesse tipo transferência, microRNAs com atividade funcional são liberados de células e incorporados a outras que podem ter perfil de microRNAs alterados, promovendo alterações no funcionamento celular

O papel do microambiente na patogênese dos tumores hematológicos tem sido visado para identificação e validação de novas terapias que têm como alvo tanto as células leucêmicas como células em seu microambiente circundante.

A pesquisa em questão fornece um estudo sobre a presença de microRNAs no microambiente de medula óssea, aperfeiçoando o entendimento sobre os mecanismos que originam a leucemia linfóide aguda e as interações com o microambiente tumoral, com objetivo de esclarecer a alteração dos microRNAs durante as etapas de tratamento da doença e a possível relação deles com a resposta ao tratamento.

A identificação de microRNAs desregulados durante o processo do desenvolvimento da doença permite a utilização dos mesmos como biomarcadores para melhoria na determinação do grau de risco da doença, análise de progressão da doença e mudança no protocolo de tratamento.

A presença de microRNAs circulantes na medula óssea de pacientes com LLA mostra o potencial da sua utilização como regulador de microambiente tumoral e como biomarcador.

4. MÉTODOS

4.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Os quatro pacientes escolhidos para o estudo tiveram diagnóstico de leucemia linfóide aguda tipo B, confirmado por citologia e imunofenotipagem, tratados no Hospital de Apoio do Distrito Federal. Todos os dados pessoais como idade, sexo e os dados bioquímicos foram registrados em seus prontuários para estudos posteriores. As amostras de soro cedidas pelo hospital foram retiradas de aspirados de medula óssea dos pacientes pelos médicos responsáveis durante os três estágios do tratamento, sendo a primeira coleta para diagnóstico, a segunda após quinze dias do início do tratamento quimioterápico e a terceira após 29 dias. Todas as amostras foram coletadas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos responsáveis. Não houve necessidade de extração de quantidade extra, sendo o soro retirado após o uso das amostras para diagnósticos, cujo material é centrifugado e armazenado em freezer a -80°C .

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA total incluindo microRNAs nas amostras de soro de medula óssea foi realizada com kit miRNeasy específico para soro e plasma (Qiagen, NL), segundo o protocolo da empresa fabricante. Foram utilizados 200 μL de amostra de soro, adicionado 1mL de Qiazol Lysis Reagent vortexados por 10 seg e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 fmol de cada oligonucleotídeo sintético de RNA de *Caenorhabditis elegans* (Sigma, USA) (Tabela 1) de cel-miR-39, -54 e -238 para realizar a posterior normalização da variação das amostras, de acordo com o descrito por Mitchell *et al.* (46). Foram adicionados 200 μL de clorofórmio, agitado por 30 segundos e incubados em temperatura ambiente por 3 minutos, então centrifugados a 40C por 15 minutos a

12.000 x g para separação da fase orgânica e fase aquosa. A fase aquosa foi retirada, em média 750 µL, e armazenada em outro tubo de coleta, sendo adicionado em seguida 1.125 µL de etanol 100%. Após a mistura, 700µL de cada tubo foi transferido para a coluna fornecida pelo fabricante, mini spin miRNeasy, centrifugado por 15 seg a 8.000 x g em temperatura ambiente, o líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até o final do volume da amostra. As etapas seguintes consistem na lavagem da coluna com soluções tampão e na centrifugação à temperatura ambiente a 8.000xg. A primeira solução tampão, RWT, foi adicionada a coluna (700µL) para lavagem e centrifugação, o líquido restante foi dispensado. Seguido pela lavagem com tampão RPE, 500µL, também centrifugado e o líquido dispensado. A última lavagem foi feita com etanol a 80%, 500 µL, seguido de centrifugação por 2 minutos. Para secagem da membrana da coluna foi repetida a centrifugação por 5 minutos. Para eluição do RNA, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, adicionado 14 µL de água livre de RNAses diretamente na coluna e centrifugada por 1 minuto à velocidade máxima.

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos de microRNAs de *C. elegans* utilizados para normalização dos dados de RT-qPCR

microRNA	Tamanho (nt)	Sequência do oligonucleotídeo
cel-miR39	22	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
cel-miR54	24	UACCCGUAAUCUUCAUAAUCCGAG
cel-miR238	23	UUUGUACUCCGAUGCCAUUCAGA

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE RNA

As amostras eluídas foram quantificadas por fluorimetria no equipamento Qubit (Invitrogen).

As reações de quantificação foram seguidas de acordo com o manual do equipamento. Para garantir acurácia, antes de todas as quantificações o equipamento foi calibrado com os reagentes padrões. Resumidamente, preparou-se

uma solução de trabalho diluindo o reagente Quant-iT RNA em tampão Quant-iT, na proporção 1:200. As reações foram preparadas de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 - Protocolo utilizado de quantificação de RNA total no Qubit.

	Tubos com solução padrão	Tubos com solução das amostras
Volume de solução de trabalho	190µL	198µL
Volume de solução padrão	10µL	-
Volume das amostras	-	2µL
Volume total em cada tubo	200µL	200µL

Em seguida, todos os tubos foram agitados por 3 segundos e incubados por 2 minutos à temperatura ambiente. Logo após, inseridos no equipamento para leitura de concentração.

4.4 SEQUENCIAMENTO GLOBAL DE microRNAs

O sequenciamento de smallRNAs foi realizado pela empresa SeqMatic (CA, EUA) no equipamento MiSeq® (Illumina®). Foi utilizado o TruSeq Small RNA Sample Prep Kit para preparo e construção das bibliotecas das amostras, segundo o protocolo do fabricante. O RNA total, incluindo microRNAs, extraído das amostras foi ligado à adaptadores nas duas extremidades, 3' e 5', seguidos pela reação de transcriptase reversa para transformação em cDNA, sendo em seguida amplificado por PCR para melhorar a quantidade de fragmentos.

Os adaptadores se ligam as sequências complementares correspondentes na placa, *flow cell*, cada um dos fragmentos é amplificado em uma série de extensões em ponte, resultando em milhares de clusters únicos. O sequenciamento do cDNA ocorre por síntese, simultaneamente em vários clusters, base por base em paralelo, utilizando quatro terminadores reversíveis fluorescentes, pela detecção de fluorescência emitida por um nucleotídeo incorporado durante a síntese de uma nova fita de DNA baseada no fragmento de cDNA anteriormente fixado na placa. Em

cada ciclo, somente um nucleotídeo é incorporado à nova sequência, sendo que a fluorescência emitida específica determina qual dos nucleotídeos fluorescentes foi incorporado à sequência. Para que ocorra o próximo ciclo, é necessária a remoção do terminador do nucleotídeo incorporado anteriormente, permitindo que um novo nucleotídeo fluorescente seja incorporado à sequência e detectado pelo sistema (52-54). De acordo com o kit específico para sequenciamento de smallRNA, são feitos 50 ciclos, gerando conseqüentemente fragmentos com até 50 pares de base.

4.5 ANÁLISE DE microRNA SEQ

Após o sequenciamento, as sequências geradas foram submetidas à triagem inicial no programa FastQC (55) para avaliar a qualidade das sequências e identificação dos adaptadores utilizados no procedimento para remoção.

As sequências avaliadas como boas foram então submetidas ao programa de análise computacional miRDeep (56-58). Resumidamente, as sequências foram mapeadas com o genoma humano de referência, e então as estruturas secundárias dos microRNAs lidos são calculadas para verificar se há formação correta e a possibilidade da existência real dessas sequências, descartando os potenciais precursores que não parecem serem coerentes com a biogênese de microRNAs. Os microRNAs tidos como plausíveis são identificados com o banco de dados do miRBase (59), gerando assim uma lista de precursores de microRNAs, microRNAs maduros conhecidos e novos microRNAs preditos pelo programa.

A normalização foi feita por reads por milhão, onde se divide o valor de reads do microRNA de interesse pela soma de reads total da amostra e multiplica-se por um milhão. Para análise posterior, apenas os microRNAs com mais de 5 reads por milhão em pelo menos uma das etapas foi considerado.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística para comparação da expressão dos microRNAs entre as amostras foi aplicado o teste exato de Fisher utilizando o programa R (60). Apenas microRNAs com p-value inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como significantes.

4.7 PREDIÇÃO DE GENES ALVO

Para identificação dos genes preditos como alvos (*targets*) da atuação dos microRNAs com maior diferença estatística foi utilizada a ferramenta miRDB (61, 62), que localiza os prováveis sítios de ligação comparando a sequência do microRNA fornecido com os genes que codificam RNAm no genoma humano.

4.8 ENRIQUECIMENTO DE VIAS (GENE ENRICHMENT)

Para identificar as vias relacionadas como participantes da ação dos microRNAs encontrados no sequenciamento, os genes identificados como alvo dos microRNAs foram introduzidos na ferramenta disponível online DAVID (63, 64). O cálculo por algoritmos determina a relação dos genes alvos encontrados estarem relacionados com vias, *gene enrichment*.

4.9 COMITÊ DE ÉTICA

Esse projeto é aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde, aprovação número 185/09 (Anexo I).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o sequenciamento de smallRNA foram selecionados quatro pacientes com características semelhantes e com disponibilidade de amostras. Todos os pacientes foram diagnosticados com LLA tipo B, sendo os pacientes 1 e 3 classificados como de baixo risco e os 2 e 4 como de alto risco (Tabela 3). O sequenciamento foi realizado com três amostras de cada paciente, correspondendo a:

- etapa um : diagnóstico;
- etapa dois: quinze dias após o início do tratamento;
- etapa três: vinte e nove dias após o início do tratamento.

Tabela 3 - Características das amostras dos pacientes selecionados para sequenciamento de microRNAS

pacientes	imunofenótipo	leucometria diagnóstico	citogenética	biologia molecular	classificação de risco	status recaída
1	B	3390	normal	t(12;21)	baixo	não
2	B	6470	hiperdiplóide	0	alto	sim
3	B	5040	normal	0	baixo	não
4	B	58000	normal	0	alto	não

Foram extraídas amostras de quatro pacientes nas três etapas de tratamento quimioterápico. As amostras tiveram o RNA total extraído e quantificadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração as amostras antes do sequenciamento.

Amostras	Concentração RNA total
1a	29,2ng/μL
1b	2,97ng/μL
1c	13,7ng/μL
2a	23,7ng/μL
2b	2,3ng/μL
2c	15,3ng/μL
3a	69ng/μL
3b	5,72ng/μL
3c	25,9ng/μL
4a	16,3ng/μL
4b	7,28ng/μL
4c	10,4ng/μL

A grande variação de concentração entre as amostras pode ser decorrente de hemólise em algumas amostras durante a centrifugação realizada no hospital cedente para o processo de separação para os exames. Durante a centrifugação pode ocorrer o rompimento das células, o que pode acarretar a liberação de diversas moléculas para o plasma/soro, inclusive microRNAs.

Após o sequenciamento realizado pela SeqMatic (CA, EUA), vinte milhões de leituras de sequências (reads) foram geradas ao todo e submetidas ao controle de qualidade no FastQC (55). Após a triagem as sequências geradas foram submetidas à análise computacional pelo programa miRDeep (56-58) para retirada dos adaptadores e mapeamento com o genoma humano de referência. As sequências correspondentes a microRNAs foram separadas para continuar a análise. As demais sequências não mapeadas, incluindo outros RNAs (RNA ribossomal, small nuclear RNA and small nucleolar) foram armazenadas para análises futuras, assim como os microRNAs preditos como novos pelo miRDeep.

No total das sequências originadas, 42% correspondem a microRNAs conhecidos. Sendo assim, 946 microRNAs foram identificados nas três etapas de tratamento (Anexo II). Após a normalização por reads por milhão, apenas os microRNAs com mais de 5 reads por milhão em pelo menos uma das etapas foram considerados, restando assim 391. Dentre os microRNAs conhecidos, 254 aparecem nas três etapas de tratamento, 44 são exclusivos da primeira etapa, 17 exclusivos da segunda e 14 da terceira. Entre as etapas um e dois, são 12 microRNAs comuns;

entre as etapas um e três, são 39; e entre as etapas dois e três, são 11. Essa relação está representada no diagrama de Venn (Figura 6).

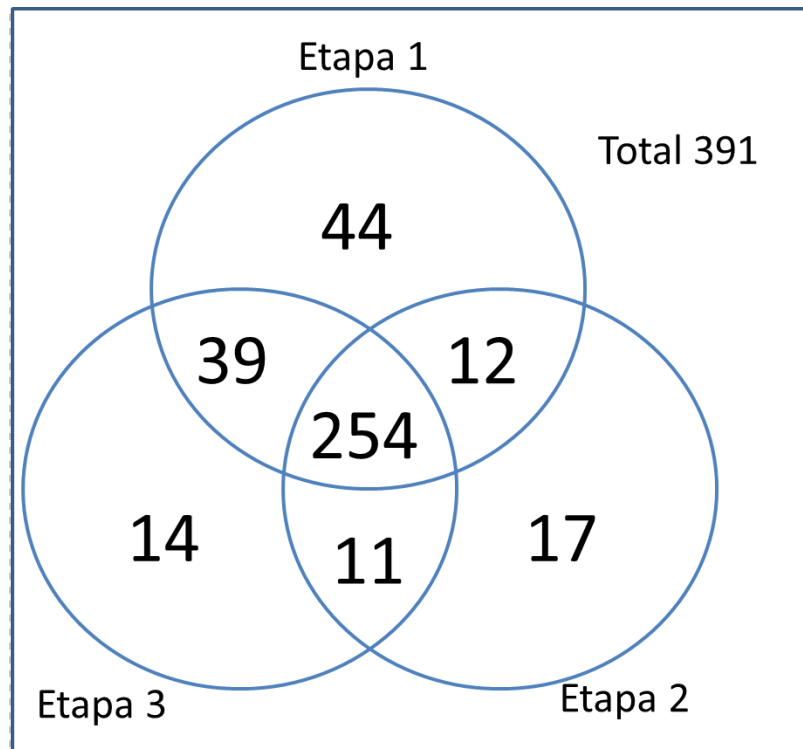


Figura 6 Diagrama de Venn. Representa a quantidade de microRNAs em comum entre as etapas de tratamento e a quantidade exclusiva de cada uma delas.

Do total de sequências mapeadas para microRNAs, a quantidade de leitura de sequências é muito variável entre os microRNAs e entre as amostras, fato que demonstra a expressão diferencial, o que é comum e esperado para esse tipo de estudo. Os dez microRNAs com maior número de leitura de sequências nas fases de tratamento foram hsa-miR-486-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-378a-3p (Tabela 5).

Quando comparadas as quantidades de reads dos 20 microRNAs mais expressos entre os quatro indivíduos na fase um (diagnóstico), pode-se observar que a quantidade de reads apresentaram grande variação, alguns aumentando e outros diminuindo (Gráfico 1). Acredita-se que, devido à heterogeneidade da doença, os pacientes não apresentam perfil semelhante de expressão.

Tabela 5 - Vinte microRNAs com maior número de leitura de sequências por fase de tratamento. Quantidade de *reads* normalizadas por milhão dos quatro pacientes nas três etapas de tratamento.

microRNA	Fase 1				Fase 2				Fase 3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
hsa-miR-486-5p	10111	278975	74423	63299	405501	402887	458747	432529	119213	588844	192721	458297
hsa-miR-181a-5p	300972	124847	51964	343872	17911	10253	21326	77379	15520	5842	29344	11062
hsa-miR-22-3p	13781	53935	105329	9544	85978	108864	53573	36914	112289	49408	184260	64370
hsa-miR-16-5p	52319	76266	113414	99910	44204	29556	37254	68994	102289	26699	55027	68543
hsa-miR-10b-5p	17291	40786	46753	12929	71401	80975	122965	44592	65304	40696	46537	108224
hsa-miR-423-5p	38451	40199	92707	37893	59796	45715	97794	51747	33020	53172	69952	59817
hsa-miR-451a	14975	18409	55766	41509	19738	19317	14722	74911	26190	10109	81787	26314
hsa-miR-142-5p	31670	35855	26797	44076	11059	9981	9570	29548	13352	6426	16473	6654
hsa-miR-191-5p	12769	46022	28439	32646	6710	8338	14154	6527	12683	10936	22165	24669
hsa-miR-378a-3p	6615	12398	17060	906	25930	28002	9763	568	52771	20819	15218	13831
hsa-miR-143-3p	5288	11740	13473	1385	10868	20776	9376	2710	81395	9925	8017	10909
hsa-miR-21-5p	56340	11506	26574	4134	14709	9232	6302	3397	34293	4012	8144	4238
hsa-miR-146a-5p	22086	21837	9734	89109	884	1395	2279	9901	817	472	3621	2834
hsa-miR-25-3p	4802	13267	10076	6097	21208	18753	15991	11837	12962	20854	12777	12809
hsa-miR-186-5p	22571	15403	28192	19382	5092	5567	5492	4773	10348	3025	25908	10559
hsa-miR-10a-5p	3344	8030	21722	5883	12046	12873	18035	14238	7974	3703	21015	20123
hsa-miR-103a-3p	18533	14042	4267	1737	17837	20668	10356	7117	23427	13355	4717	4992
hsa-miR-92a-3p	7484	9533	7226	1883	14888	16133	3282	10260	12260	30061	4259	7232
hsa-miR-107	12607	12257	2094	1166	16290	18690	9820	6812	18178	11620	2557	4111
hsa-let-7i-5p	28108	7937	12589	4421	8651	10770	3538	2154	18731	4379	12257	2477

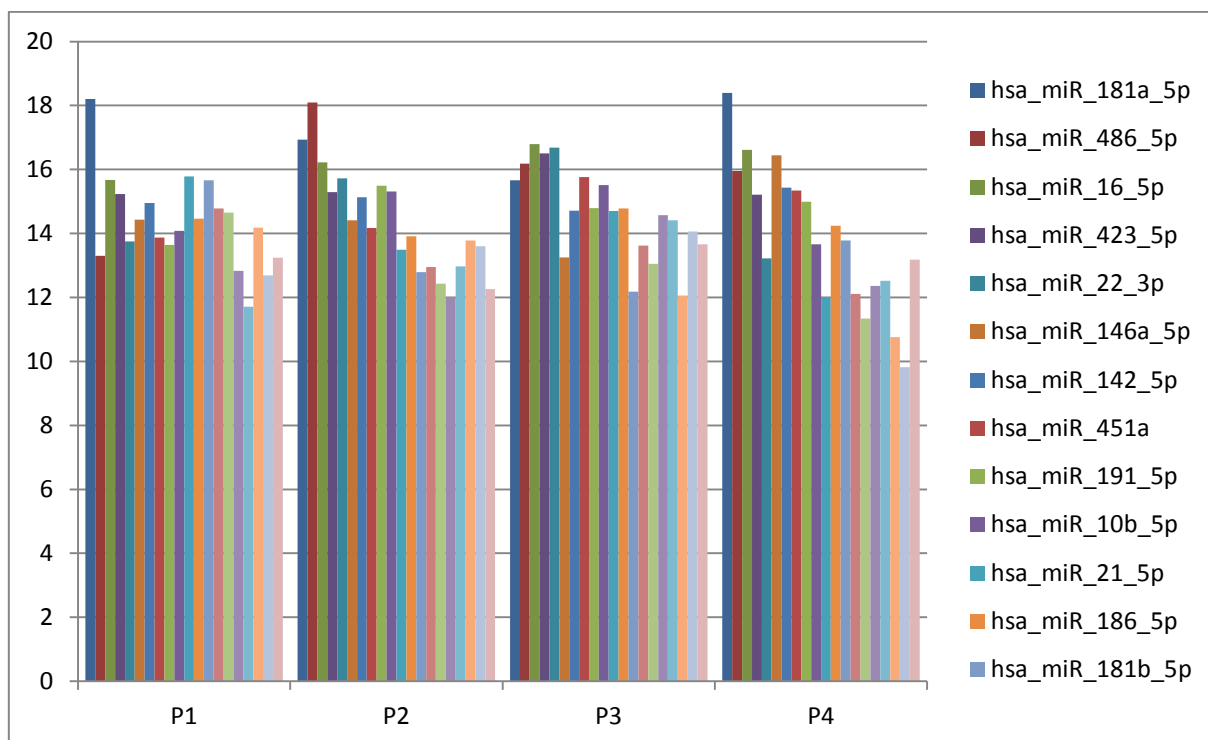


Gráfico 1 Alteração dos vinte microRNAs mais expressos entre os pacientes na primeira fase do tratamento.

Para avaliar se houve agrupamento das amostras entre as fases de tratamento, foi feita análise de componente principal (PCA) (Figura 7). As amostras da fase um, diagnóstico, apresentaram comportamento semelhante ao relacionado no gráfico anterior, formando um agrupamento das quatro, porém um pouco distante devido à heterogeneidade da quantidade de reads em cada uma delas. Todas as amostras da fase dois se agruparam e estão próximas, o que pode ser entendido pela relação do perfil de expressão semelhante entre elas. Enquanto as amostras da fase três estão dispersas, formando dois grupos: pacientes 1 e 3 estão próximos ao do grupo da primeira fase, amostras dos pacientes 2 e 4 estão próximas as amostras da fase dois. Pode-se relacionar os agrupamentos diferentes com a diferença do perfil de expressão e com a classificação de risco dos pacientes, sendo o 1 e 3 classificados como de baixo risco e 2.e 4 como de alto risco.

Em relação ao perfil de expressão de microRNAs, observa-se um grupo aglomerado, que corresponde a perfis semelhantes. Outros sete microRNAs estão dispersos, infere-se que a distância é causada pela diferença de expressão com os demais. O miR-486-5p, o qual apresentou maior quantidade de reads, também

aparece como o mais distante do grupo. Seguido pelos microRNAs 181a-5p, 16-5p, 423-5p, 22-3p, 10b-5p e 451a.

Para verificar se a variação na quantidade de leitura de sequências é significativa entre as etapas de tratamento, aplicou-se o teste estatístico exato de Fisher. Foram considerados para análises posteriores microRNAs com p-values inferiores a 0,05. Sendo assim, 258 microRNAs apresentaram valores de p-value significativo da primeira para a segunda etapa do tratamento, 199 com valores significativos na comparação da primeira etapa com a segunda e 237 diferencialmente expressos entre a segunda e a terceira etapa (Figura 8 e Anexo III).

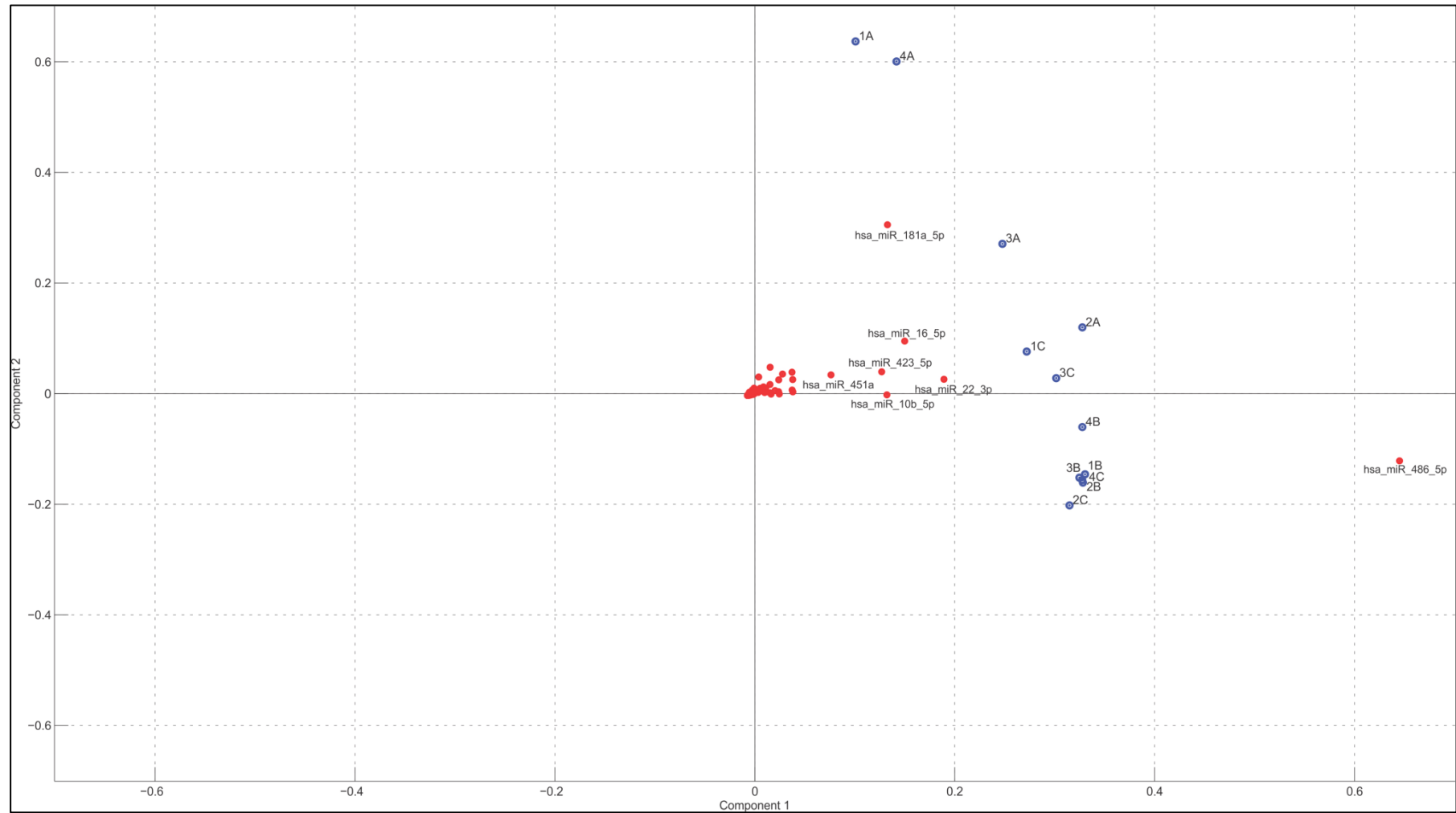


Figura 7 Análise de agrupamento das amostras. O gráfico de componente principal (PCA) demonstra o agrupamento das amostras (azul) em dois grupos principais, na parte superior as quatro amostras da primeira fase e duas amostras da terceira fase, na parte inferior as amostras da segunda e terceira fase de tratamento. Em vermelho os microRNAs, o aglomerado central representa microRNAs com perfil de expressão similar, enquanto os dispersos apresentaram padrões diferentes.

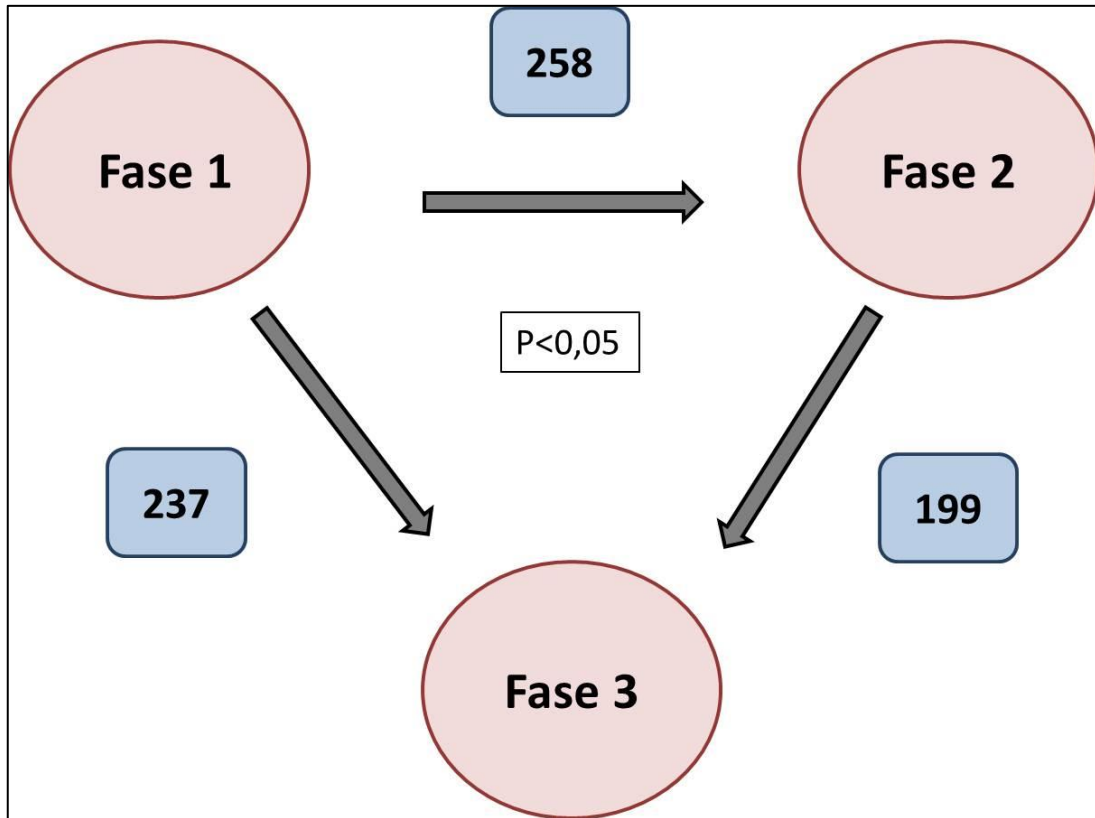


Figura 8 Diagrama com a quantidade de microRNAs com diferença significativa entre as etapas do tratamento.

A correlação entre as amostras com o perfil microRNAs que apresentaram diferença significativa nas três fases foram identificados em cluster hierárquico (Figura 9). O resultado foi semelhante ao visto anteriormente no PCA, com a divisão das amostras em dois grandes grupos de acordo com as semelhanças entre eles. À direita, estão as amostras pertencentes à primeira fase (1a, 2a, 3a e 4a), e estão presentes também duas amostras da fase três (1c e 3c), sugerindo mais uma vez o perfil de expressão similar entre elas com as amostras do diagnóstico. O segundo grande grupo, à esquerda, representa as amostras da segunda e da terceira fase de tratamento.

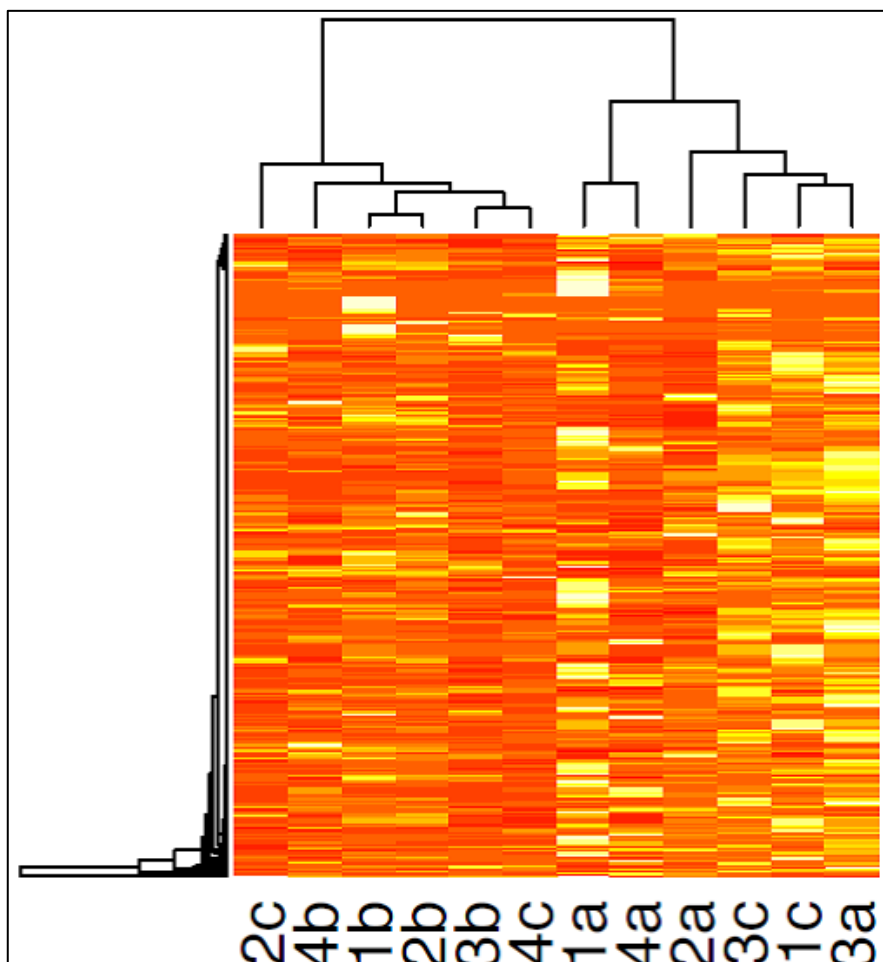


Figura 9 *Heat map* dos microRNAs com p-value <0,05, com a divisão das amostras em dois grandes grupos de acordo com as semelhanças entre eles. À direita, estão as amostras pertencentes à primeira fase (1a, 2a, 3a e 4a), e estão presentes também duas amostras da fase três (1c e 3c).

Entre as etapas de tratamento foram selecionados os cinco microRNAs com diferença mais significativa dentre os descritos acima, isto é, os microRNAs dentre o grupo com valores de p inferiores 0,05 com valores mais próximos de zero. Nota-se que os microRNAs com maior significância são os mesmos entre todas as etapas e são mesmo observados distantes do grupo aglomerado na análise por PCA, são eles: hsa-miR-486-5p; 22-3p; 10b-5p; 423-5p, diferindo apenas em um, hsa-miR-451a, entre a primeira e a terceira etapa (Figura 10). O microRNA 181a-5p que apareceu na análise por PCA como participante do grupo disperso apesar de não aparecer entre os 5 primeiros, está entre os dez microRNAs com diferença mais significativa entre as fases um e dois e entre as fases um e três, porém não quando comparado entre as fases dois e três.

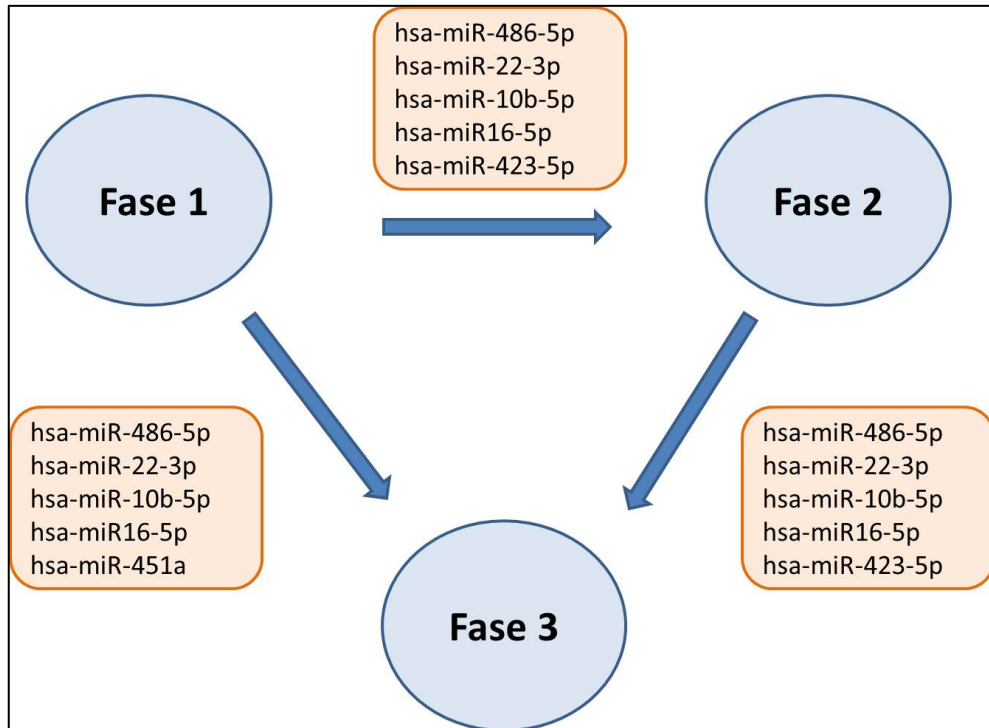


Figura 10 Os cinco microRNAs com p-value mais significativos entre as fases de tratamento

O microRNA 486-5p, que apresentou a maior quantidade de *reads*, também foi o classificado como aquele que apresentou a maior alteração significativa entre as fases. Nos quatro pacientes houve aumento de expressão da primeira para a segunda fase. No seguimento do tratamento, isto é, da fase dois para a três, os pacientes 1 e 3 tiveram seus níveis de expressão decaídos, o que pode ser explicado pela similaridade da classificação de risco igual para ambos. O paciente 2, em oposição aos demais, apresentou crescimento de expressão da segunda para a terceira, o que pode ser relacionado com a recaída da doença. O paciente 4 apresentou um pequeno aumento de expressão entre as fases dois e três (Gráfico 2).

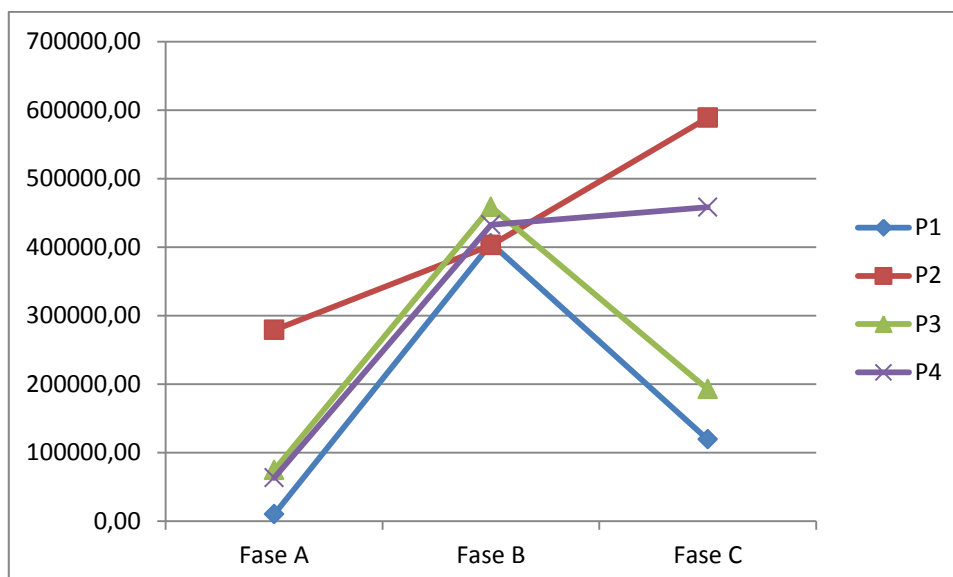


Gráfico 2 Alteração do miR-486-5p ao longo das fases de tratamento (P corresponde a paciente e os números 1, 2, 3 e 4 a cada paciente).

Ao todo, 155 genes foram preditos como alvo da ação do miR-486-5p. O *gene enrichment* dos genes preditos foram relacionados a vias como melanoma, câncer de próstata, vias de câncer, via mTOR e gliomas (Tabela 6)

Tabela 6 - *Gene enrichment* dos genes preditos como alvos do miR-486-5p.

Termo	Quantidade	%	p value	Fold Enrichment	Exato de Fisher p value
Melanoma	5	3.2	2.9E-3	8.1	3.3E-4
Cancêr de Próstata	5	3.2	6.4E-3	6.5	9.3E-4
Vias em Câncer	9	5.8	5.5E-3	3.2	1.6E-3
Via mTOR	3	1.9	7.1E-2	6.7	9.9E-3
Glioma	3	1.9	9.9E-2	5.5	1.7E-2

Nas colunas: o termo se refere a via relacionada com os genes alvos, a quantidade com quantos genes estão relacionados a essa via, a porcentagem (%) de quantos genes do total estão relacionados com a via, p value corresponde ao de significância, fold enrichment diz sobre o quão essa via está relacionada com esse genes e por último mais um teste estatístico de Fisher para avaliar a significância.

Como predita a relação do microRNA 486-5p com câncer pela análise se *gene enrichment*, em um estudo com blastos de pacientes com leucemias agudas e doadores saudáveis, o microRNA 486-5p foi descrito por apresentar menor nível de expressão quando comparado com o perfil em blastos saudáveis (65). Em oposição, os níveis encontrados no presente estudo foram os mais altos, aumentado entre a

primeira e segunda fase, com queda da segunda para a terceira, com exceção do paciente 2, que continuou aumentando.

Em outro câncer, o mesmo microRNA foi relacionado por Hu *et al.* (66) e Wang *et al.* (67) como possível preditor de sobrevida para pacientes com câncer de pulmão. No primeiro estudo, os níveis de expressão estavam elevados no grupo de pacientes com baixa taxa de sobrevida quando comparados ao grupo de alta taxa. No segundo, verificou-se que a supressão do gene que codifica o microRNA está relacionada com a progressão e metástase tumoral. Portanto, sugere-se que a queda da expressão desse microRNA ao longo do tratamento possa ser utilizada como preditor de sucesso, já que na única amostra em que o padrão foi diferente, aumentado o nível de expressão, o paciente teve recaída da doença. Assim, pode-se utilizar o microRNA 486-5p como biomarcador de sucesso de tratamento.

O microRNA 22-3p não apresentou padrão de expressão entre os pacientes durante as fases de tratamento (Gráfico 3). Para este microRNA, foram preditos como alvos 249 genes, que foram relacionados com as vias *long term depression*, *gap junction* e endocitose (Tabela 7). Esse microRNA já foi relacionado entre os cinco microRNAs mais presente em exossomos por Huang *et al.* (68). Enquanto no estudo de Song *et al.* (69) os resultados sugeriram a potente atuação como proto-oncogene. Sendo assim, o aumento da expressão do microRNA 22-3p foi descrito como mau prognóstico, com baixa taxa de sobrevida dos pacientes que apresentaram. Como no estudo descrito aqui não houve padrão similar entre nenhuma das amostras, portanto não foi possível inferir nenhuma dessas funções a esse microRNA.

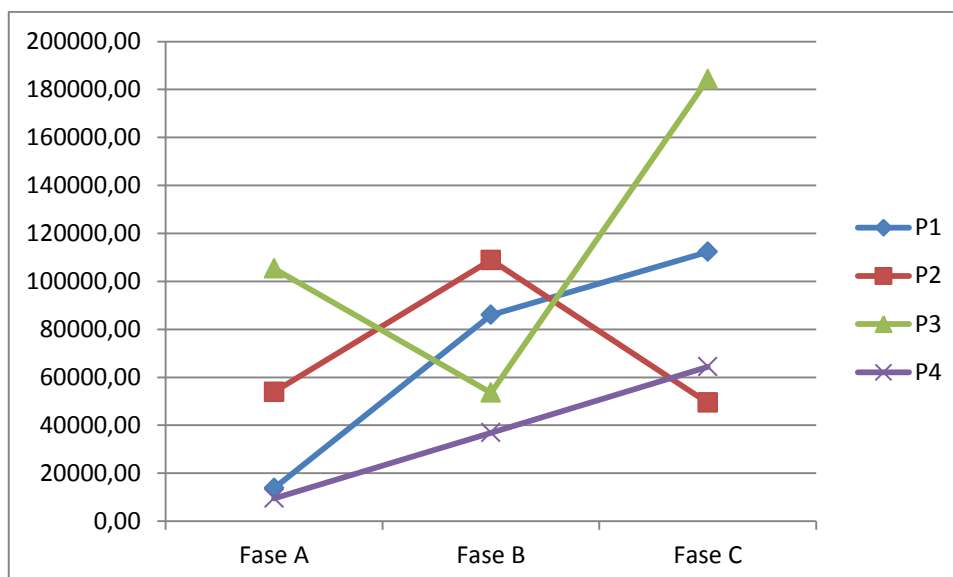


Gráfico 3 Alteração do microRNA 22-3p ao longo do tratamento (P corresponde a paciente e os números 1, 2, 3 e 4 a cada paciente)

Tabela 7 - *Gene enrichment* dos genes preditos como alvos do miR-22-3p

Termo	Quantidade	%	p value	Fold Enrichment	Exato de Fisher - p value
Long-term depression	5	2.0	1.3E-2	5.3	2.3E-3
Junção Gap	5	2.0	3.1E-2	4.1	6.8E-3
Endocitose	6	2.4	9.9E-2	2.4	3.8E-2

Nas colunas: o termo se refere a via relacionada com os genes alvos, a quantidade com quantos genes estão relacionados a essa via, a porcentagem (%) de quantos genes do total estão relacionados com a via, p value corresponde ao de significância, fold enrichment diz sobre o quão essa via está relacionada com esse genes e por último mais um teste estatístico de Fisher para avaliar a significância.

O microRNA 10b-5p, como o anterior, não apresentou similaridade entre os pacientes ao longo das etapas de tratamento (Gráfico 4). Dos 164 genes preditos como alvo de regulação desse microRNA, não houve nenhuma relação descrita de vias.

Mesmo não relacionado a alguma via, esse microRNA já foi descrito com aumento de expressão em blastos leucêmicos de pacientes com leucemia mieloide aguda quando comparados com blastos normais (70). No estudo de Lin *et al.* (71) em gliomas, a inibição do microRNA 10b diminuiu a progressão, invasão, angiogênese e metástase tumoral. Ainda não se sabe da atuação desse microRNA em LLA, mas pode ser considerado como um microRNA de interesse, sendo

necessário estudos funcionais para identificar os genes alvos para utilização como alvo terapêutico.

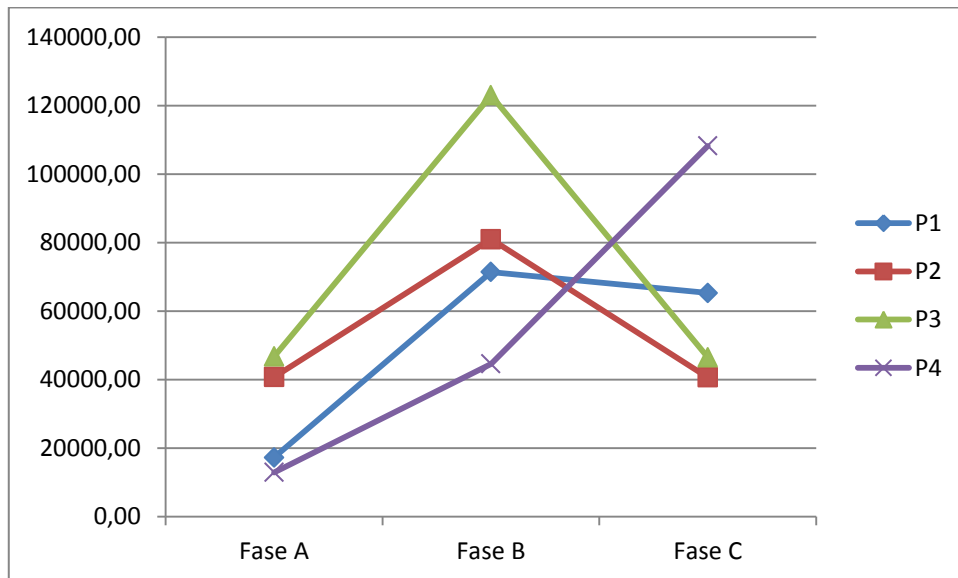


Gráfico 4 Alteração do microRNA 10b-5p ao longo do tratamento (P corresponde a paciente e os números 1, 2, 3 e 4 a cada paciente).

O microRNA 16-5p, mesmo não apresentando valores semelhantes, expressou comportamento parecido com decaída da primeira para a segunda fase de tratamento. Nos pacientes 1 e 3, houve aumento de expressão da fase 2 para 3, o que pode ser explicado pela classificação de risco igual para ambos, enquanto nos pacientes 2 e 4, a expressão foi diminuída levemente. Para o miR-16-5p, 594 genes foram preditos como alvo e relacionados com as vias em câncer (Tabela 8)

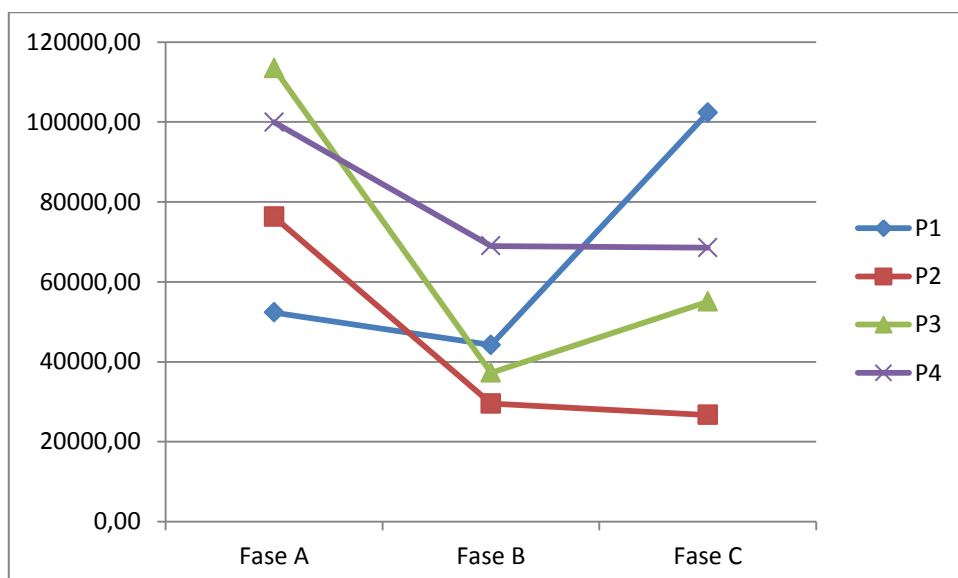


Gráfico 5 Alteração microRNA 16-5p ao longo do tratamento (P corresponde a paciente e os números 1, 2, 3 e 4 a cada paciente).

Tabela 8 - *Gene enrichment* dos genes preditos como alvos do miR-16-5p

Termo	Quantidade	%	p value	Fold Enrichment	Exato de Fisher p value
Vias em Câncer	23	3.9	1.6E-3	2.0	7.6E-4
<i>Uniquitin mediated proteolysis</i>	13	2.2	2.4E-3	2.8	7.8E-4
<i>ether lipid metabolism</i>	6	1.0	6.2E-3	5.0	1.1E-3
<i>insulin signaling pathway</i>	12	2.0	6.2E-3	2.6	2.2E-3
<i>neurotrophin signaling pathway</i>	11	1.9	9.5E-3	2.6	3.4E-3

Nas colunas: o termo se refere a via relacionada com os genes alvos, a quantidade com quantos genes estão relacionados a essa via, a porcentagem (%) de quantos genes do total estão relacionados com a via, p value corresponde ao de significância, fold enrichment diz sobre o quão essa via está relacionada com esse genes e por último mais um teste estatístico de Fisher para avaliar a significância.

Dentre os primeiros microRNAs descritos por Calin *et al.* (33) está o miR-16, descrito como supressores de tumor em leucemia linfóide crônica. A perda dele, em conjunto com o miR-15, resulta no aumento de expressão do gene anti apoptótico BCL2. A relação com a LLA ainda não foi elucidada, necessitando também de estudos funcionais que direcionem se o RNAm que sofre inibição é o mesmo que em LLC. É possível ver que nos pacientes do presente estudo, três deles apresentaram uma queda seguida por um aumento na expressão, exceto do paciente que teve recaída da doença. Com estudos funcionais será possível entender se há relação da diminuição da expressão com a inibição de apoptose e recaída da doença.

Na expressão do microRNA 423-5p pode-se observar a estratificação dos pacientes por classificação de risco. Os pacientes 1 e 3 (baixo risco) apresentaram comportamento semelhante, aumentando a frequência de reads da primeira para a segunda fase, seguidos pela diminuição da segunda para a terceira fase. Enquanto isso, os pacientes 2 e 4 (alto risco) tiveram a expressão levemente aumentada durante todo o tratamento quimioterápico (Gráfico 6). Foram identificados 166 genes como alvos para atuação desse microRNA, que foram relacionados com as vias (Tabela 9)

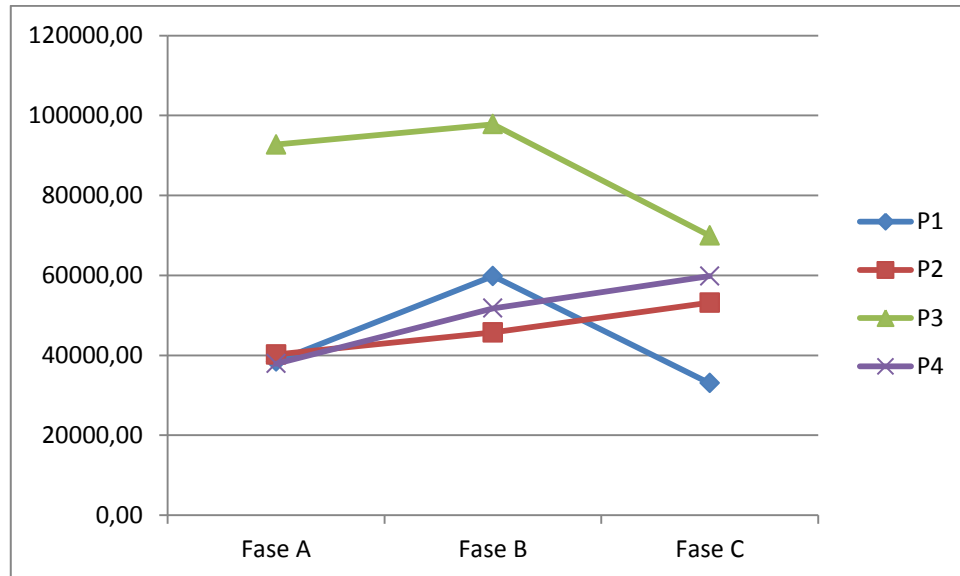


Gráfico 6 Alteração do microRNA 423-5p ao longo do tratamento (P corresponde a paciente e os números 1, 2, 3 e 4 a cada paciente)

Tabela 9 - *Gene enrichment* dos genes preditos como alvos do mir423-5p

Termo	Quantidade	%	p value	Fold Enrichment	Exato de Fisher p value
<i>GnRH signaling pathway</i>	4	2.4	2.9E-2	5.8	4.8E-3
<i>Melanogenesis</i>	4	2.4	3.0E-2	5.7	4.9E-3
<i>Hedghog signaling pathway</i>	3	1.8	5.6E-2	7.6	7.0E-3
<i>Vascular smoot muscle contraction</i>	4	2.4	4.1E-2	5.0	7.6E-3
<i>MAPK signaling pathway</i>	6	3.6	3.4E-2	3.2	1.0E-2

Nas colunas: o termo se refere a via relacionada com os genes alvos, a quantidade com quantos genes estão relacionados a essa via, a porcentagem (%) de quantos genes do total estão relacionados com a via, p value corresponde ao de significância, fold enrichment diz sobre o quão essa via está relacionada com esse genes e por último mais um teste estatístico de Fisher para avaliar a significância.

A ação do microRNA 423 como promotor de crescimento celular foi descrita por Lin *et al.* (72) em amostras de carcinoma hepatocelular. Pode-se observar a relação da atuação com as vias encontradas dos genes preditos como alvos para esse microRNA, como Hedghog e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que participam do desenvolvimento. A relação entre esse microRNA com leucemia ainda não foi descrita, porém com a relação das vias ditas como dos genes alvos, pode-se buscar a interação entre o microambiente tumoral com a proliferação e desenvolvimento celular. Pode-se ainda, buscar a relação entre as classificações de risco, já que os padrões encontrados aqui foram tão diferentes.

Por último, o microRNA 451a não apresentou padrão entre os pacientes, inclusive com a expressão oposta entre os pacientes 3 e 4. Não houve relação entre os 35 genes preditos como alvos com vias.

Apesar de não haver estudos que relacionem o microRNA 451a com leucemia e nem a relação dos genes preditos como alvos com vias, o mesmo já foi descrito com baixa expressão em câncer de colo retal e câncer de mama sendo relacionados com resistência a drogas quimioterápicas (73, 74). Tornando assim, esse microRNA como possível biomarcador de resistência/metabolismo de drogas utilizadas nos tratamentos quimioterápicos.

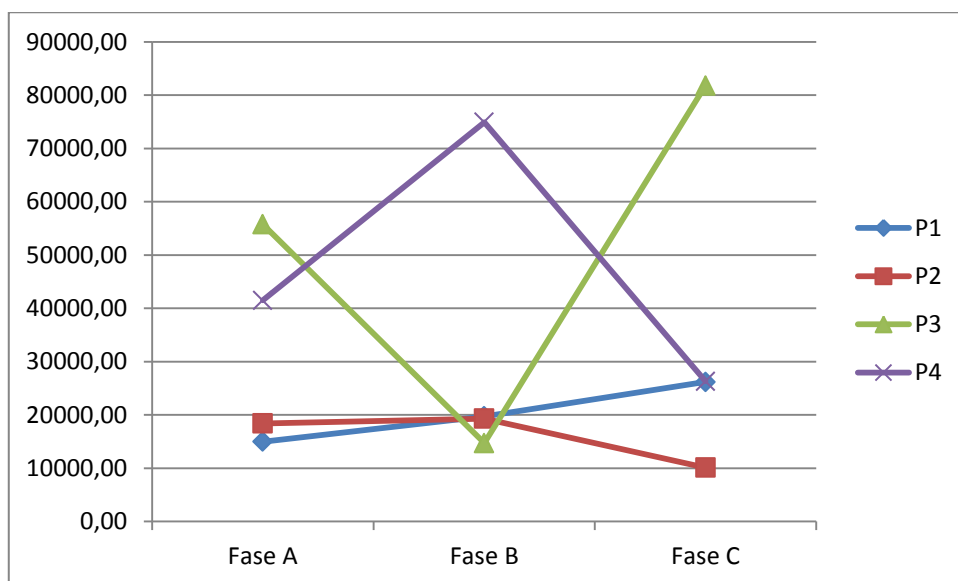


Gráfico 7 Alteração do microRNA 451a ao longo do tratamento (P corresponde a paciente e os números 1, 2, 3 e 4 a cada paciente).

Dentre os microRNAs com diferenças significativas entre as fases de tratamento, estão alguns que já foram relacionados em outros estudos como participantes do desenvolvimento e progressão de LLA. O microRNA 146a, descrito como possível biomarcador de prognóstico por Wang (42) por ser inversamente proporcional à taxa de sobrevivência, também apresentou diferenças entre as etapas durante o tratamento quimioterápico neste estudo, com forte decaimento ao longo das etapas em todos os pacientes. Seguindo a ideia do autor citado acima, essa alteração poderia indicar sucesso no tratamento, porém pode-se observar que o

paciente 2 também apresentou o padrão semelhante aos demais, mesmo com recaída da doença. Sendo assim, sugerido que não seja usado como biomarcador.

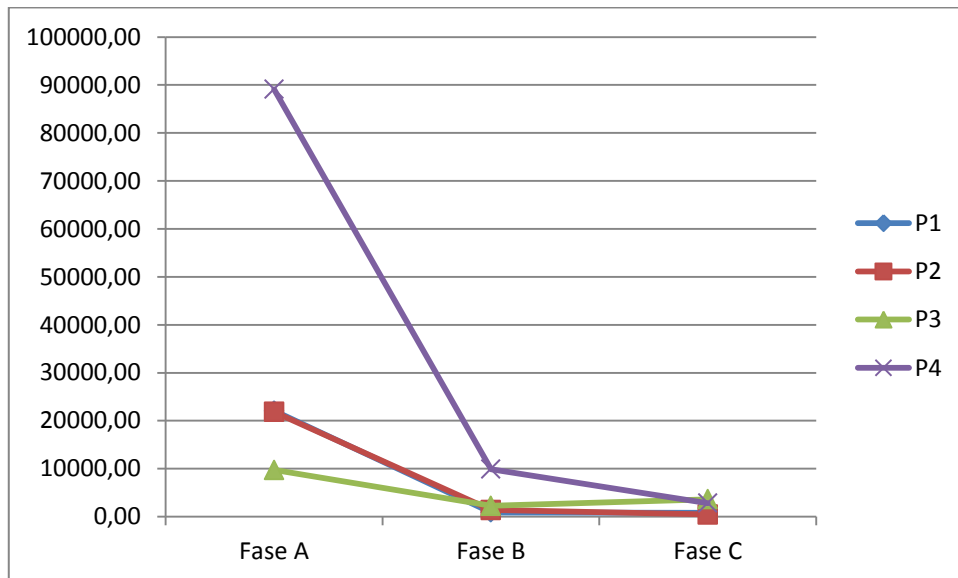


Gráfico 8 Alteração do microRNA 146a-5p ao longo do tratamento, decaindo até próximo de zero na terceira fase

Esse é o primeiro trabalho a identificar microRNAs circulantes em medula óssea de pacientes com LLA durante o diagnóstico e seguimento do tratamento quimioterápico. Aqui foram considerados apenas os seis microRNAs que apresentaram maior diferença significativa entre as fases de tratamento. Para melhor entendimento do que representa as alterações dos microRNAs entre as fases, é necessário que os 258 microRNAs que apresentaram valores de p-value significativo da primeira para a segunda etapa do tratamento, os 237 com valores significativos na comparação da primeira etapa com a segunda e os 199 diferencialmente expressos entre a segunda e a terceira etapa sejam avaliados individualmente e comparados ao microRNAs já identificados como participantes do desenvolvimento da doença em estudos anteriores.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo identificou microRNAs circulantes no soro de medula óssea de pacientes com LLA ao diagnóstico e seguimento do tratamento de quimioterapia. Ao todo, 391 microRNAs foram submetidos a análises estatísticas para buscar a relação entre os microRNAs com comportamento no microambiente medular tumoral.

Dentre os com diferenças significativas entre as fases de tratamento, seis microRNAs foram escolhidos para serem relacionados com os genes preditos como alvos e as vias de sinalização influenciadas pela ação dos mesmos. Os microRNAs foram relacionados em outras doenças com a atuação como proto-oncogenes, progressão, invasão, angiogênese, metástase tumoral, inibição de apoptose e promotor de crescimento celular. Sendo o microRNA 486-5p o mais chamativo, o qual apresentou a maior frequência de *reads* e a maior diferença significativa, já descrito como desregulado em diversas doenças, teve comportamento semelhante entre as amostras, com decaimento ao longo do tratamento, com exceção de um paciente, que teve recidiva da doença. Portanto, pode-se sugerir seu uso como biomarcador de sucesso de tratamento. O microRNA 423, descrito como participante no crescimento celular, possibilitou a estratificação entre os grupos de risco, indicando sua possível utilização como marcador na classificação de risco dos pacientes.

Importante ressaltar que o perfil de microRNAs descritos nesse estudo não correspondem apenas aos pertencentes aos blastos leucêmicos, mas sim a vários tipos celulares encontrados no microambiente de medula óssea. Esse estudo é o primeiro a relacionar os microRNAs circulantes em microambiente tumoral e ainda durante as etapas de tratamento quimioterápico. Assim, a presença de microRNAs circulando na medula óssea dos pacientes mostra seu potencial como reguladores microambiente do tumor e biomarcadores.

Estudos funcionais ainda são necessários para identificação dos genes alvos de regulação desses microRNAs para relacioná-los com o desenvolvimento da doença e para a identificação dos microRNAs preditos como novos.

REFERÊNCIAS

1. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 11 ed2006. 1264 p.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia Molecular da Célula. 4 ed2004. 1549 p.
3. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: fundamentos e prática: Editora Atheneu; 2004. 1081 p.
4. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. Imunologia: O sistema imunológico na saúde e na doença. 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000. 634 p.
5. Anjos ARd, Alvares-Silva M, Borelli P. Matriz Extracelular e Leucemia. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2000;22:404-12.
6. Konopleva M, Andreeff M. Targeting the leukemia microenvironment. Current drug targets. 2007 Jun;8(6):685-701. PubMed PMID: 17584025.
7. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. Leukemia. 2009 Dec;23(12):2233-41. PubMed PMID: 19727127. Epub 2009/09/04. eng.
8. Pui CH. Childhood leukemias. N Engl J Med. 1995 Jun 15;332(24):1618-30. PubMed PMID: 7753142.
9. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2004 Apr 8;350(15):1535-48. PubMed PMID: 15071128. Epub 2004/04/09. eng.
10. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 1998 Aug 27;339(9):605-15. PubMed PMID: 9718381.
11. Pui CH, Crist WM. Treatment of childhood leukemias. Current opinion in oncology. 1995 Jan;7(1):36-44. PubMed PMID: 7696362.
12. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2008 Mar 22;371(9617):1030-43. PubMed PMID: 18358930. Epub 2008/03/25. eng.
13. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2006 Feb;6(2):117-29. PubMed PMID: 16491071. Epub 2006/02/24. eng.
14. Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. Lancet Oncol. 2001 Oct;2(10):597-607. PubMed PMID: 11902549. Epub 2002/03/21. eng.

15. Pui CH, Relling MV, Evans WE. Role of pharmacogenomics and pharmacodynamics in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2002 Dec;15(4):741-56. PubMed PMID: 12617874. Epub 2003/03/06. eng.
16. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006 Jan 12;354(2):166-78. PubMed PMID: 16407512.
17. Jeha S, Pui CH. Risk-adapted treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009 Oct;23(5):973-90, v. PubMed PMID: 19825448. Epub 2009/10/15. eng.
18. Costa FF. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene.* 2008 Feb 29;410(1):9-17. PubMed PMID: 18226475. Epub 2008/01/30. eng.
19. de Vasconcellos JF, Laranjeira AB, Zanchin NI, Otubo R, Vaz TH, Cardoso AA, et al. Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2010 Dec 22. PubMed PMID: 21182032. Epub 2010/12/25. Eng.
20. Houthuijzen JM, Daenen LG, Roodhart JM, Voest EE. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br J Cancer.* 2012 May 17. PubMed PMID: 22596239. Epub 2012/05/19. Eng.
21. Sison EA, Brown P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. *Expert Rev Hematol.* 2011 Jun;4(3):271-83. PubMed PMID: 21668393. Pubmed Central PMCID: 3131221. Epub 2011/06/15. eng.
22. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov;6(11):857-66. PubMed PMID: 17060945. Epub 2006/10/25. eng.
23. Calin GA, Garzon R, Cimmino A, Fabbri M, Croce CM. MicroRNAs and leukemias: how strong is the connection? *Leuk Res.* 2006 Jun;30(6):653-5. PubMed PMID: 16330098. Epub 2005/12/07. eng.
24. Costa FF. Non-coding RNAs: Meet thy masters. *Bioessays.* 2010 Jul;32(7):599-608. PubMed PMID: 20544733. Epub 2010/06/15. eng.
25. Volinia S, Galasso M, Costinean S, Tagliavini L, Gamberoni G, Drusco A, et al. Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Genome Res.* 2010 May;20(5):589-99. PubMed PMID: 20439436. Pubmed Central PMCID: 2860161. Epub 2010/05/05. eng.
26. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009 Jan 23;136(2):215-33. PubMed PMID: 19167326. Epub 2009/01/27. eng.
27. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97. PubMed PMID: 14744438.

28. Fulci V, Colombo T, Chiaretti S, Messina M, Citarella F, Tavoraro S, et al. Characterization of B- and T-lineage acute lymphoblastic leukemia by integrated analysis of MicroRNA and mRNA expression profiles. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Dec;48(12):1069-82. PubMed PMID: 19760605. Epub 2009/09/18. eng.
29. Galiveti CR, Rozhdestvensky TS, Brosius J, Lehrach H, Konthur Z. Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *RNA*. 2010 Feb;16(2):450-61. PubMed PMID: 20040593. Pubmed Central PMCID: 2811673. Epub 2009/12/31. eng.
30. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol*. 2010 Oct 14. PubMed PMID: 21089039. Epub 2010/11/20. Eng.
31. Spizzo R, Nicoloso MS, Croce CM, Calin GA. SnapShot: MicroRNAs in Cancer. *Cell*. 2009 May 1;137(3):586- e1. PubMed PMID: 19410551. Epub 2009/05/05. eng.
32. Le XF, Merchant O, Bast RC, Calin GA. The Roles of MicroRNAs in the Cancer Invasion-Metastasis Cascade. *Cancer Microenviron*. 2010;3(1):137-47. PubMed PMID: 21209780. Pubmed Central PMCID: 2990485. Epub 2011/01/07. eng.
33. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9. PubMed PMID: 12434020. Pubmed Central PMCID: 137750.
34. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer*. 2008 Mar 1;122(5):969-77. PubMed PMID: 18098138. Epub 2007/12/22. eng.
35. Borze I, Guled M, Musse S, Raunio A, Elonen E, Saarinen-Pihkala U, et al. MicroRNA microarrays on archive bone marrow core biopsies of leukemias-Method validation. *Leuk Res*. 2010 Sep 7. PubMed PMID: 20828815. Epub 2010/09/11. Eng.
36. Wentz-Hunter KK, Potashkin JA. The Role of miRNAs as Key Regulators in the Neoplastic Microenvironment. *Mol Biol Int*. 2011;2011:839872. PubMed PMID: 22091413. Pubmed Central PMCID: 3200203. Epub 2011/11/18. eng.
37. Schotte D, Moqadam FA, Lange-Turenhout EA, Chen C, van Ijcken WF, Pieters R, et al. Discovery of new microRNAs by small RNAome deep sequencing in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2011 May 24. PubMed PMID: 21606961. Epub 2011/05/25. Eng.
38. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11755-60. PubMed PMID: 15284443. Pubmed Central PMCID: 511048. Epub 2004/07/31. eng.

39. Cammarata G, Augugliaro L, Salemi D, Agueli C, La Rosa M, Dagnino L, et al. Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2010 May;85(5):331-9. PubMed PMID: 20425795. Epub 2010/04/29. eng.
40. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1793-801. PubMed PMID: 16251535. Epub 2005/10/28. eng.
41. Bhatia S, Kaul D, Varma N. Potential tumor suppressive function of miR-196b in B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cell Biochem*. 2010 Jul;340(1-2):97-106. PubMed PMID: 20549547. Epub 2010/06/16. eng.
42. Wang Y, Li Z, He C, Wang D, Yuan X, Chen J, et al. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Mar 15;44(3):191-7. PubMed PMID: 20110180. Pubmed Central PMCID: 2829339. Epub 2010/01/30. eng.
43. Bousquet M, Harris MH, Zhou B, Lodish HF. MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 30. PubMed PMID: 21118985. Pubmed Central PMCID: 3003065. Epub 2010/12/02. Eng.
44. Schotte D, Chau JC, Sylvester G, Liu G, Chen C, van der Velden VH, et al. Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2009 Feb;23(2):313-22. PubMed PMID: 18923441. Epub 2008/10/17. eng.
45. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008 May;141(5):672-5. PubMed PMID: 18318758.
46. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29;105(30):10513-8. PubMed PMID: 18663219. Pubmed Central PMCID: 2492472. Epub 2008/07/30. eng.
47. Zen K, Zhang CY. Circulating MicroRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev*. 2010 Nov 9. PubMed PMID: 21064190. Epub 2010/11/11. Eng.
48. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008 Jul;110(1):13-21. PubMed PMID: 18589210. Epub 2008/07/01. eng.
49. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008;3(9):e3148. PubMed PMID: 18773077. Pubmed Central PMCID: 2519789. Epub 2008/09/06. eng.

50. Yang Q, Lu J, Wang S, Li H, Ge Q, Lu Z. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clin Chim Acta*. 2011 Aug 5. PubMed PMID: 21840305. Epub 2011/08/16. Eng.
51. Lotvall J, Valadi H. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr*. 2007 Jul-Sep;1(3):156-8. PubMed PMID: 19262134. Pubmed Central PMCID: 2634021. Epub 2007/07/01. eng.
52. Janitz M. Next-generation genome sequencing : towards personalized medicine. Weinheim: Wiley-VCH; 2008. xx, 260 p. p.
53. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, et al. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011 Apr;11(3):333-43. PubMed PMID: 21463242.
54. ILLUMINA I. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology [Web page]. 2012 [cited 2013 01/07/2013]. Available from: http://res.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf.
55. Andrews S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data 2013 [cited 2013]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
56. Yang X, Li L. miRDeep-P: a computational tool for analyzing the microRNA transcriptome in plants. *Bioinformatics*. 2011 Sep 15;27(18):2614-5. PubMed PMID: 21775303.
57. Friedlander MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, et al. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature biotechnology*. 2008 Apr;26(4):407-15. PubMed PMID: 18392026.
58. An J, Lai J, Lehman ML, Nelson CC. miRDeep*: an integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(2):727-37. PubMed PMID: 23221645. Pubmed Central PMCID: 3553977.
59. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*. 2006 January 1, 2006;34(suppl 1):D140-D4.
60. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013.
61. Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*. 2008 Jun;14(6):1012-7. PubMed PMID: 18426918. Pubmed Central PMCID: PMC2390791. Epub 2008/04/23. eng.
62. Wang X, El Naqa IM. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics*. 2008 Feb 1;24(3):325-32. PubMed PMID: 18048393. Epub 2007/12/01. eng.

63. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009;4(1):44-57. PubMed PMID: 19131956. Epub 2009/01/10. eng.
64. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(1):1-13. PubMed PMID: 19033363. Pubmed Central PMCID: PMC2615629. Epub 2008/11/27. eng.
65. Zhang H, Luo XQ, Zhang P, Huang LB, Zheng YS, Wu J, et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia. *PLoS One*. 2009;4(11):e7826. PubMed PMID: 19915715. Pubmed Central PMCID: 2773830.
66. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1721-6. PubMed PMID: 20194856.
67. Wang J, Tian X, Han R, Zhang X, Wang X, Shen H, et al. Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer. *Oncogene*. 2013 Mar 11. PubMed PMID: 23474761.
68. Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*. 2013;14:319. PubMed PMID: 23663360. Pubmed Central PMCID: 3653748.
69. Song SJ, Ito K, Ala U, Kats L, Webster K, Sun SM, et al. The Oncogenic MicroRNA miR-22 Targets the TET2 Tumor Suppressor to Promote Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Transformation. *Cell stem cell*. 2013 Jul 3;13(1):87-101. PubMed PMID: 23827711.
70. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3183-9. PubMed PMID: 18187662. Pubmed Central PMCID: 2265455. Epub 2008/01/12. eng.
71. Lin J, Teo S, Lam DH, Jeyaseelan K, Wang S. MicroRNA-10b pleiotropically regulates invasion, angiogenicity and apoptosis of tumor cells resembling mesenchymal subtype of glioblastoma multiforme. *Cell death & disease*. 2012;3:e398. PubMed PMID: 23034333. Pubmed Central PMCID: 3481123.
72. Lin J, Huang S, Wu S, Ding J, Zhao Y, Liang L, et al. MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G(1)/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2011 Nov;32(11):1641-7. PubMed PMID: 21890460.

73. Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, Gonzalez-Huarriz M, et al. MicroRNA-451 Is Involved in the Self-renewal, Tumorigenicity, and Chemoresistance of Colorectal Cancer Stem Cells. *STEM CELLS*. 2011;29(11):1661-71.

74. Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Ilnytskyy Y, Tryndyak VP, Chekhun VF, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Molecular cancer therapeutics*. 2008 Jul;7(7):2152-9. PubMed PMID: 18645025. Epub 2008/07/23. eng.

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 182/2009

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 185/09 – Farmacogenética e Farmacogenômica da Leucemia Linfóide Aguda no DF.

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 07/08/2011

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 07 de agosto de 2009.

Atenciosamente.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepsesdf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP: 70.710-904

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE

ANEXO B - MICRORNAS CONHECIDOS

Tabela de microRNAs conhecidos normalizados por milhão

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-486-5p	10106	405312	119151	278969	402743	588717	74361	458631	192578	63283	432400	458196
hsa-miR-22-3p	13773	85938	112231	53934	108825	49397	105242	53560	184123	9542	36903	64356
hsa-miR-10b-5p	17282	71368	65270	40785	80946	40687	46715	122934	46503	12926	44579	108200
hsa-miR-16-5p	52291	44183	102236	76264	29546	26694	113321	37245	54986	99884	68973	68528
hsa-miR-423-5p	38430	59768	33003	40198	45698	53161	92630	97770	69900	37883	51732	59804
hsa-miR-451a	14967	19729	26177	18409	19310	10107	55720	14719	81726	41499	74888	26308
hsa-miR-143-3p	5285	10863	81353	11740	20768	9923	13462	9374	8011	1385	2709	10907
hsa-miR-191-5p	12762	6707	12676	46021	8335	10934	28416	14150	22149	32637	6525	24663
hsa-miR-181a-5p	300811	17903	15511	124844	10249	5840	51921	21320	29322	343783	77356	11059
hsa-miR-25-3p	4799	21198	12956	13266	18746	20850	10068	15987	12767	6095	11833	12806
hsa-miR-92a-3p	7480	14881	12254	9533	16128	30054	7220	3281	4256	1883	10257	7230
hsa-miR-10a-5p	3342	12040	7970	8030	12868	3702	21704	18030	20999	5882	14234	20118
hsa-miR-21-5p	56310	14703	34275	11505	9229	4011	26552	6301	8138	4133	3396	4237
hsa-miR-186-5p	22558	5089	10343	15403	5565	3025	28168	5491	25889	19377	4772	10557
hsa-miR-103a-3p	18523	17828	23415	14041	20661	13352	4264	10353	4713	1737	7115	4991
hsa-miR-142-5p	31653	11054	13345	35854	9977	6424	26774	9567	16460	44065	29540	6652
hsa-let-7i-5p	28093	8647	18721	7936	10766	4378	12579	3538	12248	4419	2153	2476
hsa-miR-107	12600	16282	18169	12257	18683	11618	2092	9817	2555	1165	6810	4110
hsa-miR-192-5p	3231	6420	11715	8335	6475	6394	6690	6792	10797	5328	3602	5677
hsa-miR-101-3p	11260	4802	21476	3639	6544	3374	7340	1319	3195	1135	1116	1371
hsa-miR-30e-5p	7260	3406	8487	4133	5845	1697	24250	1352	14373	5261	2918	2230
hsa-miR-320a	25759	10561	6865	5518	6937	5971	8473	4091	8733	2599	1882	2728
hsa-miR-93-5p	6602	3937	9694	3029	3609	3845	8171	1295	6076	2631	1088	2518
hsa-miR-15a-5p	6403	5152	9975	5213	4646	3146	4212	2171	2577	2766	4971	1968
hsa-miR-182-5p	2347	1792	8605	3099	1395	1748	4068	2070	3249	4536	1113	3978

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-30d-5p	4523	2387	3019	3358	2690	2604	8685	1277	7863	7111	9507	2708
hsa-miR-30a-5p	2519	3533	5192	7490	4927	2957	4739	2078	4755	13885	6136	3029
hsa-miR-126-5p	10916	2677	7534	5119	2294	1090	7261	3013	2983	5941	3766	1950
hsa-miR-27b-3p	4135	2135	4730	2959	1782	1205	5424	2823	4205	3391	5144	2151
hsa-miR-28-3p	3651	4959	1858	3287	4731	2748	1788	2120	2714	1477	1720	1408
hsa-miR-320b	5440	2026	917	1010	1111	859	1310	2111	1298	1027	876	907
hsa-miR-130a-3p	14575	1304	1949	2442	1172	843	2505	989	1398	3248	1116	1227
hsa-miR-378a-3p	6612	25918	52743	12398	27992	20814	17046	9761	15206	906	568	13828
hsa-miR-148a-3p	2267	9643	22859	3240	6390	2473	15674	5714	7057	488	1028	3330
hsa-miR-26a-5p	9676	1419	5242	4907	1213	736	12946	1295	8715	9290	3387	4718
hsa-miR-106b-3p	3662	2819	3082	3170	3989	5692	1859	1161	3012	949	801	1854
hsa-miR-140-3p	3149	3419	4020	1573	3430	2048	4938	1194	5000	730	1445	883
hsa-let-7b-5p	1261	1753	3080	2043	2311	2851	1617	759	1701	2199	2152	1430
hsa-let-7f-5p	15636	1688	7866	3945	1447	1056	4149	607	1376	2429	1054	649
hsa-miR-199a-3p	1848	3370	5922	2160	3320	1317	2601	1218	1529	589	1644	718
hsa-miR-199b-3p	1843	3363	5916	2160	3317	1317	2595	1215	1523	589	1644	718
hsa-miR-146a-5p	22074	884	817	21837	1395	472	9726	2278	3618	89086	9898	2833
hsa-miR-16-2-3p	656	1589	1769	1197	1840	907	2682	619	4146	864	1448	849
hsa-let-7a-5p	3114	1555	2940	1691	1692	1071	1976	363	1134	1144	1003	545
hsa-miR-181b-5p	51889	1772	1679	7068	850	618	4641	1003	1883	14066	4384	539
hsa-miR-363-3p	2317	1434	1322	3029	1664	658	1168	1927	1728	4014	2002	831
hsa-let-7g-5p	3277	1156	4868	1244	1752	1129	2367	339	1716	986	463	574
hsa-miR-425-5p	523	1795	487	1573	1505	1040	636	1858	1051	1037	1606	931
hsa-miR-221-3p	15922	1753	1208	1714	787	404	7198	703	1876	7083	2876	307
hsa-miR-130b-3p	4126	1354	1188	1972	844	595	1367	741	903	1790	526	584
hsa-miR-660-5p	1514	1802	1777	1010	1733	697	1592	685	1914	372	353	311
hsa-miR-532-5p	1283	2214	1963	775	1370	793	981	1117	912	146	396	463
hsa-miR-19b-3p	13059	697	4763	1432	696	173	7688	241	3768	1107	169	639

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-183-5p	241	333	1296	1127	283	294	7274	405	4446	5051	705	2636
hsa-miR-146b-5p	3375	308	694	4203	341	141	1954	619	1913	17696	775	1252
hsa-miR-342-3p	857	228	107	1057	179	155	1236	253	1851	2768	1112	295
hsa-miR-126-3p	1705	541	1170	869	490	184	4946	387	3223	845	793	639
hsa-miR-151a-5p	1457	237	534	822	286	226	995	408	1048	3200	1509	647
hsa-miR-151b	1457	229	534	822	286	226	989	408	1048	3197	1509	647
hsa-miR-423-3p	143	976	325	329	682	540	3011	378	3371	187	915	364
hsa-miR-27a-3p	1119	689	1099	540	523	197	2342	301	1113	606	644	289
hsa-miR-29a-3p	1737	600	939	657	743	283	1796	336	1079	646	681	275
hsa-miR-128	1807	605	292	1033	432	558	1293	226	272	1122	591	145
hsa-miR-155-5p	9442	259	478	1151	256	191	1340	125	248	1053	122	147
hsa-miR-222-3p	1697	223	177	869	85	45	1285	110	363	3447	362	93
hsa-miR-26b-5p	3254	350	3385	798	451	454	1929	146	826	657	207	407
hsa-miR-19a-3p	3671	120	1344	329	215	26	2139	54	620	160	31	98
hsa-miR-181c-5p	4288	91	177	1409	80	53	500	101	388	4895	740	95
hsa-miR-223-3p	223	58	422	164	77	40	2024	36	2470	160	67	89
hsa-miR-486-3p	56	1535	597	423	641	1283	226	747	582	84	799	530
hsa-miR-150-5p	139	102	23	117	198	157	516	33	1751	278	1041	93
hsa-miR-421	1744	427	712	470	385	302	1386	226	654	412	149	349
hsa-miR-500a-3p	214	284	316	70	242	125	1660	220	941	48	136	246
hsa-miR-340-5p	2227	138	1119	70	204	112	592	12	140	113	35	73
hsa-miR-30b-5p	701	35	91	352	52	40	1851	9	998	563	193	163
hsa-miR-30c-5p	86	176	100	117	118	89	1130	104	948	163	194	134
hsa-miR-301a-3p	1196	73	812	188	151	95	1027	27	235	116	13	97
hsa-let-7d-5p	1547	655	759	564	495	390	755	179	648	501	401	152
hsa-miR-99b-5p	374	480	186	751	327	357	666	476	632	740	973	548
hsa-miR-148b-3p	380	275	933	235	171	139	538	185	447	90	106	183
hsa-miR-335-5p	597	175	1278	141	30	21	543	86	219	118	21	169

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-17-5p	443	226	697	211	349	249	1122	74	528	181	70	167
hsa-miR-652-3p	481	460	286	423	479	508	283	363	344	257	1065	243
hsa-miR-769-5p	948	333	536	164	179	107	734	208	544	66	89	102
hsa-miR-100-5p	143	564	145	1244	484	267	432	697	344	703	732	385
hsa-miR-142-3p	288	15	121	117	22	0	948	9	304	88	41	28
hsa-miR-24-3p	172	38	106	258	30	34	264	83	212	1083	275	89
hsa-miR-181a-3p	973	282	174	94	107	44	207	125	162	158	375	28
hsa-miR-185-5p	25	61	79	352	105	68	122	18	115	1173	12	17
hsa-miR-133a	13	846	3	0	0	5	16	167	9	0	3	4
hsa-miR-342-5p	753	51	72	282	41	40	166	131	234	448	299	82
hsa-miR-98-5p	634	53	301	164	107	65	223	21	51	60	20	25
hsa-miR-21-3p	619	457	380	282	226	125	133	679	59	7	70	71
hsa-miR-181d	530	38	26	94	11	6	71	24	19	266	31	7
hsa-miR-106b-5p	514	142	800	305	250	159	492	48	216	170	139	72
hsa-miR-195-5p	509	21	76	188	17	5	239	18	62	394	87	76
hsa-miR-378c	437	363	794	235	402	267	242	131	234	24	28	97
hsa-miR-708-3p	417	68	137	94	74	21	54	48	26	18	16	17
hsa-miR-28-5p	387	54	153	141	143	47	166	15	259	103	97	44
hsa-miR-941	342	293	356	188	399	464	707	271	691	252	159	379
hsa-miR-144-3p	337	107	673	211	193	118	188	80	65	145	228	95
hsa-miR-32-5p	337	59	197	141	36	23	130	15	12	134	115	39
hsa-miR-497-5p	304	59	124	70	47	21	446	18	181	36	54	19
hsa-miR-20a-5p	284	87	455	117	85	87	639	6	153	84	28	37
hsa-miR-144-5p	272	109	363	164	118	23	486	45	246	239	149	113
hsa-miR-877-5p	259	71	46	70	44	29	834	71	223	90	182	86
hsa-miR-181a-2-3p	257	153	59	47	118	37	84	71	69	36	177	30
hsa-miR-301b	249	7	42	47	0	6	182	3	38	81	1	10
hsa-miR-29c-3p	248	129	464	164	220	94	698	54	325	98	169	50

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-23a-3p	241	137	195	329	107	65	823	92	797	385	249	263
hsa-miR-708-5p	228	5	38	0	14	6	73	3	19	33	3	6
hsa-miR-455-5p	220	33	180	70	28	26	33	12	28	30	21	12
hsa-miR-223-5p	219	26	103	211	19	10	193	39	76	104	34	12
hsa-miR-30e-3p	175	63	207	23	50	24	261	36	231	57	14	65
hsa-let-7e-5p	169	129	172	47	135	92	204	63	106	10	47	35
hsa-miR-199a-5p	161	293	284	211	421	116	451	140	475	133	313	136
hsa-miR-361-5p	159	76	62	352	55	47	302	54	119	304	122	100
hsa-miR-361-3p	158	35	14	0	22	29	92	12	126	45	149	7
hsa-miR-374b-5p	153	0	49	47	6	10	84	12	21	140	41	24
hsa-miR-548aj-5p	152	96	315	23	74	50	144	60	159	43	22	72
hsa-miR-548ar-5p	152	96	315	23	74	50	144	60	159	43	22	72
hsa-miR-548g-5p	152	96	315	23	74	50	144	60	159	43	22	72
hsa-miR-548x-5p	152	96	315	23	74	50	144	60	159	43	22	72
hsa-miR-320c	150	40	23	94	44	34	41	9	54	31	37	15
hsa-let-7c	142	77	350	117	256	291	144	42	122	45	79	76
hsa-miR-548h-5p	140	96	313	23	74	50	139	60	159	40	22	73
hsa-miR-944	140	0	9	0	0	3	5	6	0	0	1	0
hsa-miR-30d-3p	139	21	66	47	44	8	60	24	25	31	1	14
hsa-miR-1307-5p	136	694	310	117	440	192	307	289	776	170	653	147
hsa-miR-195-3p	134	64	28	0	19	24	49	54	24	22	26	21
hsa-miR-181c-3p	125	23	59	23	39	16	60	27	66	34	17	19
hsa-miR-15b-5p	119	28	198	235	85	53	465	15	381	419	73	111
hsa-miR-152	118	53	147	23	83	57	212	21	153	60	68	65
hsa-miR-378i	116	298	442	117	129	171	152	63	128	6	3	79
hsa-miR-146b-3p	108	99	28	23	55	28	71	83	126	37	20	30
hsa-miR-744-5p	104	165	248	211	187	157	378	191	425	46	97	220

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-1299	103	25	20	0	0	0	5	9	4	3	0	1
hsa-miR-548av-3p	100	46	159	23	25	21	266	89	82	7	8	32
hsa-miR-548o-3p	100	46	159	23	25	21	266	89	82	7	8	32
hsa-miR-20b-5p	96	36	71	47	28	44	95	12	53	39	9	11
hsa-miR-18a-5p	93	33	113	70	22	19	220	0	59	16	7	35
hsa-miR-141-3p	89	7	14	211	3	2	46	3	26	266	109	8
hsa-miR-374a-5p	81	0	21	70	11	2	54	0	7	313	9	17
hsa-miR-548e	78	8	34	0	6	3	71	0	44	19	0	1
hsa-miR-23b-3p	73	16	35	23	25	10	22	6	46	52	60	21
hsa-miR-196a-5p	72	13	68	47	28	19	76	12	24	28	31	32
hsa-miR-1285-3p	72	54	74	23	77	31	144	48	163	15	33	37
hsa-miR-425-3p	72	18	32	94	61	15	65	24	46	63	17	14
hsa-miR-1270	68	8	18	23	0	8	8	0	12	7	7	8
hsa-miR-454-3p	68	0	45	23	17	5	46	0	6	21	3	6
hsa-miR-345-5p	64	97	56	70	154	49	65	51	163	413	176	68
hsa-miR-3202	62	0	2	47	8	0	3	0	0	9	0	0
hsa-miR-484	61	785	252	164	470	577	774	200	547	34	431	163
hsa-miR-30a-3p	57	56	126	0	91	65	125	68	132	31	42	84
hsa-miR-106a-5p	57	26	39	0	33	24	117	0	113	24	4	15
hsa-miR-548ay-5p	55	12	44	23	11	5	46	0	15	6	4	10
hsa-miR-548d-5p	55	12	44	23	11	5	46	0	15	6	4	10
hsa-miR-148b-5p	51	7	23	0	0	2	106	0	76	31	5	21
hsa-miR-203a	51	3	2	0	8	3	11	0	37	1	4	0
hsa-miR-1307-3p	51	89	64	70	69	60	71	30	66	9	13	25
hsa-miR-378d	51	20	74	23	25	21	5	0	9	6	3	14
hsa-miR-221-5p	50	0	6	0	0	3	30	6	7	52	7	8
hsa-miR-210	48	77	80	70	198	60	133	9	134	43	49	15

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-99b-3p	47	28	15	0	47	11	14	0	3	1	3	7
hsa-miR-502-3p	46	125	116	23	116	76	163	15	162	18	35	25
hsa-miR-548av-5p	46	8	21	0	6	0	54	6	35	7	0	8
hsa-miR-548k	46	8	21	0	6	0	54	6	35	7	0	8
hsa-miR-3614-5p	44	10	4	0	0	0	0	3	3	9	9	0
hsa-miR-548am-5p	43	0	37	23	0	6	52	0	25	7	0	12
hsa-miR-548au-5p	43	0	37	23	0	6	52	0	25	7	3	12
hsa-miR-548c-5p	43	0	37	23	0	6	52	0	25	7	0	12
hsa-miR-548o-5p	43	0	37	23	0	6	52	0	25	7	0	12
hsa-miR-335-3p	42	168	72	0	61	31	68	71	37	25	10	26
hsa-miR-374a-3p	41	8	30	0	3	0	22	0	3	6	0	1
hsa-miR-99a-5p	39	114	46	117	69	115	68	161	101	79	115	62
hsa-miR-501-3p	38	275	92	164	226	217	535	27	579	161	109	95
hsa-miR-589-5p	36	176	87	141	195	184	193	268	407	128	303	206
hsa-miR-199b-5p	36	23	55	23	8	15	277	0	119	19	14	14
hsa-miR-574-5p	36	38	45	23	41	19	3	0	12	7	1	14
hsa-miR-3605-5p	34	13	25	117	39	5	33	27	19	28	14	22
hsa-miR-3614-3p	34	2	4	0	0	0	0	0	3	3	0	0
hsa-miR-17-3p	34	10	23	0	19	3	35	3	22	9	14	3
hsa-miR-339-3p	33	134	32	23	77	65	245	77	325	61	220	119
hsa-miR-3688-3p	31	48	92	47	94	65	22	18	22	13	18	26
hsa-miR-29b-3p	31	23	29	0	3	3	79	0	37	24	10	8
hsa-miR-15b-3p	31	15	59	23	39	40	163	9	91	33	45	35
hsa-miR-548h-3p	31	10	28	0	22	3	65	0	19	27	18	15
hsa-miR-548z	31	10	28	0	22	3	65	0	19	27	18	15
hsa-miR-194-5p	30	48	53	94	63	32	16	12	41	136	43	26
hsa-miR-760	30	8	4	0	3	3	14	3	3	4	17	1

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-424-5p	29	8	91	0	11	2	220	0	115	12	5	8
hsa-miR-18b-5p	28	2	11	0	11	0	11	0	3	3	3	3
hsa-miR-590-3p	28	2	15	0	0	0	33	0	4	1	5	4
hsa-miR-218-5p	28	0	8	23	6	3	5	0	0	13	0	4
hsa-let-7i-3p	27	10	16	47	19	16	24	33	29	55	111	12
hsa-miR-1287	26	15	25	0	30	11	5	3	12	7	4	7
hsa-miR-664a-3p	26	0	4	0	0	5	30	0	15	51	10	15
hsa-miR-424-3p	25	137	104	70	85	84	76	140	93	25	106	93
hsa-miR-452-5p	24	102	415	23	107	47	125	33	103	4	8	89
hsa-miR-214-3p	24	40	23	0	33	26	79	27	57	28	85	30
hsa-miR-499a-5p	23	5	4	0	3	0	3	0	4	0	1	1
hsa-miR-584-5p	23	453	400	399	525	566	530	280	285	16	139	249
hsa-miR-25-5p	22	43	14	0	30	13	95	6	62	22	14	39
hsa-miR-1468	22	18	14	0	6	5	22	48	28	7	14	14
hsa-miR-548c-3p	22	10	26	0	19	2	46	0	6	7	1	10
hsa-miR-148a-5p	21	363	222	47	173	115	424	399	415	12	87	160
hsa-miR-3176	21	43	21	23	52	19	54	21	37	19	13	15
hsa-miR-548ar-3p	21	8	24	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-96-5p	20	43	157	23	36	15	43	0	60	85	12	14
hsa-miR-454-5p	20	40	25	47	28	24	54	9	41	15	16	29
hsa-miR-532-3p	20	25	26	23	30	29	63	9	94	19	28	17
hsa-miR-3653	20	15	17	47	14	3	8	27	4	1	1	3
hsa-miR-127-3p	20	10	11	47	74	28	63	83	124	28	66	37
hsa-miR-324-3p	19	43	26	94	69	52	24	30	24	12	52	10
hsa-miR-193b-3p	18	46	72	23	74	81	49	86	43	34	46	217
hsa-miR-378f	18	21	75	23	22	13	16	24	19	0	0	10
hsa-miR-3912	18	5	17	0	3	5	11	0	13	4	9	7
hsa-miR-4446-3p	18	0	3	0	0	6	0	3	6	9	4	3

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-193b-5p	18	91	83	23	63	84	27	30	9	6	5	53
hsa-miR-3615	18	61	8	47	17	34	11	24	35	13	54	21
hsa-miR-185-3p	18	38	50	23	91	58	24	21	19	0	7	15
hsa-let-7a-3p	18	16	47	0	47	6	111	27	29	7	4	14
hsa-miR-373-3p	18	15	2	0	3	2	57	0	0	1	4	0
hsa-miR-181b-3p	18	7	5	0	0	0	3	0	3	0	3	0
hsa-miR-629-5p	17	31	55	23	80	31	49	18	50	28	16	26
hsa-miR-92a-1-5p	17	15	10	0	14	6	19	3	9	7	0	6
hsa-miR-3913-5p	17	7	6	0	14	3	5	0	9	1	3	1
hsa-miR-320d	17	0	1	0	0	0	5	0	7	1	7	0
hsa-miR-4746-5p	17	20	8	23	28	45	52	45	24	6	5	40
hsa-miR-150-3p	17	7	9	47	17	3	8	36	15	103	46	4
hsa-miR-548ab	17	0	6	0	0	2	8	0	9	3	3	0
hsa-miR-641	17	0	5	47	0	3	41	0	6	0	0	0
hsa-miR-125a-5p	16	96	14	94	91	21	19	51	82	0	85	12
hsa-miR-132-3p	16	10	28	23	3	11	49	9	28	18	31	14
hsa-miR-381-3p	16	23	16	0	22	15	27	9	15	1	14	11
hsa-miR-338-3p	16	3	23	23	0	5	35	12	68	12	3	7
hsa-miR-505-3p	15	5	13	0	6	6	239	9	287	25	25	19
hsa-miR-371b-5p	15	0	2	23	0	0	24	0	13	46	1	0
hsa-miR-215	15	26	74	23	41	24	84	12	63	6	13	24
hsa-miR-140-5p	15	15	34	0	11	6	68	6	25	3	1	4
hsa-miR-542-3p	15	10	71	47	28	0	73	6	22	1	1	10
hsa-miR-548f	15	0	33	23	11	5	52	9	22	7	1	6
hsa-miR-627	15	0	8	23	14	5	101	0	99	7	7	4
hsa-miR-766-5p	15	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	4
hsa-miR-1301	14	5	2	23	0	10	3	0	12	10	8	3
hsa-miR-34a-5p	14	5	11	0	17	3	19	0	9	10	3	3

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-125b-2-3p	14	21	48	47	28	74	35	48	44	7	42	62
hsa-miR-374b-3p	13	5	14	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-125b-1-3p	13	30	8	0	22	5	22	15	13	13	33	8
hsa-miR-24-2-5p	13	7	11	0	8	0	30	0	37	10	1	15
hsa-miR-548ap-5p	13	0	15	0	0	0	5	0	3	0	3	0
hsa-miR-548az-5p	13	0	14	0	6	6	30	0	9	1	3	4
hsa-miR-548j	13	0	15	0	0	0	5	0	3	0	3	0
hsa-miR-625-5p	12	12	50	0	0	18	57	0	41	16	3	10
hsa-miR-3143	12	7	14	0	0	2	5	0	3	4	3	0
hsa-miR-324-5p	11	51	8	0	11	11	33	21	21	3	20	11
hsa-miR-331-5p	11	35	14	0	39	8	16	3	7	6	12	6
hsa-miR-3127-5p	10	3	1	0	6	15	3	12	6	6	5	6
hsa-miR-598	10	2	29	0	11	16	11	12	16	1	4	10
hsa-miR-30c-2-3p	9	5	18	23	22	10	19	15	9	4	5	3
hsa-miR-196b-5p	9	2	14	0	6	2	27	0	22	6	3	6
hsa-miR-138-5p	9	0	1	0	0	6	19	0	15	0	0	0
hsa-miR-3139	9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0
hsa-miR-193a-3p	9	3	54	0	14	5	101	0	122	0	5	7
hsa-miR-4477b	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-942	8	28	14	23	44	24	14	9	96	6	31	24
hsa-miR-30c-1-3p	8	5	15	0	6	0	24	3	19	1	0	4
hsa-miR-2355-5p	8	0	1	0	0	8	5	15	4	0	9	0
hsa-miR-362-3p	8	0	7	0	3	0	11	0	6	6	1	1
hsa-miR-4645-3p	8	0	2	0	3	0	5	0	1	9	0	0
hsa-miR-548ak	8	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-548b-5p	8	0	7	0	8	3	19	0	22	0	0	1
hsa-miR-671-5p	8	0	2	0	14	2	22	0	13	3	4	0
hsa-miR-145-3p	8	13	77	47	17	18	22	0	16	3	9	32
hsa-miR-4677-3p	8	7	2	0	0	0	11	0	1	15	7	1
hsa-miR-92b-3p	7	59	26	47	88	173	19	83	15	19	184	64
hsa-miR-671-3p	7	23	23	0	14	44	33	48	47	1	18	12
hsa-miR-628-3p	7	8	9	0	0	3	19	6	15	19	21	7
hsa-miR-1255a	7	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	3
hsa-miR-5000-3p	7	0	5	0	0	0	3	0	0	0	0	1
hsa-miR-548as-5p	7	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
hsa-miR-582-3p	7	0	42	0	8	0	27	9	9	0	0	1
hsa-miR-628-5p	7	0	10	0	0	2	0	0	6	3	4	4
hsa-miR-5010-5p	7	63	47	47	47	44	92	24	79	6	5	35
hsa-miR-874	7	25	5	0	14	6	41	39	44	9	45	8
hsa-miR-548l	7	3	2	0	3	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-101-5p	7	2	20	0	6	0	8	0	12	3	5	3
hsa-miR-664a-5p	7	2	4	0	0	0	3	0	13	13	8	3
hsa-miR-3065-3p	7	0	2	0	0	0	0	0	7	0	0	1
hsa-miR-653	7	0	4	0	8	0	16	0	22	3	0	0
hsa-miR-339-5p	6	25	10	0	36	47	3	6	34	1	12	6
hsa-miR-145-5p	6	21	38	0	39	44	266	0	301	6	30	109
hsa-miR-22-5p	6	13	24	0	3	16	16	12	34	4	18	6
hsa-miR-330-3p	6	13	5	0	0	2	8	3	4	6	4	1
hsa-miR-33b-5p	6	13	22	0	3	0	8	6	9	1	0	3
hsa-miR-1271-5p	6	7	3	0	0	6	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-330-5p	6	2	4	0	0	0	14	0	4	0	5	0
hsa-let-7f-2-3p	6	0	9	0	8	2	11	0	1	0	0	1
hsa-miR-153	6	0	1	0	0	0	3	0	0	1	0	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-3065-5p	5	0	1	0	0	0	0	0	7	0	0	0
hsa-miR-328	5	0	1	0	8	3	27	0	9	3	5	1
hsa-miR-548aq-3p	5	0	7	0	0	2	5	0	0	0	0	0
hsa-miR-224-5p	4	190	346	164	316	385	133	74	147	3	20	256
hsa-miR-1180	4	137	27	23	58	87	30	39	32	1	41	30
hsa-miR-125b-5p	4	46	9	141	83	44	5	18	68	15	106	40
hsa-miR-5001-5p	4	7	1	0	0	0	0	0	0	6	1	0
hsa-miR-548ah-3p	4	5	6	0	3	0	5	12	1	3	0	0
hsa-miR-197-5p	4	0	2	0	8	5	5	3	10	10	14	4
hsa-miR-3613-5p	4	0	11	0	0	0	11	0	6	9	0	1
hsa-miR-505-5p	4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1
hsa-miR-548am-3p	4	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-769-3p	4	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-139-5p	4	33	15	0	47	32	49	9	51	6	9	22
hsa-miR-93-3p	4	33	15	0	11	23	41	27	93	9	21	21
hsa-miR-18a-3p	4	20	9	0	3	8	19	0	46	0	4	12
hsa-miR-574-3p	4	20	8	0	8	21	11	3	34	6	14	8
hsa-miR-1255b-5p	4	15	8	0	6	6	5	6	9	7	3	4
hsa-miR-589-3p	4	12	11	0	3	2	24	6	18	1	7	1
hsa-miR-450a-5p	4	10	41	0	11	5	49	0	37	1	1	3
hsa-miR-1303	4	8	8	0	6	8	8	0	1	0	0	3
hsa-miR-592	4	7	12	0	6	0	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-10a-3p	4	5	11	0	0	2	8	0	10	1	1	4
hsa-miR-4792	4	2	2	23	11	2	0	3	1	3	9	4
hsa-miR-197-3p	4	0	0	0	6	3	14	0	9	0	0	0
hsa-miR-3074-5p	4	0	3	23	8	0	0	0	16	3	4	1

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-3174	4	0	2	0	0	0	8	6	3	0	0	7
hsa-miR-509-3p	4	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	1
hsa-miR-548n	4	0	4	0	0	3	0	0	4	0	0	0
hsa-miR-576-3p	4	0	6	0	3	3	33	6	9	1	0	6
hsa-miR-616-5p	4	0	2	0	0	2	8	0	13	1	1	1
hsa-miR-766-3p	4	0	3	0	6	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-98-3p	3	10	27	0	19	16	52	6	24	1	1	18
hsa-miR-1294	3	7	2	0	0	3	5	0	4	4	7	0
hsa-miR-6514-5p	3	7	2	0	0	2	3	0	0	1	1	1
hsa-miR-489	3	3	0	0	0	2	19	0	12	6	16	3
hsa-miR-887	3	3	5	0	6	2	14	0	16	1	8	4
hsa-miR-10b-3p	3	2	8	0	0	0	0	12	7	4	1	0
hsa-miR-31-5p	3	2	2	0	3	0	5	0	4	1	0	0
hsa-miR-1226-5p	3	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
hsa-miR-1286	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-2277-5p	3	0	2	0	0	2	5	15	9	0	0	1
hsa-miR-4687-3p	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-5096	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	0	1
hsa-miR-548ag	3	0	1	23	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-548an	3	0	7	0	6	2	14	0	12	0	0	4
hsa-miR-548w	3	0	4	0	0	0	5	0	3	0	0	0
hsa-miR-643	3	0	1	0	0	0	3	0	1	9	5	1
hsa-miR-7-5p	3	0	7	0	0	0	3	0	1	6	0	0
hsa-miR-4657	3	7	1	0	0	0	0	0	1	1	5	1
hsa-miR-651	3	7	21	0	8	3	46	0	25	7	8	1
hsa-miR-3146	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-5003-3p	3	5	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-95	3	5	5	0	0	3	8	12	7	0	4	1

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-3677-3p	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1
hsa-miR-502-5p	3	3	4	0	0	0	0	0	0	1	0	1
hsa-miR-186-3p	3	0	0	0	0	0	14	0	10	0	0	0
hsa-miR-2355-3p	3	0	0	23	0	0	3	0	1	3	0	1
hsa-miR-33a-5p	3	0	3	0	0	0	5	0	4	1	0	0
hsa-miR-4504	3	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-4526	3	0	0	0	0	0	3	0	1	3	0	0
hsa-miR-493-5p	3	0	4	0	0	0	0	0	3	0	3	1
hsa-miR-600	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-191-3p	2	21	3	0	3	16	11	6	15	1	1	3
hsa-miR-188-5p	2	10	11	0	8	2	57	0	31	3	8	4
hsa-miR-4714-3p	2	8	1	23	28	2	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-503-5p	2	7	17	0	8	5	14	0	4	1	3	4
hsa-miR-542-5p	2	7	7	0	3	2	3	0	6	0	0	0
hsa-miR-1290	2	5	1	0	0	0	0	3	0	4	0	0
hsa-miR-99a-3p	2	5	20	0	6	11	11	0	7	0	3	1
hsa-miR-4800-5p	2	3	0	0	0	0	3	12	0	1	0	0
hsa-miR-2115-3p	2	2	5	0	0	0	8	0	6	0	0	1
hsa-miR-3928	2	2	0	0	0	0	8	3	3	0	0	3
hsa-miR-1179	2	0	2	0	3	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-1246	2	0	4	47	8	2	3	9	3	0	1	1
hsa-miR-1277-5p	2	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-129-5p	2	0	2	0	0	0	5	0	1	0	1	1
hsa-miR-149-5p	2	0	2	0	0	0	8	12	3	0	5	1
hsa-miR-196a-3p	2	0	10	0	0	2	0	3	1	0	0	0
hsa-miR-2277-3p	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0
hsa-miR-2964a-3p	2	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-29a-5p	2	0	1	0	0	0	8	0	12	0	0	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-3136-5p	2	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0
hsa-miR-3611	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-378b	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4461	2	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
hsa-miR-548a1	2	0	5	0	0	0	14	0	4	4	3	0
hsa-miR-548d-3p	2	0	3	0	0	0	5	0	18	0	0	6
hsa-miR-550a-3-5p	2	0	23	23	28	24	68	9	71	3	7	8
hsa-miR-550a-5p	2	0	23	23	28	24	68	9	71	3	7	8
hsa-miR-556-5p	2	0	0	0	0	0	3	0	4	0	0	0
hsa-miR-582-5p	2	0	12	0	0	0	38	0	9	0	0	0
hsa-miR-590-5p	2	0	0	0	0	0	5	0	9	0	0	0
hsa-miR-625-3p	2	0	2	0	0	0	16	0	9	1	7	0
hsa-miR-6501-5p	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-490-3p	2	21	6	47	55	2	19	3	6	1	5	4
hsa-miR-375	2	8	11	0	6	2	3	0	21	0	68	4
hsa-miR-3200-5p	2	7	2	0	17	0	16	0	7	10	7	4
hsa-miR-4646-5p	2	7	0	0	0	0	0	9	0	0	0	1
hsa-miR-365b-5p	2	5	9	0	6	11	3	3	3	7	4	17
hsa-miR-378g	2	5	36	0	6	16	16	0	6	0	0	17
hsa-miR-939-5p	2	5	3	0	14	2	0	0	9	0	0	3
hsa-miR-122-5p	2	3	9	23	6	0	3	3	1	228	5	0
hsa-miR-1278	2	2	2	0	3	3	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-3934-5p	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4688	2	2	1	0	6	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-550a-3p	2	2	0	0	3	6	3	0	13	3	9	6
hsa-miR-652-5p	2	2	1	0	0	0	5	0	0	0	0	0
hsa-miR-873-5p	2	2	5	0	6	0	0	0	6	0	0	1
hsa-let-7f-1-3p	2	0	1	0	0	2	0	0	4	0	5	1

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-106a-3p	2	0	2	0	0	0	5	0	3	0	0	0
hsa-miR-1304-5p	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-1537	2	0	2	0	0	0	5	0	3	10	0	0
hsa-miR-205-5p	2	0	0	0	0	3	3	0	7	0	1	0
hsa-miR-222-5p	2	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-3064-5p	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
hsa-miR-3150b-3p	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-3177-3p	2	0	1	0	0	2	0	0	3	4	0	1
hsa-miR-365a-3p	2	0	2	0	0	2	3	0	3	0	0	0
hsa-miR-365b-3p	2	0	2	0	0	2	3	0	3	0	0	0
hsa-miR-3691-5p	2	0	8	0	14	3	8	0	0	1	0	0
hsa-miR-371a-5p	2	0	0	0	0	0	11	0	0	3	4	0
hsa-miR-372	2	0	0	0	0	0	11	12	0	4	0	0
hsa-miR-3943	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-429	2	0	5	0	0	0	5	0	1	0	0	0
hsa-miR-4457	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-4476	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4520a-3p	2	0	0	0	8	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-4670-3p	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4762-5p	2	0	0	0	0	3	5	0	0	0	1	0
hsa-miR-4772-5p	2	0	3	0	0	0	3	0	7	0	0	0
hsa-miR-4775	2	0	5	0	8	2	8	0	3	0	1	0
hsa-miR-5001-3p	2	0	1	0	0	2	5	0	1	1	1	1
hsa-miR-5190	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
hsa-miR-5191	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-570-3p	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-580	2	0	2	0	0	0	5	0	1	0	0	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-6511a-5p	2	0	2	0	0	2	3	0	0	0	0	1
hsa-miR-9-5p	2	0	5	0	0	0	3	0	3	0	0	0
hsa-miR-6515-5p	1	13	7	0	0	3	19	0	10	1	0	0
hsa-miR-26b-3p	1	7	2	0	0	2	3	3	19	4	26	8
hsa-miR-3605-3p	1	5	2	0	3	6	0	3	6	0	3	0
hsa-miR-4772-3p	1	3	2	0	0	0	8	12	12	3	1	1
hsa-miR-576-5p	1	3	1	70	17	0	3	0	7	3	1	1
hsa-miR-378e	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-103a-2-5p	1	0	2	0	3	0	11	9	12	0	0	0
hsa-miR-1261	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-1276	1	0	2	0	0	2	3	0	0	0	0	3
hsa-miR-1306-3p	1	0	1	0	0	2	0	3	1	4	8	4
hsa-miR-15a-3p	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1
hsa-miR-190a	1	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	1
hsa-miR-19a-5p	1	0	0	0	0	0	3	0	4	0	0	0
hsa-miR-200c-3p	1	0	1	0	0	0	3	0	1	0	1	0
hsa-miR-299-3p	1	0	0	0	8	0	0	0	3	0	4	0
hsa-miR-30b-3p	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
hsa-miR-3160-3p	1	0	1	0	0	0	3	0	1	0	0	0
hsa-miR-3163	1	0	3	0	6	3	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-3177-5p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3180	1	0	2	0	0	2	0	0	3	1	1	4
hsa-miR-3180-3p	1	0	2	0	0	2	0	0	3	1	1	4
hsa-miR-3188	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3194-5p	1	0	0	0	0	0	8	0	1	0	0	0
hsa-miR-3199	1	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-340-3p	1	0	1	0	3	0	14	0	6	0	4	4

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-34c-5p	1	0	20	0	3	6	106	0	62	4	7	15
hsa-miR-3613-3p	1	0	1	0	8	6	11	0	12	1	1	4
hsa-miR-3679-5p	1	0	0	23	3	0	3	0	0	24	4	0
hsa-miR-3687	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-383	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3916	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3939	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1
hsa-miR-3960	1	0	0	0	6	3	0	0	0	1	5	0
hsa-miR-432-5p	1	0	2	23	0	2	0	0	10	1	3	3
hsa-miR-4326	1	0	0	0	0	2	3	0	7	1	3	3
hsa-miR-449c-5p	1	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	3
hsa-miR-4637	1	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-4647	1	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	1
hsa-miR-4648	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4654	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4660	1	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	1
hsa-miR-4724-5p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
hsa-miR-4741	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-4748	1	0	0	0	0	0	8	0	0	3	0	0
hsa-miR-4752	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4757-3p	1	0	3	0	0	0	3	0	0	1	0	0
hsa-miR-4804-5p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-494	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-495-3p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-548aa	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
hsa-miR-548ai	1	0	2	0	0	0	5	0	0	0	0	0
hsa-miR-548ap-3p	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-548at-	1	0	11	0	0	2	5	0	0	0	0	0

5p

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-548t-3p	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
hsa-miR-551a	1	0	0	0	0	0	8	3	6	3	3	0
hsa-miR-561-5p	1	0	14	0	0	2	8	0	0	0	0	1
hsa-miR-5680	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-570-5p	1	0	2	0	0	0	5	0	0	0	0	0
hsa-miR-577	1	0	0	0	0	0	8	0	3	1	1	0
hsa-miR-618	1	0	0	0	6	0	11	0	4	1	0	0
hsa-miR-624-5p	1	0	2	0	0	0	3	0	0	0	4	0
hsa-miR-6502-5p	1	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	1
hsa-miR-660-3p	1	0	0	0	0	2	5	0	3	0	1	0
hsa-miR-664b-5p	1	0	0	0	3	0	3	0	0	1	0	0
hsa-miR-676-3p	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-937-5p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-3161	1	28	0	0	0	0	3	0	3	0	0	1
hsa-miR-296-3p	1	21	3	0	14	5	3	3	3	0	1	3
hsa-miR-516a-5p	1	18	1	0	0	0	0	36	0	0	0	0
hsa-miR-1224-5p	1	10	3	0	8	5	5	0	7	3	1	3
hsa-miR-1262	1	10	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0
hsa-miR-4781-3p	1	10	0	0	0	3	0	0	4	1	1	0
hsa-miR-1285-5p	1	8	1	0	0	0	3	3	1	0	4	0
hsa-miR-194-3p	1	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3157-3p	1	8	2	0	8	3	3	0	3	1	1	1
hsa-miR-6500-3p	1	8	8	0	6	6	3	0	0	1	0	10
hsa-miR-6503-5p	1	8	5	0	17	5	33	12	75	4	1	10
hsa-miR-1295a	1	7	3	0	14	10	3	0	0	1	0	0
hsa-miR-219-1-3p	1	7	2	0	17	2	0	9	0	0	1	1
hsa-miR-29b-2-	1	5	2	0	0	0	0	6	7	0	4	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-138-1-3p	1	0	0	0	0	0	3	0	0	1	8	0
hsa-miR-141-5p	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-182-3p	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
hsa-miR-184	1	0	1	0	0	2	0	0	3	6	0	0
hsa-miR-1908	1	0	2	0	0	8	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-196b-3p	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-202-5p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-2114-3p	1	0	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-2114-5p	1	0	2	0	0	0	0	0	1	3	0	0
hsa-miR-219-5p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-224-3p	1	0	4	0	0	3	3	0	9	0	0	7
hsa-miR-2278	1	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-2467-5p	1	0	1	0	0	0	3	0	9	0	1	0
hsa-miR-26a-2-3p	1	0	2	23	8	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-29b-1-5p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-29c-5p	1	0	2	0	19	0	8	0	15	0	1	1
hsa-miR-3115	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3117-3p	1	0	2	0	6	2	5	0	0	1	0	1
hsa-miR-3122	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3144-3p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3145-3p	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-3145-5p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3150a-3p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3151	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-3159	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3168	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-519c-5p	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-522-5p	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-523-5p	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3909	0	12	13	0	22	6	33	3	43	0	8	7
hsa-miR-873-3p	0	12	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0
hsa-miR-2276	0	10	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0
hsa-miR-4738-3p	0	10	0	23	0	0	0	0	0	0	3	0
hsa-miR-6501-3p	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-517a-3p	0	8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-517b-3p	0	8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-1247-3p	0	7	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-1273a	0	7	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-4745-5p	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-490-5p	0	7	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-136-5p	0	5	0	0	0	0	0	0	3	0	3	1
hsa-miR-3158-3p	0	5	1	0	6	2	3	24	9	0	20	3
hsa-miR-338-5p	0	5	0	0	3	0	8	0	7	0	3	0
hsa-miR-3911	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-4435	0	5	5	0	3	6	3	15	12	0	0	10
hsa-miR-4511	0	5	8	0	8	5	14	9	19	0	0	3
hsa-miR-4679	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4785	0	5	0	0	0	3	0	0	1	1	0	0
hsa-miR-548ac	0	5	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
hsa-miR-143-5p	0	3	2	0	0	0	8	0	10	0	0	4
hsa-miR-183-3p	0	3	3	0	6	0	5	0	10	1	7	4
hsa-miR-3173-3p	0	3	0	0	0	0	0	6	3	0	0	0
hsa-miR-4508	0	3	5	0	3	18	0	0	12	1	1	3
hsa-miR-493-3p	0	3	0	0	0	0	3	0	4	0	1	4

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-588	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-6715b-3p	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-18b-3p	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3651	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1
hsa-miR-4485	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	4	1
hsa-miR-548ay-3p	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-548q	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
hsa-miR-636	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-92b-5p	0	2	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
hsa-let-7e-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
hsa-let-7g-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
hsa-miR-1	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0
hsa-miR-100-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
hsa-miR-1185-1-3p	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-1193	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-1197	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-122-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
hsa-miR-124-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-1247-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
hsa-miR-1248	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-1256	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-1257	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-1258	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-1260a	0	0	1	0	0	0	3	0	1	0	0	0
hsa-miR-1260b	0	0	1	23	0	0	3	0	1	0	5	0
hsa-miR-1268a	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-1268b	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-1273c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
hsa-miR-1273e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-1273g-3p	0	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	1
hsa-miR-1277-3p	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-1284	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-1288	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0
hsa-miR-1291	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	3	0
hsa-miR-1298	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-1305	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-1306-5p	0	0	1	0	0	0	5	0	1	0	0	0
hsa-miR-130a-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-1323	0	0	0	23	0	0	0	0	6	0	0	0
hsa-miR-1343	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-135a-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
hsa-miR-135b-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-139-3p	0	0	0	0	6	2	0	0	4	0	0	0
hsa-miR-147b	0	0	3	0	0	0	8	0	0	0	0	0
hsa-miR-1538	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
hsa-miR-154-5p	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0
hsa-miR-16-1-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-1827	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-187-3p	0	0	0	23	3	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-187-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-192-3p	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-19b-1-5p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-200b-3p	0	0	3	0	0	0	11	0	0	0	0	0
hsa-miR-20a-3p	0	0	0	0	0	0	5	3	4	0	0	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-20b-3p	0	0	0	0	0	2	0	0	12	1	1	1
hsa-miR-2115-5p	0	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	0
hsa-miR-211-5p	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-2116-3p	0	0	1	0	0	2	3	0	1	0	1	0
hsa-miR-212-3p	0	0	0	0	0	0	5	0	1	3	1	1
hsa-miR-212-5p	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	3
hsa-miR-216b	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-217	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-218-2-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-24-1-5p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-26a-1-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-27a-5p	0	0	2	0	0	0	5	3	6	6	0	0
hsa-miR-296-5p	0	0	1	0	0	0	3	0	6	0	0	1
hsa-miR-3074-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3120-3p	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-3121-3p	0	0	4	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-3125	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0
hsa-miR-3127-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-3129-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3135a	0	0	0	0	11	0	3	0	0	0	1	3
hsa-miR-3154	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-3155a	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3155b	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3157-5p	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
hsa-miR-3160-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-3164	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-3165	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-3173-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
hsa-miR-3192	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-3195	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
hsa-miR-320e	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-331-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
hsa-miR-3607-3p	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3617-5p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-363-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
hsa-miR-3656	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	1
hsa-miR-3661	0	0	0	0	6	0	0	0	0	1	3	0
hsa-miR-3667-5p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3675-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3675-5p	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3683	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-369-5p	0	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	0
hsa-miR-370	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-376a-5p	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-376b-3p	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-376c-3p	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	1	0
hsa-miR-379-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-382-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0
hsa-miR-3920	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3936	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3937	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
hsa-miR-3938	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-3940-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3	3	0
hsa-miR-3944-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-409-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-4672	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-4676-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-4677-5p	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-4685-3p	0	0	0	0	0	0	3	3	1	0	1	1
hsa-miR-4689	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-4699-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4709-5p	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4732-3p	0	0	1	23	0	2	3	0	1	0	7	1
hsa-miR-4734	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
hsa-miR-4737	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4742-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-4747-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
hsa-miR-4750-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-4753-5p	0	0	2	0	0	5	3	0	0	3	0	0
hsa-miR-4755-3p	0	0	0	0	6	0	0	0	3	0	0	0
hsa-miR-4755-5p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4761-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-4768-5p	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4777-3p	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4783-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
hsa-miR-4784	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-4788	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-4795-3p	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4795-5p	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-4797-3p	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4799-5p	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-4800-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
hsa-miR-483-3p	0	0	0	0	0	0	8	0	6	0	1	0

microRNA	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
hsa-miR-548a-5p	0	0	3	0	0	0	5	0	0	0	0	0
hsa-miR-548aq-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-548at-3p	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	4	0
hsa-miR-548b-3p	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-548g-3p	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-5571-3p	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
hsa-miR-5581-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
hsa-miR-5585-3p	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-5588-5p	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-5696	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
hsa-miR-5699	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
hsa-miR-5706	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0
hsa-miR-579	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-584-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-585	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-6087	0	0	0	0	0	0	3	6	3	1	1	3
hsa-miR-610	0	0	4	0	0	0	16	0	12	0	0	4
hsa-miR-6128	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-6131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hsa-miR-615-3p	0	0	0	0	0	3	5	0	3	0	7	0
hsa-miR-624-3p	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0
hsa-miR-642a-3p	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	1
hsa-miR-6499-5p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-6505-5p	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
hsa-miR-6509-5p	0	0	1	0	6	0	5	3	0	0	0	0
hsa-miR-6511a-3p	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
hsa-miR-6513-3p	0	0	2	0	6	0	0	0	0	0	1	0

ANEXO C - MICRORNAS COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA

microRNAs com diferença significativa após a teste estatístico de Fisher.

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-486-5p	0	hsa-miR-486-5p	0	hsa-miR-486-5p	0
hsa-miR-22-3p	0	hsa-miR-22-3p	0	hsa-miR-22-3p	0
hsa-miR-10b-5p	0	hsa-miR-10b-5p	0	hsa-miR-10b-5p	0
hsa-miR-16-5p	0	hsa-miR-16-5p	0	hsa-miR-16-5p	0
hsa-miR-423-5p	0	hsa-miR-423-5p	0	hsa-miR-451a	0
hsa-miR-143-3p	0	hsa-miR-451a	0	hsa-miR-143-3p	0
hsa-miR-191-5p	0	hsa-miR-143-3p	0	hsa-miR-181a-5p	0
hsa-miR-181a-5p	0	hsa-miR-191-5p	0	hsa-miR-25-3p	0
hsa-miR-25-3p	0	hsa-miR-21-5p	0	hsa-miR-92a-3p	0
hsa-miR-92a-3p	0	hsa-miR-186-5p	0	hsa-miR-10a-5p	0
hsa-miR-10a-5p	0	hsa-let-7i-5p	0	hsa-miR-21-5p	0
hsa-miR-21-5p	0	hsa-miR-101-3p	0	hsa-miR-186-5p	0
hsa-miR-186-5p	0	hsa-miR-30e-5p	0	hsa-miR-142-5p	0
hsa-miR-142-5p	0	hsa-miR-93-5p	0	hsa-let-7i-5p	0
hsa-let-7i-5p	0	hsa-miR-182-5p	0	hsa-miR-192-5p	0
hsa-miR-101-3p	0	hsa-miR-378a-3p	0	hsa-miR-320a	0
hsa-miR-30e-5p	0	hsa-miR-148a-3p	0	hsa-miR-182-5p	0
hsa-miR-320a	0	hsa-miR-26a-5p	0	hsa-miR-151a-3p	0
hsa-miR-93-5p	0	hsa-let-7f-5p	0	hsa-miR-126-5p	0
hsa-miR-30d-5p	0	hsa-let-7g-5p	0	hsa-miR-130a-3p	0

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-126-5p	0	hsa-miR-19b-3p	0	hsa-miR-320b	0
hsa-miR-130a-3p	0	hsa-miR-183-5p	0	hsa-miR-378a-3p	0
hsa-miR-320b	0	hsa-miR-26b-5p	0	hsa-miR-148a-3p	0
hsa-miR-378a-3p	0	hsa-miR-192-5p	9,85E-296	hsa-miR-26a-5p	0
hsa-miR-148a-3p	0	hsa-miR-223-3p	7,92E-277	hsa-let-7f-5p	0
hsa-miR-26a-5p	0	hsa-miR-133a	1,62E-235	hsa-miR-146a-5p	0
hsa-let-7f-5p	0	hsa-miR-126-5p	5,15E-226	hsa-miR-181b-5p	0
hsa-miR-146a-5p	0	hsa-miR-30d-5p	2,09E-220	hsa-miR-221-3p	0
hsa-miR-181b-5p	0	hsa-miR-25-3p	2,26E-213	hsa-miR-130b-3p	0
hsa-let-7g-5p	0	hsa-miR-28-3p	3,44E-206	hsa-miR-19b-3p	0
hsa-miR-221-3p	0	hsa-miR-19a-3p	2,12E-193	hsa-miR-146b-5p	0
hsa-miR-130b-3p	0	hsa-miR-10a-5p	7,66E-184	hsa-miR-128	0
hsa-miR-19b-3p	0	hsa-miR-126-3p	2,03E-173	hsa-miR-155-5p	0
hsa-miR-126-3p	0	hsa-miR-15a-5p	1,48E-159	hsa-miR-222-3p	0
hsa-miR-146b-5p	0	hsa-miR-335-5p	7,63E-157	hsa-miR-19a-3p	0
hsa-miR-155-5p	0	hsa-miR-425-5p	1,91E-141	hsa-miR-181c-5p	0
hsa-miR-222-3p	0	hsa-miR-27b-3p	1,46E-138	hsa-miR-340-5p	0
hsa-miR-26b-5p	0	hsa-miR-340-5p	5,53E-118	hsa-miR-486-3p	1,37E-304
hsa-miR-19a-3p	0	hsa-miR-301a-3p	1,03E-101	hsa-miR-181a-3p	7,02E-288
hsa-miR-181c-5p	0	hsa-miR-107	7,68E-90	hsa-miR-199b-3p	1,28E-277

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-486-3p	0	hsa-miR-150-5p	7,31E-83	hsa-miR-199a-3p	2,69E-275
hsa-miR-340-5p	0	hsa-miR-30b-5p	2,12E-78	hsa-miR-421	5,30E-270
hsa-miR-30b-5p	0	hsa-let-7b-5p	1,95E-78	hsa-miR-181d	9,91E-256
hsa-miR-301a-3p	0	hsa-miR-320b	2,93E-77	hsa-miR-16-2-3p	4,83E-235
hsa-miR-151a-3p	3,10E-300	hsa-miR-142-5p	7,26E-65	hsa-let-7b-5p	5,94E-232
hsa-miR-421	2,06E-297	hsa-miR-106b-5p	2,01E-59	hsa-miR-342-5p	6,17E-226
hsa-miR-107	2,69E-260	hsa-miR-148b-3p	3,93E-58	hsa-miR-195-5p	5,55E-186
hsa-miR-128	4,58E-253	hsa-miR-146b-5p	1,06E-55	hsa-miR-30a-5p	5,72E-172
hsa-miR-151b	6,90E-249	hsa-miR-92a-3p	9,96E-53	hsa-miR-29a-3p	3,92E-166
hsa-miR-151a-5p	9,59E-247	hsa-miR-100-5p	1,75E-51	hsa-miR-151a-5p	2,00E-159
hsa-miR-192-5p	2,72E-246	hsa-let-7a-5p	1,19E-50	hsa-miR-151b	5,55E-159
hsa-miR-27b-3p	3,22E-232	hsa-miR-16-2-3p	5,98E-50	hsa-let-7d-5p	1,40E-144
hsa-miR-425-5p	4,22E-229	hsa-miR-342-3p	1,91E-45	hsa-miR-30b-5p	4,16E-138
hsa-miR-183-5p	4,18E-217	hsa-miR-106b-3p	5,66E-42	hsa-miR-301a-3p	5,04E-134
hsa-let-7a-5p	2,75E-215	hsa-miR-20a-5p	1,46E-41	hsa-miR-224-5p	4,84E-130
hsa-miR-29a-3p	5,93E-199	hsa-miR-140-3p	7,33E-40	hsa-miR-363-3p	3,94E-111
hsa-miR-133a	4,24E-195	hsa-miR-17-5p	1,28E-39	hsa-miR-98-5p	2,07E-98
hsa-miR-342-5p	8,64E-171	hsa-miR-144-3p	3,27E-38	hsa-miR-28-3p	1,39E-96
hsa-miR-195-5p	2,77E-154	hsa-miR-30a-5p	5,70E-35	hsa-miR-26b-5p	8,14E-89
hsa-let-7d-5p	6,22E-149	hsa-miR-199b-3p	8,65E-35	hsa-miR-708-3p	2,01E-88
hsa-miR-342-3p	2,04E-146	hsa-miR-199a-3p	1,00E-34	hsa-miR-423-3p	2,73E-87
hsa-miR-98-5p	1,45E-144	hsa-miR-15b-5p	3,47E-32	hsa-miR-584-5p	1,57E-86

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-181d	1,79E-138	hsa-miR-142-3p	3,30E-27	hsa-miR-301b	1,07E-81
hsa-miR-181a-3p	1,90E-136	hsa-miR-151b	1,38E-26	hsa-miR-101-3p	1,35E-81
hsa-miR-142-3p	1,14E-129	hsa-miR-151a-5p	1,78E-25	hsa-miR-877-5p	2,91E-77
hsa-miR-223-3p	9,74E-126	hsa-miR-423-3p	5,74E-23	hsa-miR-769-5p	1,66E-76
hsa-miR-769-5p	5,84E-118	hsa-miR-23a-3p	7,05E-23	hsa-miR-452-5p	5,77E-76
hsa-miR-335-5p	4,15E-106	hsa-miR-29c-3p	4,48E-21	hsa-let-7a-5p	4,32E-72
hsa-miR-15a-5p	1,08E-100	hsa-miR-27a-3p	3,03E-19	hsa-miR-708-5p	4,70E-71
hsa-miR-27a-3p	1,54E-100	hsa-miR-452-5p	3,85E-18	hsa-miR-126-3p	2,28E-67
hsa-miR-301b	6,63E-83	hsa-miR-144-5p	2,14E-14	hsa-miR-150-5p	1,45E-60
hsa-miR-451a	3,42E-79	hsa-miR-21-3p	3,88E-14	hsa-miR-944	4,26E-56
hsa-miR-497-5p	3,30E-67	hsa-miR-505-3p	4,13E-15	hsa-miR-142-3p	4,02E-54
hsa-miR-584-5p	3,81E-66	hsa-miR-30c-5p	1,11E-12	hsa-miR-30e-5p	3,41E-52
hsa-miR-484	1,54E-64	hsa-let-7c	1,07E-11	hsa-miR-21-3p	3,77E-52
hsa-miR-1307-5p	2,57E-64	hsa-miR-30e-3p	4,00E-11	hsa-miR-107	2,53E-51
hsa-miR-708-3p	6,62E-63	hsa-miR-486-3p	8,03E-12	hsa-miR-181a-2-3p	3,20E-48
hsa-miR-32-5p	9,25E-63	hsa-miR-424-5p	1,15E-10	hsa-miR-1307-5p	4,43E-44
hsa-miR-708-5p	9,07E-62	hsa-miR-98-5p	1,36E-10	hsa-miR-30d-5p	4,58E-44
hsa-miR-877-5p	1,09E-60	hsa-miR-145-5p	3,46E-10	hsa-miR-497-5p	1,40E-43
hsa-miR-106b-5p	9,81E-60	hsa-miR-548aj-5p	6,96E-10	hsa-miR-32-5p	3,77E-39
hsa-miR-28-5p	2,92E-57	hsa-miR-548ar-5p	6,96E-10	hsa-miR-223-3p	5,27E-38
hsa-miR-100-5p	3,37E-56	hsa-miR-548g-5p	6,96E-10	hsa-miR-484	2,64E-37
hsa-miR-20a-5p	7,05E-56	hsa-miR-548x-5p	6,96E-10	hsa-miR-342-3p	5,39E-33
hsa-miR-182-5p	2,02E-51	hsa-miR-548h-	1,36E-09	hsa-miR-148a-	2,97E-31

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
		5p		5p	
hsa-miR-224-5p	2,83E-44	hsa-miR-421	1,91E-09	hsa-miR-183-5p	8,97E-31
hsa-miR-148a-5p	1,45E-43	hsa-miR-378c	1,58E-07	hsa-miR-27a-3p	1,30E-29
hsa-miR-223-5p	5,11E-43	hsa-miR-193a-3p	8,24E-06	hsa-miR-28-5p	1,05E-28
hsa-miR-199b-3p	6,39E-42	hsa-miR-130a-3p	1,50E-05	hsa-miR-378i	2,88E-28
hsa-miR-199a-3p	6,86E-42	hsa-miR-455-5p	2,48E-05	hsa-miR-151b	3,01E-30
hsa-miR-374b-5p	5,84E-40	hsa-miR-769-5p	8,12E-05	hsa-miR-374b-5p	5,11E-27
hsa-miR-17-5p	2,33E-37	hsa-miR-500a-3p	1,47E-04	hsa-miR-223-5p	1,20E-26
hsa-miR-944	2,81E-35	hsa-miR-363-3p	1,85E-04	hsa-miR-589-5p	1,78E-24
hsa-miR-455-5p	3,47E-35	hsa-miR-29a-3p	2,16E-04	hsa-miR-195-3p	9,48E-23
hsa-miR-144-5p	1,17E-27	hsa-miR-181c-5p	1,01E-03	hsa-miR-1299	1,32E-22
hsa-miR-23a-3p	1,05E-25	hsa-miR-320a	3,74E-02	hsa-miR-3202	2,30E-23
hsa-miR-28-3p	1,20E-20	hsa-miR-96-5p	2,74E-01	hsa-miR-320c	2,68E-21
hsa-miR-361-3p	5,09E-19	hsa-miR-28-5p	6,43E+00	hsa-miR-141-3p	6,44E-18
hsa-miR-1180	6,96E-19	hsa-miR-199b-5p	1,26E+01	hsa-miR-361-3p	4,54E-16
hsa-miR-15b-5p	9,28E-19	hsa-miR-151a-3p	1,36E+01	hsa-miR-374a-5p	3,67E-15
hsa-miR-24-3p	1,88E-18	hsa-miR-18a-5p	3,02E+01	hsa-miR-361-5p	6,38E-15
hsa-miR-589-5p	2,84E-18	hsa-miR-152	5,29E+01	hsa-miR-96-5p	2,10E-13
hsa-miR-144-3p	7,08E-17	hsa-miR-497-5p	9,30E+01	hsa-miR-148b-3p	5,52E-13
hsa-miR-141-3p	3,67E-16	hsa-miR-548am-5p	9,51E+01	hsa-miR-501-3p	2,12E-13
hsa-miR-532-5p	4,01E-16	hsa-miR-548au-5p	9,51E+01	hsa-let-7c	1,25E-11

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-151b	7,71E-16	hsa-miR-548c-5p	9,51E+01	hsa-miR-30d-3p	6,92E-11
hsa-miR-16-2-3p	7,87E-16	hsa-miR-548o-5p	9,51E+01	hsa-miR-191-5p	3,01E-10
hsa-miR-374a-5p	2,86E-16	hsa-miR-32-5p	1,40E+02	hsa-miR-27b-3p	4,49E-08
hsa-miR-30e-3p	4,24E-15	hsa-miR-941	1,65E+02	hsa-miR-92b-3p	1,93E-07
hsa-miR-29c-3p	2,34E-14	hsa-miR-24-3p	2,53E+02	hsa-miR-744-5p	3,95E-08
hsa-miR-363-3p	5,74E-14	hsa-miR-155-5p	3,92E+02	hsa-miR-221-5p	5,25E-07
hsa-miR-106b-3p	7,78E-13	hsa-miR-34c-5p	7,19E+01	hsa-miR-3614-5p	3,64E-06
hsa-miR-548e	1,42E-11	hsa-miR-208b	9,59E+02	hsa-miR-425-5p	1,68E-04
hsa-miR-18a-5p	1,19E-11	hsa-miR-625-5p	1,22E+03	hsa-miR-424-3p	3,72E-04
hsa-miR-30d-3p	6,70E-10	hsa-miR-181a-2-3p	1,52E+03	hsa-miR-1270	4,66E-03
hsa-miR-320c	2,53E-09	hsa-miR-532-5p	2,00E+03	hsa-miR-1270	4,66E-03
hsa-miR-92b-3p	2,80E-09	hsa-miR-148b-5p	8,18E+03	hsa-let-7d-3p	1,22E-01
hsa-miR-361-5p	7,10E-09	hsa-miR-516a-5p	1,57E+04	hsa-miR-93-5p	1,94E-01
hsa-miR-424-3p	1,42E-08	hsa-miR-335-3p	2,36E+03	hsa-miR-193b-5p	3,99E-01
hsa-miR-148b-5p	1,38E-07	hsa-miR-224-5p	2,38E+04	hsa-miR-373-3p	4,55E-01
hsa-miR-454-3p	1,66E-08	hsa-miR-378i	3,49E+03	hsa-miR-3614-3p	5,14E-01
hsa-miR-30a-5p	2,43E-07	hsa-miR-301b	3,60E+04	hsa-miR-181c-3p	9,26E-01
hsa-miR-1299	5,38E-07	hsa-miR-125a-5p	3,90E+04	hsa-miR-145-3p	1,17E+00
hsa-miR-548am-5p	1,53E-06	hsa-miR-145-3p	5,04E+04	hsa-miR-455-5p	1,19E+00
hsa-miR-548au-5p	1,53E-06	hsa-miR-15b-3p	7,23E+04	hsa-miR-1180	1,42E+00
hsa-miR-548c-5p	1,53E-06	hsa-miR-133b	7,91E+04	hsa-miR-145-5p	1,66E+00

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-548o-5p	1,53E-06	hsa-miR-484	8,66E+03	hsa-miR-140-3p	4,25E+00
hsa-miR-1270	2,73E-06	hsa-let-7d-5p	1,35E+05	hsa-miR-193b-3p	3,25E+00
hsa-miR-1270	2,73E-06	hsa-miR-223-5p	1,82E+05	hsa-miR-548e	4,73E+01
hsa-miR-3202	3,33E-06	hsa-miR-374b-5p	2,02E+05	hsa-miR-450b-5p	4,85E+01
hsa-miR-181c-3p	3,72E-06	hsa-miR-627	2,21E+05	hsa-miR-760	1,52E+02
hsa-miR-148b-3p	4,03E-06	hsa-miR-744-5p	6,15E+05	hsa-miR-203a	2,12E+02
hsa-miR-140-3p	2,09E-05	hsa-miR-548av-3p	1,27E+06	hsa-miR-125b-2-3p	1,46E+03
hsa-miR-125a-5p	3,29E-05	hsa-miR-548o-3p	1,27E+06	hsa-miR-99b-3p	2,44E+03
hsa-miR-500a-3p	3,51E-05	hsa-miR-338-3p	2,03E+05	hsa-miR-942	5,04E+03
hsa-miR-221-5p	2,03E-04	hsa-miR-1180	3,01E+06	hsa-miR-125b-5p	7,34E+03
hsa-miR-199b-5p	1,41E-03	hsa-miR-490-3p	5,27E+06	hsa-miR-24-3p	1,06E+04
hsa-miR-424-5p	7,38E-04	hsa-miR-195-5p	5,27E+06	hsa-miR-454-3p	1,15E+04
hsa-miR-125b-5p	1,21E-01	hsa-miR-548e	1,47E+07	hsa-miR-93-3p	1,26E+04
hsa-let-7d-3p	3,36E-01	hsa-miR-128	2,51E+06	hsa-miR-193a-3p	1,36E+04
hsa-miR-20b-5p	4,90E-01	hsa-miR-1307-5p	3,85E+07	hsa-miR-502-3p	2,20E+03
hsa-miR-214-5p	6,54E-02	hsa-miR-3161	5,79E+07	hsa-miR-378c	2,38E+04
hsa-miR-505-3p	1,41E+00	hsa-miR-517c-3p	5,92E+07	hsa-miR-425-3p	2,82E+04
hsa-let-7b-5p	1,91E+00	hsa-miR-454-3p	6,84E+06	hsa-miR-511	3,29E+04
hsa-miR-203a	2,14E+00	hsa-miR-106a-5p	8,75E+07	hsa-miR-548h-5p	5,28E+04
hsa-miR-196a-5p	3,09E+00	hsa-miR-450a-5p	1,13E+08	hsa-miR-5010-5p	7,98E+04

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-548ay-5p	1,04E+01	hsa-miR-542-3p	1,18E+08	hsa-miR-378g	1,14E+04
hsa-miR-548d-5p	1,04E+01	hsa-miR-550a-3-5p	1,29E+08	hsa-miR-199a-5p	1,64E+05
hsa-miR-152	1,73E+01	hsa-miR-550a-5p	1,29E+08	hsa-miR-146b-3p	1,92E+05
hsa-miR-99a-5p	1,95E+01	hsa-miR-378g	1,38E+08	hsa-miR-218-5p	2,49E+05
hsa-miR-335-3p	6,25E+01	hsa-miR-378d	2,92E+08	hsa-miR-15a-5p	2,78E+05
hsa-miR-30c-5p	1,31E+02	hsa-miR-196a-5p	3,79E+08	hsa-miR-3688-3p	2,96E+05
hsa-miR-181a-2-3p	1,40E+02	hsa-miR-582-3p	3,80E+08	hsa-miR-106b-3p	6,02E+05
hsa-miR-548av-3p	1,42E+02	hsa-miR-4714-3p	4,21E+08	hsa-miR-532-5p	6,20E+05
hsa-miR-548o-3p	1,42E+02	hsa-miR-99b-5p	6,17E+08	hsa-miR-339-3p	7,13E+04
hsa-miR-193b-5p	2,24E+02	hsa-miR-215	6,85E+08	hsa-miR-499a-5p	8,78E+05
hsa-miR-548av-5p	2,30E+02	hsa-miR-20b-5p	8,12E+08	hsa-miR-215	1,02E+06
hsa-miR-548k	2,30E+02	hsa-miR-548f	1,55E+09	hsa-miR-335-5p	1,86E+06
hsa-miR-664a-3p	3,18E+02	hsa-miR-30a-3p	2,38E+09	hsa-miR-766-5p	2,05E+06
hsa-miR-23b-3p	5,98E+02	hsa-miR-708-5p	2,58E+09	hsa-miR-339-5p	3,52E+06
hsa-miR-195-3p	6,74E+02	hsa-miR-324-5p	3,43E+09	hsa-miR-378f	3,85E+06
hsa-miR-3614-3p	8,22E+02	hsa-miR-652-3p	3,90E+09	hsa-miR-664a-3p	5,15E+06
hsa-miR-590-3p	8,22E+02	hsa-miR-181b-5p	4,43E+09	hsa-miR-18b-5p	5,86E+06
hsa-miR-374a-3p	5,74E+03	hsa-miR-148a-5p	4,64E+09	hsa-miR-30a-3p	6,98E+06
hsa-miR-1304-3p	6,55E+03	hsa-miR-214-5p	5,57E+09	hsa-miR-185-5p	8,26E+06
hsa-miR-150-5p	2,94E+04	hsa-miR-450b-	7,41E+08	hsa-miR-378a-	8,30E+06

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
		5p		5p	
hsa-miR-641	4,11E+03	hsa-miR-548ay-5p	8,26E+09	hsa-miR-671-3p	9,40E+06
hsa-miR-3614-5p	8,58E+03	hsa-miR-548d-5p	8,26E+09	hsa-miR-652-3p	1,12E+07
hsa-miR-516a-5p	9,22E+04	hsa-miR-219-1-3p	0.000110159456433275	hsa-miR-548aj-5p	1,32E+07
hsa-miR-106a-5p	1,90E+05	hsa-miR-181a-3p	0.000121849876635587	hsa-miR-548ar-5p	1,32E+07
hsa-miR-133b	3,53E+05	hsa-miR-518e-5p	0.000147121372651149	hsa-miR-548g-5p	1,32E+07
hsa-miR-193b-3p	3,62E+05	hsa-miR-519a-5p	0.000147121372651149	hsa-miR-548x-5p	1,32E+07
hsa-miR-501-3p	6,62E+04	hsa-miR-519b-5p	0.000147121372651149	hsa-miR-4508	1,34E+07
hsa-miR-218-5p	6,90E+05	hsa-miR-519c-5p	0.000147121372651149	hsa-miR-6503-5p	1,45E+07
hsa-miR-548aj-5p	1,01E+06	hsa-miR-522-5p	0.000147121372651149	hsa-miR-548av-5p	1,92E+07
hsa-miR-548ar-5p	1,01E+06	hsa-miR-523-5p	0.000147121372651149	hsa-miR-548k	1,92E+07
hsa-miR-548g-5p	1,01E+06	hsa-miR-548ap-5p	0.000169337349422175	hsa-miR-23b-3p	2,41E+07
hsa-miR-548x-5p	1,01E+06	hsa-miR-548j	0.000169337349422175	hsa-miR-550a-3-5p	2,87E+07
hsa-miR-627	3,06E+06	hsa-miR-582-5p	0.000169337349422175	hsa-miR-550a-5p	2,87E+07
hsa-miR-452-5p	5,09E+06	hsa-miR-598	0.000177109916798134	hsa-miR-641	3,07E+07
hsa-miR-371b-5p	6,21E+04	hsa-miR-296-3p	0.000197096971103797	hsa-miR-590-3p	3,12E+07
hsa-miR-490-3p	2,07E+07	hsa-miR-378f	0.000242790360257871	hsa-miR-1304-3p	3,33E+07
hsa-miR-378i	2,92E+07	hsa-miR-132-3p	0.000251090912738153	hsa-miR-450a-5p	5,32E+07
hsa-miR-320d	2,94E+07	hsa-miR-342-5p	0.000257431788772766	hsa-miR-320d	7,39E+07

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-548ab	2,94E+07	hsa-miR-195-3p	0.000286360167843663	hsa-miR-185-3p	9,26E+07
hsa-miR-34c-5p	3,09E+06	hsa-miR-331-5p	0.00029555619953396	hsa-miR-3139	1,25E+08
hsa-miR-296-3p	3,22E+07	hsa-miR-99a-5p	0.000331550507253802	hsa-miR-4482-3p	1,45E+08
hsa-miR-18b-5p	4,90E+07	hsa-miR-103a-3p	0.00037053890556185	hsa-miR-99b-5p	1,47E+08
hsa-miR-423-3p	5,11E+07	hsa-miR-125b-1-3p	0.000395738103105296	hsa-miR-629-5p	1,76E+08
hsa-miR-425-3p	6,45E+07	hsa-miR-4646-5p	0.00044331974505181	hsa-miR-22-5p	2,45E+08
hsa-miR-548h-5p	8,53E+06	hsa-miR-519d	0.00044331974505181	hsa-miR-4477b	2,66E+07
hsa-miR-185-3p	1,49E+07	hsa-miR-561-5p	0.000472445080036591	hsa-miR-374a-3p	3,45E+08
hsa-miR-517c-3p	1,65E+08	hsa-miR-532-3p	0.000556268044837039	hsa-miR-548ay-5p	3,71E+08
hsa-miR-29b-3p	1,66E+08	hsa-miR-196b-5p	0.000663000212489142	hsa-miR-548d-5p	3,71E+08
hsa-miR-15b-3p	1,68E+08	hsa-miR-101-5p	0.000663000212489142	hsa-miR-181b-3p	4,58E+08
hsa-miR-760	1,80E+08	hsa-miR-146b-3p	0.00071776790079865	hsa-miR-214-5p	5,08E+08
hsa-miR-199a-5p	1,89E+08	hsa-miR-99b-3p	0.000724089934151916	hsa-miR-99a-5p	5,37E+08
hsa-miR-3161	2,04E+08	hsa-miR-3942-5p	0.000812861590851642	hsa-miR-139-5p	7,79E+08
hsa-miR-548h-3p	2,46E+08	hsa-miR-548az-5p	0.000838884803640042	hsa-miR-20b-5p	8,69E+07
hsa-miR-548z	2,46E+08			hsa-miR-3909	9,13E+08
hsa-miR-4446-3p	4,38E+08			hsa-miR-148b-5p	1,03E+09
hsa-miR-766-5p	4,61E+08			hsa-miR-144-3p	1,20E+09
hsa-miR-339-5p	8,10E+07			hsa-miR-505-3p	1,34E+09
hsa-let-7e-5p	8,29E+08			hsa-miR-625-5p	1,67E+09

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-499a-5p	9,81E+08			hsa-miR-30c-5p	1,84E+09
hsa-miR-378d	1,01E+09			hsa-miR-574-3p	2,43E+09
hsa-miR-5010-5p	1,20E+09			hsa-miR-548a-5p	2,57E+09
hsa-miR-548ap-5p	1,32E+09			hsa-miR-371b-5p	2,87E+09
hsa-miR-548j	1,32E+09			hsa-miR-375	3,12E+09
hsa-miR-219-1-3p	1,54E+09			hsa-miR-99a-3p	4,11E+08
hsa-miR-3942-5p	1,54E+09			hsa-miR-18a-5p	4,97E+09
hsa-miR-3158-3p	1,54E+09			hsa-miR-548a-3p	5,46E+09
hsa-miR-17-3p	1,64E+09			hsa-miR-4435	6,38E+09
hsa-miR-548az-5p	2,14E+09			hsa-miR-4435	6,38E+09
hsa-miR-378c	2,29E+09			hsa-miR-196a-5p	7,32E+09
hsa-miR-138-5p	2,32E+09			hsa-miR-18a-3p	0.000102017718179323
hsa-miR-138-5p	2,32E+09			hsa-miR-193a-5p	0.000136182706229085
hsa-miR-193a-3p	2,39E+09			hsa-miR-941	0.000144660861227263
hsa-miR-324-3p	3,66E+09			hsa-miR-4446-3p	0.000187262480821143
hsa-miR-139-5p	4,10E+09			hsa-miR-3200-3p	0.000202113263577762
hsa-miR-208b	5,01E+09			hsa-miR-4658	0.000247207268361144
hsa-miR-378a-5p	5,07E+09			hsa-miR-4511	0.000278995551892725
hsa-miR-145-5p	5,19E+09			hsa-miR-3605-5p	0.000316236044619826
hsa-miR-942	5,48E+09			hsa-miR-582-3p	0.000333647015405009

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-3912	9,83E+09			hsa-miR-598	0.000388806253680861
hsa-miR-3615	0.000107151310877688			hsa-let-7b-3p	0.00043407033627065
hsa-miR-941	0.000133055341883677			hsa-miR-153	0.000568851334743479
hsa-miR-345-5p	0.000142245154474347			hsa-miR-153	0.000568851334743479
hsa-miR-548ar-3p	0.000173593276697848			hsa-miR-144-5p	0.000591327028947484
hsa-miR-339-3p	0.000174445069944151			hsa-miR-4677-3p	0.000594564713956986
hsa-miR-548f	0.000192214464604008			hsa-miR-210	0.000666616719443765
hsa-miR-3200-3p	0.000222543296089781			hsa-miR-548h-3p	0.000746157319591984
hsa-miR-103a-3p	0.000255606794444455			hsa-miR-548z	0.000746157319591984
hsa-miR-130b-5p	0.000276024769321498			hsa-miR-98-3p	0.000769872251240011
hsa-miR-518e-5p	0.000276024769321498			hsa-miR-125a-5p	0.000790742666285779
hsa-miR-519a-5p	0.000276024769321498			hsa-miR-542-3p	0.000827917046417991
hsa-miR-519b-5p	0.000276024769321498			hsa-miR-17-3p	0.000901198398744297
hsa-miR-519c-5p	0.000276024769321498				
hsa-miR-522-5p	0.000276024769321498				
hsa-miR-523-5p	0.000276024769321498				
hsa-miR-338-3p	0.000294129667093492				
hsa-miR-93-3p	0.000344863293772871				
hsa-miR-373-3p	0.000393011360000256				
hsa-miR-21-3p	0.000416558692405648				
hsa-miR-324-5p	0.000422869179769058				
hsa-miR-181b-3p	0.000608529516606113				

Comparação fase 1 e 2		Comparação fase 2 e 3		Comparação fase 1 e 3	
microRNAs	p-value	microRNAs	p-value	microRNAs	p-value
hsa-miR-4482-3p	0.00062641725767197				
hsa-miR-4477b	0.000638971200040887				
hsa-miR-625-5p	0.000642030176072454				
hsa-miR-4435	0.000670778591154396				
hsa-miR-4435	0.000670778591154396				
hsa-miR-3139	0.000689605005277656				
hsa-miR-582-5p	0.000689605005277656				
hsa-miR-671-3p	0.000727396287762191				
hsa-miR-873-3p	0.000768829952799037				
hsa-miR-519d	0.000768829952799037				
hsa-miR-331-5p	0.00085816030750132				
hsa-miR-548c-3p	0.000900692558107005				