



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Marcos Curcio Angelini

**Expressão de microRNAs em pacientes com diagnóstico
histopatológico prévio de Displasia Neuronal Intestinal do
Tipo B**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção
Coorientadora: Profa. Adj. Érika Veruska Paiva Ortolan

**Botucatu
2018**

Marcos Curcio Angelini

Expressão de microRNAs em pacientes com
diagnóstico histopatológico prévio de Displasia
Neuronal Intestinal do Tipo B

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientadora: Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção
Coorientadora: Profa. Adj. Erika Veruska Paiva Ortolan

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Angelini, Marcos Curcio.

Expressão de microRNAs em pacientes com diagnóstico histopatológico prévio de displasia neuronal intestinal do tipo B / Marcos Curcio Angelini. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção

Coorientador: Erika Veruska Paiva Ortolan

Capes: 20205007

1. Intestinos - Doenças. 2. MicroRNAs. 3. Constipação intestinal. 4. Sistema nervoso entérico - Anomalias.

Palavras-chave: Constipação intestinal; Disganglionoses intestinais; Displasia neuronal intestinal; MicroRNA.

Dedicatórias

Aos meus pais

Ilmar Carvalho Angelini e Magali Curcio Angelini, além dos meus irmãos e família pelo apoio incondicional e incentivo a cada vez mais me tornar um profissional melhor.

Agradecimientos

Ao meu orientador Dr. Pedro Luis Toledo de Arruda Lourenção e a minha coorientadora Dra. Erika Veruska Paiva Ortolan não só pela orientação, mas pela amizade e companheirismo ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis pela enorme contribuição na análise molecular envolvida nesse trabalho e a colega Tainára Francine Félix pela ajuda com o processamento das amostras e análise do microRNA.

À profa. Titular Maria Aparecida Marchesan Rodrigues e a Dra. Simone Terra Lourenção pela análise anatomopatológica dos casos.

Às alunas de iniciação científica Laura Luiza Minelli Rosa e Alana Maia e Silva pela grande contribuição e ajuda, além do companheirismo nas viagens necessárias na busca por pacientes.

Aos pacientes, que gentilmente sederam seu tempo e amostras de material para a análise.

Ao amigo Douglas de Jesus Jacinto Pinto pela ajuda na editoração do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

Epígrafe

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”.

Benjamin Disraeli

Lista de Abreviaturas

Ache: Acetilcolinesterase
DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8
DH (HD): Doença de Hirschsprung
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNI: Displasia Neuronal Intestinal
DNI-A: Displasia Neuronal Intestinal do tipo A
DNI-B (IND-B): Displasia Neuronal Intestinal do tipo B
dsRNA: RNA de fita dupla
EDN3: endothelin 3
EDNRB: endothelin receptor type B
FC: fold change
FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded
GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor
H&E: Hematoxilina e eosina
miRNA: microRNA
NEM2: Neoplasia endócrina múltipla do tipo 2
PCR: Reação de cadeia polimerase
Pré-miRNA: miRNA precursor
pri-miRNA: miRNA primário
PSA-SCAM: Polysialylated neural cell adhesion molecule
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
RET: receptor tyrosine kinase
RISC: RNA-induced silence complex
RNA: ácido ribonucleico
RNAm: RNA mensageiro
RNase: RNA polimerase
SNPs: Nucleotídeos de polimorfismo simples
TRBP: transactivating response RNA-binding protein

Sumário

Capítulo I – Revisão da Literatura

1. Introdução.....	14
2. Aspectos Históricos.....	15
3. Classificação.....	17
4. Epidemiologia.....	18
5. Fisiopatologia.....	19
6. Quando Clínico.....	22
7. Diagnóstico.....	23
8. Tratamento.....	26
9. Aspectos Genéticos.....	27
10. MicroRNA.....	30
11. Referências Bibliográficas.....	33

Capítulo II – Article

“MicroRNA molecular profile in patients with Intestinal Neuronal Dysplasia type B”

Abstract.....	46
Resumo.....	47
1. Introduction.....	48
2. Methods.....	50
3. Results.....	54
4. Discussion.....	56
5. Funding.....	60
6. References.....	61
7. Figures and Tables.....	65
8. Attachment.....	70

Capítulo I

Revisão da Literatura

1. Introdução

Os distúrbios da motilidade intestinal são responsáveis por 3 a 5% das consultas médicas em pediatria e impõem impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, podendo gerar implicações inclusive na vida adulta (Gfroerer & Rolle, 2015). A maioria dessas condições é de origem funcional, mas cerca de 5% dos casos estão relacionados a alguma causa orgânica potencialmente identificável. Dentre estas, merece destaque o grupo heterogêneo de malformações congênitas do sistema nervoso entérico, conhecido como disganglionoses intestinais, do qual fazem parte a Doença de Hirschsprung (DH) e a Displasia Neuronal Intestinal (DNI) (Kapur, 1999; Montedonico et al., 2011; Gfroerer & Rolle, 2015; Westfal & Goldstein, 2017).

A Displasia Neuronal Intestinal do tipo B (DNI-B) é uma entidade controversa dentre as patologias neuromusculares gastrointestinais, pois alguns autores chegaram a considerar que ela não represente uma condição clínica, apesar de suas alterações histopatológicas específicas. Neste sentido, a DNI-B seria considerada como uma variante da normalidade ou um fenômeno secundário induzido por obstrução ou inflamação do trato gastrointestinal (Puri 2012; Gfroerer & Rolle, 2015). Outros autores a consideram como uma variante da DH, pois possui sintomas clínicos semelhantes, apesar da presença abundante de células ganglionares nos plexos nervosos do sistema nervoso entérico (Friedmacher & Puri, 2013).

Em meio a estas controversas, a DNI-B é definida atualmente como uma alteração patológica do plexo submucoso de intestino, com etiologia ainda não totalmente esclarecida e que se manifesta clinicamente por obstrução intestinal ou constipação intestinal crônica, comumente grave (Skába et al., 2006; Seo, 2007; Bruder & Meier-Ruge, 2007; Knowles et al., 2010; Friedmacher & Puri, 2013; Lourenção et al. 2016). Apesar da intensa investigação científica realizada desde sua primeira descrição, ainda existem inúmeras indefinições no que diz respeito a sua etiopatogenia, critérios diagnósticos e condutas terapêuticas (Meier-Huge et al., 2006; Holschneider et al., 2008; Schäppi et al., 2013).

2. Aspectos Históricos

O termo Displasia Neuronal Intestinal surgiu em 1970, quando Nezelof e colaboradores descreveram três casos de megacólon associado a hiperplasia dos plexos nervosos mioentéricos (Nezelof et al., 1970). Em 1971, William Meier-Ruge apresentou a primeira descrição formal da DNI, em pacientes que com os mesmos sintomas da DH, mas que apresentavam células ganglionares na submucosa intestinal (Meier-Ruge, 1971). Ao longo dos anos, outras alterações histopatológicas foram descritas, tais como a hiperplasia dos plexos submucosos e mioentéricos com formação de gânglios gigantes, hipoplasia ou aplasia da inervação simpática do plexo mioentérico, moderada elevação da atividade da acetilcolinesterase nas fibras dos nervos parassimpáticos da lâmina própria e muscular circular, e em alguns casos, a presença isolada de células ganglionares na lâmina própria e entre as fibras musculares da muscular da mucosa (Schofield & Yunis, 1991).

Em 1991, a partir das discussões do *Consensus of German Pathologists*, Borchard e Meier-Ruge propuseram um *guideline* para o diagnóstico de DNI-B, com base na análise histopatológica de biópsias da parede retal, composto por dois critérios obrigatórios: hiperplasia do plexo submucoso e aumento na atividade de acetilcolinesterase (Ache) nas fibras nervosas em torno de vasos sanguíneos submucosos; e dois critérios complementares: heterotopia neuronal e aumento da atividade de Ache na lâmina própria (Borchard et al., 1991; Puri, 1997; Cord-Udy et al., 1997; Puri, 2003).

Ainda na década de 90, novos critérios diagnósticos foram propostos, dando maior importância a necessidade de identificação de gânglios gigantes na submucosa, definidos pela presença de um número mínimo de células ganglionares, que variam de 6 a mais de 10 por gânglio (Schofield & Yunis, 1991; Moore et al., 1994; Meier-Ruge, 1995; Kobayashi et al., 1995; Holschneider et al., 2008; Mahesha et al., 2008). Em 2004, Meier-Ruge e colaboradores propuseram um critério quantitativo para o diagnóstico histopatológico da DNI-B, definido pela presença de ao menos 20% de gânglios nervosos gigantes na submucosa, com mais de 8 células ganglionares em cada um, em um mínimo de 25 gânglios submucosos que devem ser analisados. Esses critérios exigem a realização de cortes de congelação que são submetidos a um painel histoquímico específico composto por lactato desidrogenase, succinil desidrogenase e óxido nítrico sintase (Meier-Ruge et al., 2004; Meier-Ruge et al., 2006).

Estas frequentes alterações nos critérios diagnósticos da DNI-B, durante as últimas 4 décadas, causaram não apenas confusão, mas um certo ceticismo sobre a existência desta doença (Schäppi et al., 2013). Nas publicações mais recentes, o principal debate vem sendo representado pela indefinição quanto à relação causal entre achados histopatológicos e sintomas clínicos, essencial para que a DNI-B possa ser definida como uma doença específica (Mondragón & Reyes- Múgica, 2006; Lourenção et al., 2016;). Há, também, consenso sobre a necessidade de novas pesquisas que esclareçam as incertezas sobre o diagnóstico, a fisiopatologia e as características morfológicas e clínicas da DNI-B (Schäppi et al., 2013; Friedmacher & Puri, 2013; Martucciello et al., 2005).

3. Classificação

Fadda et al. (1983) classificaram a DNI em dois subtipos distintos, de acordo com características clínicas e histológicas. A DNI do tipo A (DNI-A) é uma condição extremamente rara, responsável por menos de 5% dos casos, caracterizada por hipoplasia ou aplasia congênita da inervação simpática do intestino. Tipicamente se apresenta de forma aguda no período neonatal, com prognóstico ruim, e é caracterizada pela presença de distensão abdominal, vômitos, episódios de diarreia com aspecto hemorrágico, podendo apresentar tendência a espasticidade do cólon e obstrução intestinal (Csury & Peña, 1995; Kapur, 2003; Puri, 2012; Friedmacher & Puri, 2013). O aumento moderado da atividade da acetilcolinesterase (Ache) nos nervos parassimpáticos foi o motivo pelo qual a denominação DNI foi adotada para estes casos. A inervação simpática está diminuída em diferentes graus e, por isso, Meier-Ruge & Bruder (2005) a consideram como um tipo de enterocolite necrosante, causada pela imaturidade do sistema nervoso simpático do cólon distal. A ausência de sinapses simpáticas dentro dos gânglios dos plexos mioentéricos e o consequente aumento do tônus parassimpático são considerados os causadores dos espasmos focais do cólon. Produção diminuída de muco e diminuição do aporte de sangue parecem ser os principais fatores para aparecimento da enterocolite (Meier-Ruge & Bruder, 2005; Lourenção et al., 2016).

A DNI-B é responsável por mais de 95% dos casos e, por isso, é considerada, por muitos autores, como sinônimo de DNI. É caracterizada por hiperplasia do plexo parassimpático submucoso. Achados histológicos típicos são a hiperganglionose, gânglios gigantes, células ganglionares ectópicas e aumento da atividade da Ache na lâmina própria e ao redor dos vasos sanguíneos da submucosa. Os sintomas são parecidos com os da DH, sendo a constipação intestinal, com diferentes graus de gravidade, a característica mais marcante, podendo inclusive desenvolver megacólon. Geralmente mais tardia que a DNI-A, a DNI-B apresenta-se clinicamente, na maioria das vezes, entre os 6 meses e os 6 anos de idade. DNI-B pode ocorrer de forma isolada ou em associação com a DH (Csury & Peña, 1995; Kapur, 2003; Puri, 2012; Friedmacher & Puri, 2013).

4. Epidemiologia

A DNI-B tem incidência estimada de 1 para cada 7500 nascimentos. No entanto, a taxa da doença isolada é extremamente variável nos diversos estudos publicados, de 0,3% a 40% de todas as biópsias retais por sucção (Friedmacher & Puri, 2013). É considerada por alguns autores como a segunda anomalia de inervação intestinal mais comum, ficando atrás somente da DH (Gronero-Cendón et al., 2007). A casuística dos pacientes com DH que apresentam concomitantemente DNI-B também é variável, com taxas entre 6% a 44%, e está associada à manutenção de sintomas obstrutivos intestinais, mesmo após o tratamento cirúrgico da DH (Meier-Ruge et al., 2006; Matias, 2011; Montedonico et al., 2011).

Esta grande variação na incidência demonstrada nos estudos pode ser justificada pela falta de consenso sobre os critérios diagnósticos da DNI-B (Holschneider et al., 2008; Friedmacher & Puri, 2013) e pelas diferenças consideráveis presentes nas metodologias utilizadas para análise laboratorial das biópsias de reto, para as técnicas de amostragem de células ganglionares e para a interpretação das características histológicas (Swaminathan et al., 2015).

Taguchi et al. (2014) analisou dados de 161 instituições japonesas de gastroenterologia e de cirurgia pediátrica, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2009, e encontrou 355 pacientes com “desordens relacionadas a DH”. Destes, 13 pacientes haviam recebido o diagnóstico de DNI-B com base nos critérios histopatológicos habitualmente utilizados, mas apenas 4 pacientes eram capazes de contemplar os critérios quantitativos mais recentemente proposto por Meier Ruge et al. (2004).

Também podemos observar que a DNI-B tem distribuição geográfica irregular sendo mais comum o diagnóstico em países europeus. Isso pode ser explicado, de certa forma, pela maior parte dos artigos publicados serem provenientes desse continente (Schimpl et al., 2004).

5. Fisiopatologia

A DNI-B é considerada uma malformação do sistema nervoso entérico, limitada ao plexo submucoso do cólon, cuja etiologia ainda é pouco conhecida (Meier-Ruge et al., 2006). Algumas hipóteses vêm sendo elaboradas para explicar sua fisiopatologia, mas nenhuma delas ainda é amplamente aceita (Martucciello et al., 2005; Holschneider et al., 2008).

O sistema nervoso entérico tem seu desenvolvimento embriológico a partir dos tecidos derivados da crista neural. Alterações primárias, determinadas geneticamente podem exercer influência nesse desenvolvimento, levando às alterações que caracterizam a DNI-B (Holschneider et al., 2008). Essa hipótese encontra sustentação pela associação entre DNI-B e outras doenças genéticas intestinais e extra-intestinais (Berger et al.; 1998; Martucciello et al., 2002; Corduk et al., 2007). No entanto, associações entre DNI-B e mutações em genes que afetam o desenvolvimento do sistema nervoso entérico, como por exemplo o RET, o GDNF, o EDNRB e o EDN3 permanecem confusas e foram demonstradas apenas em estudos experimentais com animais. Apenas algumas combinações de polimorfismos de nucleotídeos únicos no proto-oncogene RET foram identificadas em pacientes com IND-B (Moore, 2017).

Alguns autores consideram a DNI-B como uma resposta adaptativa do sistema nervoso entérico a fenômenos obstrutivos ou inflamatórios intestinais, ocorridos no período fetal, perinatal ou pós-natal. Há relatos de achados morfológicos sugestivos de DNI-B em áreas de intestinos imediatamente acima de atresias intestinais, prolapso de mucosa retal, ânus imperfurado, enterocolite necrosante (Schofield & Yumis, 1991; Lumb & Moore, 1998; Koletzko et al., 1993; Sacher et al., 1993; Holschneider et al., 1994; Csury e Penã, 2005; Zorenkov et al., 2011;). Estas respostas secundárias a obstrução ou inflamação foram estudadas experimentalmente por diversos autores e seus resultados também são conflitantes (Pickard et al., 1981; Moore et al., 1993; Gálvez et al., 2004;). Moore et al. (1993), em um modelo de obstrução intestinal parcial de cólon em ratos, mostrou de maneira inesperada, uma diminuição do número de células ganglionares em comparação ao grupo controle, que acabou sendo justificada pelo aumento do diâmetro do cólon devido a distensão de sua parede. Já Gálvez et al. (2004) em modelo de obstrução intestinal crônica em ratos, demonstrou alterações histopatológicas compatíveis com DNI-B.

Como já visto, existe uma associação comum entre DH e DNI-B e, nesses casos, os segmentos proximais à obstrução do cólon agangliônico apresentam características

histopatológicas de DNI-B. Tais alterações poderiam, desta forma, serem justificadas tanto pelas alterações primárias de origem embriológica do sistema nervoso entérico, quanto pelas alterações secundárias em resposta a obstrução intestinal (Briner e al., 1986; Berry, 1993; Berger et al., 1998; Schmittenebecher et al., 1999; Kobayashi et al., 2004; Holschneider et al., 2008).

Alguns autores, por sua vez, sugeriram que as alterações observadas na DNI-B possam representar uma variante do desenvolvimento normal do intestino (Friedmacher & Puri, 2013). Com o avançar da idade, são observados aumento do tamanho das células ganglionares e diminuição de seu número por plexo (Schofield & Yunis, 1991; Meier-Ruge et al., 1995; Cord-Udy et al., 1997; Koletzko et al., 1999; Coerdts et al., 2004). Estes achados podem estar relacionados a um processo fisiológico de maturação, que envolve apoptose de componentes do sistema nervoso entérico (Meier-Ruge et al., 2004, 2006). Schimpl et al. (2004) analisaram retrospectivamente 105 pacientes com DNI-B. Sessenta e dois por cento destes pacientes tinham menos de 6 meses de idade, 31% tinham entre 6 e 12 meses e apenas 8% dos pacientes se apresentavam mais de 1 ano de idade. Estes resultados poderiam indicar um processo de maturação do sistema nervoso entérico, que foi retardado patologicamente, ou a uma anormalidade do desenvolvimento do sistema nervoso intestinal com normalização espontânea com o decorrer da idade.

Outro ponto de discussão em relação a DNI-B é a relação causa-efeito, não ficando claro se a sintomatologia observada nos pacientes tem relação direta com achados histopatológicos. Na maioria dos casos o diagnóstico é estabelecido em pacientes com quadro de constipação intestinal, submetidos à biópsia retal para afastar o diagnóstico de DH (Holschneider et al., 2008). Entretanto, em um estudo realizado por Coerdts et al. (2004), 36 crianças assintomáticas, que tiveram seus cólons analisados por outros motivos, tiveram achados histopatológicos característicos de DNI-B. Outros estudos também não conseguiram demonstrar correlação entre achados histopatológicos, os sintomas clínicos e alterações radiológicas e manométricas (Schärli, 1992; Koletzko et al., 1993; Ure et al., 1994; Cord-Udy et al., 1997).

Bosman et al. (2001) investigando 17 pacientes com diagnóstico de DNI-B e os comparando a pacientes normais, puderam observar, além das alterações habituais da DNI-B, um aumento significativo da NO sintase, enzima responsável pela síntese de óxido nítrico, que é um neurotransmissor capaz de induzir o relaxamento do músculo liso. Portanto, fizeram

a hipótese de que superprodução de óxido nítrico desempenha papel na patogênese da pseudo-obstrução intestinal secundária à DNI-B.

Por tudo isso, alguns autores ainda não consideram a DNI-B como uma entidade clínica verdadeira, mas uma alteração histopatológica do sistema nervoso entérico que pode apresentar ou não repercussões clínicas (Berry, 1993; Martucciello et al., 2005; Mondragón & Múgica, 2006).

6. Quadro Clínico

A maioria dos pacientes com DNI-B apresenta-se com constipação intestinal crônica, associada ou não à distensão abdominal. A obstrução intestinal é o sintoma clínico mais característico em lactentes e crianças mais jovens (Friedmacher & Puri, 2013). Montedonico et al. (2002) buscaram identificar os sintomas clínicos específicos apresentados por pacientes com DNI-B e correlaciona-los à severidade dos achados histopatológicos. Um dos padrões clínicos identificados foram crianças, menores de 1 ano de idade, com história de constipação intestinal e distensão abdominal, mimetizando a DH. A obstrução intestinal foi o sintoma clínico mais presente, sem formação de fecaloma.

Atraso na eliminação do mecônio, distensão abdominal, vômitos e dificuldade de alimentação podem aparecer nos primeiros dias de vida (Pini-Prato et al., 2007). Parte desses pacientes pode manter os sintomas ao longo da vida, evoluindo constipação intestinal grave, refratária aos diferentes tipos de tratamento clínico (Schmittenebecher et al., 2000; Gillick et al., 2001; Mattioli et al., 2004). Por outro lado, alguns pacientes com constipação intestinal podem apresentar melhora dos sintomas após os 4 anos de idade, o que favorece a hipótese de maturação do sistema nervoso entérico nos primeiros anos de vida. Além disso, os achados histopatológicos que caracterizam a DNI-B também podem desaparecer nos pacientes com este tipo de evolução clínica (Meier-Ruge et al., 2006).

Embora raros, sintomas graves como episódios de enterocolite, obstrução intestinal, volvo intestinal e intussuscepção intestinal também são descritos como complicações da DNI-B (Sacher et al., 1991; Montedonico et al., 2002; Peng et al., 2011; Jáquez-Quintana et al., 2013).

Publicações recentes vêm demonstrando um número crescente de casos de DNI-B em adultos, alguns apresentando sintomas de constipação desde a infância e outros com início tardio dos sintomas (Voderholzer et al.; 2000; Vijayaraghavan et al., 2006; Vougas et al., 2014). Complicações graves relacionadas a DNI-B em adultos também já foram descritas, como pseudo-obstrução intestinal crônica e obstrução intestinal aguda. (Bañares et al., 2014; Sanclemente et al., 2014; Vougas et al., 2014).

7. Diagnóstico

A suspeita clínica de disganglionose intestinal, incluindo a DNI-B, se faz na presença de sinais e sintomas como eliminação tardia do mecônio, distensão abdominal com sinais de obstrução ou suboclusão intestinal e constipação intestinal grave (Gil-Vernet et al., 2006). Estes pacientes devem ser investigados para possíveis causas orgânicas de constipação intestinal, particularmente a DH, que é a mais prevalente das disganglionoses intestinais (Tabbers et al., 2014). Sendo assim, os exames habitualmente utilizados na investigação da DH, tais como enema opaco, manometria anorretal e biópsia, também acabam sendo realizados nos pacientes com diagnóstico de DNI-B (Gil-Vernet et al., 2006; Wu et al., 2013).

A maioria dos pacientes com DNI-B não exibe nenhuma característica radiológica específica nos exames de enema opaco, habitualmente apresentando apenas dilatação do reto e sigmóide, achado típico de pacientes com constipação intestinal. Podem apresentar, também, dilatação de segmentos proximais do cólon, de forma semelhante ao que acontece na DH (Gil-Vernet et al., 2006; Puri, 2012). Li et al. (2013), por sua vez, demonstraram que a ingestão de farinha de bário com avaliação radiológica sequencial teria a vantagem de testar as capacidades de transferência gastrointestinal e encontrar mudanças fisiológicas e patológicas simultaneamente, podendo contribuir para investigação diagnóstica de pacientes com DNI-B.

Na manometria anorretal, o reflexo esfíncteriano também é inespecífico, podendo estar presente, ausente ou com morfologia atípica (De Lorink et al., 2006; Gil-Vernet et al., 2006; Friedmacher & Puri 2013). No entanto, Guo et al. (2008), analisaram os reflexos esfíncterianos de 17 pacientes com diagnóstico histopatológico de DNI-B, comparados a pacientes com constipação funcional, e observaram que 10 pacientes com DNI-B apresentaram 2 formas específicas de ondas de reflexo (em forma de “W” ou de “U”), que não foram observadas em nenhum dos pacientes com constipação funcional. Desta forma, estes autores sugerem que a manometria anorretal possa contribuir na triagem de pacientes com DNI-B. Meier-Ruge et al. (2006), por outro lado, consideram a ausência de reflexo inibitório retoanal como característica da DNI-B. Essa ausência de reflexo tende a desaparecer com o tempo e pode indicar atraso da maturação do sistema nervoso entérico (Meier-Ruge et al., 2006).

O diagnóstico da DNI-B depende fundamentalmente da análise histopatológica de biópsias do reto (Friedmacher & Puri 2013; Schäppi et al., 2013). No entanto, os critérios para o diagnóstico histopatológico vêm mudando ao longo dos anos, o que dificulta a prática clínica e a comparação de estudos realizados (Meier-Ruge et al., 2006). Os critérios diagnósticos mais recentemente propostos são quantitativos e foram definidos por Meier-Ruge et al. (2004). Dependem de um aumento relativo da densidade de gânglios submucosos gigantes. Um gânglio gigante é definido como aquele que contenha mais do que 8 células nervosas. Além disso, mais de 20% dos gânglios do plexo devem ser gigantes. Um número mínimo de 25 gânglios submucosos deve ser analisado, e esses critérios devem ser aplicados somente para crianças maiores de 1 ano de idade (Meier-Ruge et al., 2004, 2006). Como o diagnóstico depende de dados quantitativos, que são afetados por variáveis técnicas, recomenda-se que todo o processo laboratorial seja altamente padronizado. A biópsia deve ser adequada, a fim de se obter quantidade suficiente de tecido submucoso para análise, e os cortes de congelação devem ter 15µm de espessura, e serem submetidos a um painel histoquímico específico, composto por lactato desidrogenase, succinil desidrogenase e óxido nítrico sintase (Meier-Ruge et al., 2004, 2006).

No entanto, apesar de estes critérios terem sido aceitos pela comunidade científica, pouco são os relatos de grandes séries que o utilizaram (Taguchi et al., 2014). A necessidade de material a fresco e de colorações histoquímicas específicas, com disponibilidade restrita a alguns centros, são limitações que dever ser consideradas (Lourenção, et al. 2016). Também é incerto se esses critérios podem ser aplicados nas seções histológicas de 5µm de espessura, em material incluído em parafina, utilizados na análise histológica padrão da hematoxilina e eosina (H&E) e para métodos imunohistoquímicos (Schäppi et al., 2013; Meier-Ruge et al., 2006). Terra et al. (2016) testaram a aplicabilidade dos critérios estabelecidos por Meier-Ruge et al. (2004), analisando peças cirúrgicas de 29 pacientes com diagnóstico de DNI-B estabelecido previamente pelos critérios do Consenso de Frankfurt (1990), em cortes histológicos processados para histologia convencional pela H&E. Apenas 1 paciente completou os critérios diagnósticos numéricos, fazendo com que os autores chegassem a conclusão de que os critérios numéricos recomendados para cortes de 15µm, corados por painéis histoquímicos específicos, apresentam aplicabilidade limitada quando transposto a análise histológica convencional.

Muitas outras técnicas de coloração têm sido aplicadas na investigação das disganglionoses intestinais. A Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-diaforase (NADPH-d), a molécula de adesão celular neural (NCAM/CD56), o c-kit (tyrosine-protein kinase kit ou CD117), o produto do gene da proteína 9.5 (PGP9.5), a proteína S-100 e a sinaptofisina tiveram o perfil de expressão investigados em pacientes com DNI-B, mas os seus padrões de expressão ainda não foram determinados, dificultando a utilização destes métodos na prática clínica (Krammer et al., 1994; Kobayashi et al., 1997; Miyazaki et al., 1998; Nogueira et al., 2001; Rolle et al., 2007; Geramizadeh et al., 2013).

8. Tratamento

A tendência atual é a de que os pacientes com diagnóstico de DNI-B sejam inicialmente tratados conservadoramente, através do uso de enemas e medicações laxativas. Grande parte dos pacientes apresenta adequada resposta a este tipo de tratamento (Friedmacher & Puri 2013). Skába et al. (2006) referem sucesso em mais de 50% dos pacientes tratados clinicamente. Em pacientes com quadros graves de constipação ou de obstrução intestinal, pode ser necessária a realização de uma colostomia temporária (Meier-Ruge et al., 2006).

Pacientes que mantêm sintomas refratários após no mínimo 6 meses de tratamento clínico adequado, podem ser candidatos a terapêuticas mais invasivas. A miectomia do esfíncter anal interno e a aplicação de toxina botulínica no esfíncter anal interno são opções descritas na literatura e que podem apresentar resultados satisfatórios (Puri, 2003, 2012; Di Lorenzo & Youssef, 2010; Friedmacher & Puri, 2013). As ressecções segmentares do cólon são raramente necessárias em crianças, ficando restritas a casos específicos. Já no adulto com diagnóstico de DNI-B podem ser consideradas como opções de tratamento (Meier-Ruge et al., 2006; Friedmacher & Puri, 2013).

Existem muitos relatos de casos clínicos que descrevem pacientes submetidos à colectomias parciais para DNI-B isolada. Os resultados são variáveis, podendo ocorrer melhora dos sintomas obstrutivos após a cirurgia. Na maioria destes relatos, não é claro como o limite cranial para a ressecção cirúrgica foi escolhido, nem se a DNI-B foi restrita ao intestino ressecado. Além disso, não há estudos bem controlados comparando cirurgia e tratamento conservador (Maier-Ruge et al., 2006). Friedmacher & Puri (2013) reforçam que a indicação para a cirurgia não deve ser determinada apenas pelos achados histopatológicos, mas deve considerar principalmente os sintomas e a evolução clínica apresentada pelo paciente.

Na presença de associação entre DH e DNI-B, a regra básica é a ressecção do segmento agangliônico do cólon. A taxa de complicações pós-operatórias, comparando pacientes com DH isolada e com DH associada à DNI-B, são quase as mesmas, sendo a constipação intestinal a mais frequente. Alguns estudos demonstram que esta constipação intestinal pós-operatória pode ser autolimitada, mantendo-se por apenas alguns meses (Meier-Ruge et al., 2006).

9. Aspectos Genéticos

Os eventos moleculares e celulares que regulam a colonização do intestino pelas células da crista neural ainda estão sendo elucidados (Kapur, 1999; Friemacher & Puri, 2013). Em vista disso, a base genética da DNI-B também é pouco conhecida e, até o momento, não foram identificadas alterações genéticas específicas. Os relatos de ocorrência familiar de DNI-B suportam a teoria de que deve haver um componente genético envolvido na sua etiopatogenia (Friedmacher & Puri, 2013). Foram descritos casos de gêmeos monozigóticos afetados pela doença e famílias cujos membros tiveram o diagnóstico histopatológico de DNI-B, ao longo de algumas gerações (Kobayashi et al. 1996; Costa et al., 2000; Fernández et al., 2009).

A comum associação entre DNI-B e a DH reforça a hipótese de que os genes e mecanismos moleculares responsáveis pela DH possam estar envolvidos na gênese da DNI-B (Gath et al., 2001; Tou et al. 2006). O mapeamento genético em famílias com DH e a análise mutacional de genes candidatos levaram a identificação de pelo menos 7 genes que contribuem para o risco de DH (Kapur, 1999; Gath et al., 2001). Esses genes têm sido investigados na busca por potenciais mutações que possam estar relacionadas também à DNI-B.

O proto-oncogene RET codifica um receptor de tirosina-cinase presente na superfície celular e que é expresso no estágio inicial da embriogênese e desempenha papel central na diferenciação do sistema nervoso periférico e do sistema excretor (Tou et al. 2006; Matias, 2011). As mutações do RET constituem a alteração genética mais frequentemente observada em pacientes com DH, variando entre 0% a 50% em casos esporádicos (Gath et al., 2001).

Gath et al. (2001) investigaram mutações nas regiões codificantes dos genes RET, GDNF, EDNRB e EDN3. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: 29 pacientes com DH esporádica, 20 pacientes com DNI-B e 12 pacientes com DH associada à DNI-B. Somente 3 mutações RET foram detectadas em pacientes com DH. Em pacientes com DNI-B ou com associação DH + DNI-B não foram encontradas mutações nesses genes, sugerindo que estas duas doenças possam ser geneticamente distintas. Tou et al. (2006) investigaram as mutações no RET em pacientes chineses com DH e DNI-B. Foram avaliados 30 pacientes com DH, 20 pacientes com DNI-B, 18 pacientes apresentavam a associação entre DH e DNI-B e 20 pacientes sem as duas doenças (grupo controle). Através de amostras de sangue periférico,

que tiveram seu DNA genômico extraído e que foram submetidas à análise de reação em cadeia da polimerase (PCR), os autores identificaram 8 mutações em pacientes com DH e com DH + DNI-B. Nenhuma mutação foi encontrada em pacientes com DNI-B e nos pacientes do grupo controle, o que sugere que a mutação do proto-oncogene RET está envolvida na etiopatogenia da DH e que a DNI-B deve realmente ser uma entidade clínica e genética distinta. Por outro lado, Fernández et al. (2009) investigaram a região de codificação do RET e 8 polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em 23 pacientes com DNI-B e em 30 pacientes com DH associada à DNI-B. Foram identificadas várias mutações RET nos pacientes e algumas diferenças na distribuição dos SNPs entre os grupos de estudo, sugerindo um envolvimento do gene RET na patogênese da DNI-B, embora por mecanismos moleculares diferentes dos relacionados à DH.

A PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) é uma proteína crítica para o controle do crescimento celular, proliferação e morte de células do sistema nervoso entérico. Puig et al. (2009) demonstraram que a perda da PTEN (Phosphatase and tensin homolog), deletada no cromossomo 10, pode levar à interrupção do desenvolvimento do sistema nervoso entérico em ratos, causando hiperplasia e hipertrofia, com um fenótipo semelhante a ganglioneuromatose, resultante do aumento da atividade da via de sinalização PI3K/PTEN-AKN-S6K. Os autores evidenciaram, também, alguns casos de pessoas com ganglioneuromatose e pseudoobstrução intestinal crônica que apresentavam a expressão anormalmente baixa de PTEN, com fosforilação de S6 aumentada. O'Donnell & Puri (2011), por sua vez, demonstraram redução acentuada de PTEN nos plexos submucosos e mioentéricos de pacientes com DNI-B e propuseram que a deficiência de PTEN possa interromper a via química associada à proliferação e ao desenvolvimento de células que formam os gânglios nervosos maduros e, assim, causar disfunção da motilidade intestinal.

A DNI-B vem sendo descrita, também, em associação com outras anomalias congênitas, como a má rotação intestinal e a neoplasia endócrina múltipla do tipo 2 (NEM 2) (Rintala et al., 1989; Martucciello et al. 1994, 2002; Ure et al., 1994). Van der Welf et al. (2012) relataram os casos de dois gemelares, de uma família turca, que apresentavam associação de DNI-B e síndrome do intestino curto congênito. Esses pacientes possuíam uma mutação do gene CLMP (*coxsackie and adenovirus receptor-like membrane protein*) que é essencial para o desenvolvimento intestinal e possui expressão relacionada à adesão juncional molecular.

Alguns modelos experimentais de DNI-B vêm sendo descritos, a partir de animais com determinadas alterações genéticas. O Hox11L1 é um gene envolvido na proliferação e diferenciação de células da crista neural periférica. Ratos com supressão de Hox11L1 desenvolvem megacólon com idade entre 3 e 5 semanas, com fenótipo semelhante ao observado em humanos com DNI-B, nas avaliações histológica e imunohistoquímica (Fernández et al, 2009; Friemacher & Puri, 2013). Outro modelo experimental envolve o gene Ncx, necessário para a morte de células neuronais entéricas, sendo fundamental para o desenvolvimento adequado da motilidade gastrointestinal, uma vez que intestinos hiperganglionares estão relacionados à dismotilidade (Kato et al., 2009). Kato et al. (2009) examinaram a maturidade dos neurônios entéricos de ratos Ncx -/- através de PSA-SCAM (*polysialylated neural cell adhesion molecule*) e encontraram imaturidade destas células, sugerindo que o desenvolvimento de megacólon em camundongos Ncx -/- possa estar relacionado à persistência de neurônios imaturos no cólon proximal. Ratos Ncx -/- apresentam sinais típicos de DNI-B no íleo, ceco e cólon proximal, independente da associação de megacólon (Kobayashi, et al. 2007). No entanto, o rastreamento mutacional destes dois genes em humanos não demonstrou mutações em pacientes com DNI-B (Fernández et al, 2009; Friemacher & Puri, 2013).

Outra via genética potencialmente relacionada à DNI-B é a do receptor de endotelina B (Puri, 2003). Um destes receptores, o EDN-3, tem função no desenvolvimento do sistema nervoso entérico de camundongos. Holland-Cunz et al. (2003) demonstraram que camundongos com deficiência heterozigótica deste receptor apresentam alterações histopatológicas compatíveis com DNI-B, apesar de não apresentarem sinais clínicos de dismotilidade intestinal. Estes achados não foram reproduzidos em humanos. Sánchez-Mejías et al. (2010) investigaram a hipótese de que a via de sinalização EDNRB/EDN-3 pudesse desempenhar papel na patogênese da DNI-B em seres humanos. Nenhuma das variantes encontradas pareceu desempenhar papel funcional na gênese da patologia, sugerindo que a DNI-B possa ter origem a partir do ganho de mutações de função em genes relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso entérico.

10. MicroRNA

Em 1993, o primeiro microRNA (miRNA) foi descrito em um estudo sobre as fases evolutivas do nematóide *Caenorhabditis elegans*. Chamado de lin-4, não codificava nenhuma proteína, mas, sim, um par de pequenos RNAs. Esses RNAs apresentavam complementaridade a diversos sítios da região 3' UTR do RNA mensageiro lin-14, regulando sua tradução e influenciando na fase de desenvolvimento do nematóide (He & Hannon, 2004; Yabuta, 2012; Souza, 2016). Sete anos após a primeira descoberta, identificou-se um segundo miRNA, chamado de let-7. Esse outro gene heterocrônico codificava um RNA com 21 nucleotídeos, temporariamente regulado, que controlava a transcrição e o desenvolvimento do estado larval L4 para fase adulta do verme (He & Hannon, 2004; Yabuta, 2012). Um ano mais tarde, homólogos desses RNAs foram encontrados em moluscos, ouriços do mar, moscas, camundongos e humanos. No entanto, eles não eram expressos nos diferentes estágios de desenvolvimento, sendo encontrados em tipos celulares específicos (He & Hannon, 2004; Yabuta, 2012).

Atualmente muitos miRNAs foram descritos, atuando em diversos processos biológicos, mas acredita-se que existam muitos outros que ainda não foram identificados (Sandoval, 2011). O genoma humano contém, aproximadamente, 2.588 miRNAs já identificados e caracterizados quanto à sua sequência e função (Manchester- University, 2013; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013; Bertoni et al., 2016). Os miRNAs são definidos como uma pequena família de RNAs endógenos, de fita simples, não codificadoras de proteínas, de aproximadamente 19 a 25 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica através de repressão da tradução ou da degradação dos seus RNAs mensageiros (mRNAs) complementares, atuando em diversos mecanismos biológicos como diferenciação, proliferação, migração e apoptose (Ricarte Filho & Kimura, 2006; Costa & Pacheco, 2012; Pan et al. 2013; Sergi et al., 2017).

A biogênese dos miRNAs é um processo complexo, tendo início com a formação do microRNA primários (pri-miRNA), que é um transcrito primário longo, em forma de grampo, geralmente transcritos pela RNA polimerase II, a partir do DNA genômico (Figura 1). Os pri-miRNAs são inicialmente processados no núcleo celular, sendo clivados por uma enzima chamada Drocha (ribonuclease III) e seu co-fator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro, chamada de pré-miRNA, com cerca de 70 a 100 nucleotídeos (Ricarte Filho & Kimura, 2006; Sandoval 2011;

Síbia, 2017). O pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela proteína exportina-5 (Exp 5), onde a enzima *Dicer* (RNase III), junto com o complexo TRBP (*transactivating response RNA-binding protein*), cliva a região do loop, dando origem a um RNA de fita dupla (dsRNA), de aproximadamente 22 nucleotídeos, que é incorporado a um complexo multimérico chamado RISC (*RNA-induced silence complex*), que incluem as proteínas argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do RNA maduro permanece no complexo RISC. Os complexos de miRNA-RISC se ligam ao mRNA, regulando assim sua expressão e controlando a expressão pós transcricional de genes-alvo. A cadeia complementar do RNA maduro normalmente é liberada e degradada (Ricarte Filho & Kimura, 2006; Sandoval 2011; Síbia, 2017).

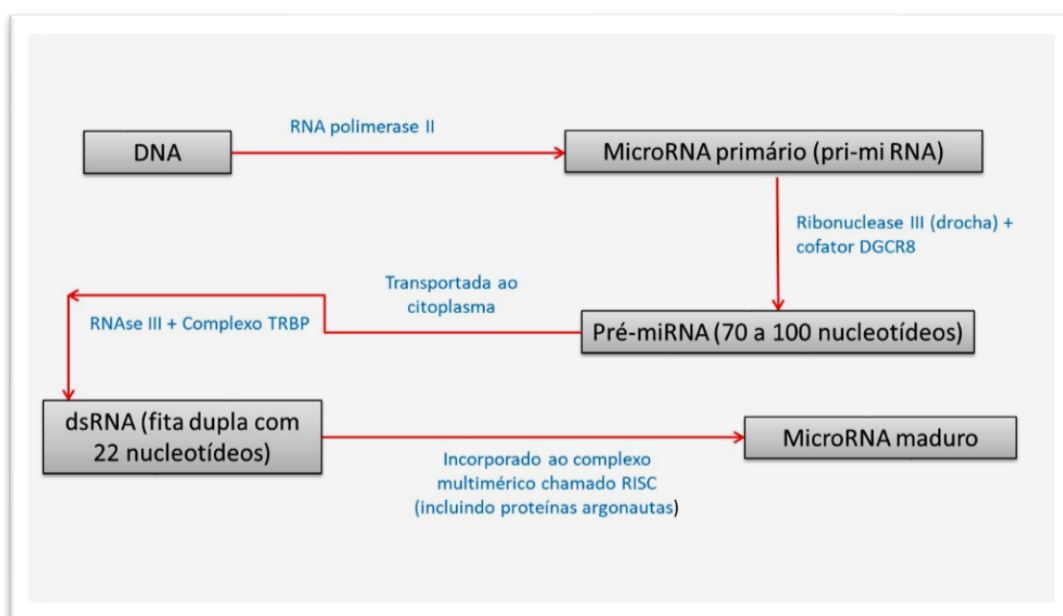


Figura 1 - Esquema demonstrativo da formação de miRNAs.

A fita do miRNA possui um monofostato 5', um grupo hidroxila 3' e dois nucleotídeos salientes na extremidade 3'. A regulação pós transcricional na região 3' não-traduzida depende do grau de complementaridade com o mRNA-alvo, podendo acontecer de 2 maneiras, sendo inibição traducional ou degradação do mRNA (Ricarte Filho & Kimura, 2006; Sandoval 2011;). Nos mamíferos, o processo que ocorre é o pareamento imperfeito com

o mRNA, acarretando na inibição traducional do alvo. Já nas plantas, a regulação ocorre principalmente através de ligações perfeitas, levando-o a degradação (Ricarte Filho & Kimura, 2006).

Por possuírem sequências pequenas e pela falta de necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode controlar até 200 RNAs, apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória de sinalização celular (Ricarte Filho & Kimura, 2006). Por isso, a expressão reduzida ou a superexpressão de um miRNA pode culminar com grandes disfunções celulares, consequentemente teciduais e sistêmicas (Costa & Pacheco 2012; Vargas & Stolf-Moreira, 2013).

Uma característica específica que torna os miRNAs alvos atrativos para estudos é sua estabilidade, sendo mais estáveis que os mRNA. Devido a esta estabilidade, sua expressão pode ser mais facilmente quantificada em amostras clínicas relevantes tais como plasma, soro e tecidos obtidos em cirurgias ou biópsias. Estes fatores indicam que os miRNAs podem constituir ferramentas promissoras para o diagnóstico, bem como moléculas potenciais para utilização no tratamento direcionado de diversas doenças como câncer, doenças crônico-degenerativas, doenças inflamatórias e malformações congênitas (Bitarte et al., 2011; Liu et al., 2015; Cheug Ng et al., 2015; Souza, 2016; Sun et al., 2016; Síbia, 2017). Não identificamos nenhum estudo publicado que tenha investigado o perfil de expressão de miRNAs em pacientes com DNI-B.

11. Referências

- Berger S, Ziebell P, OFFsler M, Hofmann-von Kap-herr S. Congenital malformations and perinatal morbidity associated with intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 1998;13:474-9.
- Berry CL. Intestinal neuronal dysplasia: does it exist or has it been invented? *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;422:183-4.
- Bertoni N, Pereira LM, Severino FE, Moura R, Yoshida WB, Reis PP. Integrative meta-analysis identifies microRNA-regulated networks in infantile hemangioma. *BMC Med Genet.* 2016;17:4. doi: 10.1186/s12881-015-0262-2.
- 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;29:1661-71.
- Borchard F, Meier-Ruge W, Wiebecke B, Briner J, Müntefering H, Födisch HF, et al. Disorders of the innervation of the large intestine--classification and diagnosis. Results of a consensus conference of the Society of Gastroenteropathology 1 December 1990 in Frankfurt/Main. *Pathologe.* 1991;12:171-4.
- Bosman C, Devito R, Fusilli S, Boldrini R. A new hypothesis on the pathogenesis of intestinal pseudo-obstruction by Intestinal Neuronal Dysplasia (IND). *Pathol Res Pract.* 2001;197:789-96.
- Briner J, Oswald HW, Hirsig J, Lehner M. Neuronal intestinal dysplasia--clinical and histochemical findings and its association with Hirschsprung's disease. *Z Kinderchir.* 1986;41:282-6.
- Bruder E, Meier-Ruge WA. Intestinal neuronal dysplasia type B: how do we understand it today?. *Pathologe.* 2007;28:137-42.
- Coerdts W, Michel JS, Rippin G, Kletzki S, Gerein V, Müntefering H, et al. Quantitative morphometric analysis of the submucous plexus in age-related control groups. *Virchows Arch.* 2004;444:239-46.
-

Cord-Udy CL, Smith VV, Ahmed S, Risdon RA, Milla PJ. An evaluation of the role of suction rectal biopsy in the diagnosis of intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997;24:1-6.

Corduk N, Koltuksuz U, Bir F, Karabul M, Herek O, Sarioglu-Buke A. Association of rare intestinal malformations: colonic atresia and intestinal neuronal dysplasia. *Adv Ther.* 2007;24:1254-9.

Costa EBO, Pacheco C. Micro-RNAs: perspectivas atuais da regulação da expressão gênica em eucariotos. *Biosaúde.* 2012;14:81-93.

Costa M, Fava M, Seri M, Cusano R, Sancandi M, Forabosco P, et al. Evaluation of the HOX11L1 gene as a candidate for congenital disorders of intestinal innervation. *J Med Genet.* 2000;37(7):E9.

Csury L, Peña A. Intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 1995;10:441-6.

De la Torre Mondragón L, Reyes-Múgica M. R.I.P. for IND B. Transanal endorectal pull-through for Hirschsprung's disease. *Pediatr Dev Pathol.* 2006;9:425-6.

de Lorijn F, Kremer LC, Reitsma JB, Benninga MA. Diagnostic tests in Hirschsprung disease: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42:496-505.

Di Lorenzo C, Youssef NN. Diagnosis and management of intestinal motility disorders. *Semin Pediatr Surg.* 2010;19:50-8.

Fadda B, Maier WA, Meier-Ruge W, Schärli A, Daum R. Neuronal intestinal dysplasia – Critical 10-years' analysis of clinical and biopsy diagnosis. *Z Kinderchir.* 1983;38:305-11.

Fernández RM, Sánchez-Mejías A, Ruiz-Ferrer MM, LópezAlonso M, Antiñolo G, Borrego S. Is the RET proto-oncogene involved in the pathogenesis of intestinal neuronal dysplasia type B? *Mol Med Rep.* 2009;2:265-70.

Friedmacher F, Puri P. Classification and diagnostic criteria of variants of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2013;29:855-72.

Gálvez Y, Skába R, Vajtrová R, Frantlová A, Herget J. Evidence of secondary neuronal intestinal dysplasia in a rat model of chronic intestinal obstruction. *J Invest Surg.* 2004;17:31-9.

Gath R, Goessling A, Keller KM, Koletzko S, Coerdts W, Müntefering H, et al. Analysis of the RET, GDNF, EDN3, and EDNRB genes in patients with intestinal neuronal dysplasia and Hirschsprung disease. *Gut.* 2001;48:671-5.

Geramizadeh B, Akbarzadeh E, Izadi B, Foroutan HR, Heidari T. Immunohistochemical study of enteric nervous system in hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. *Histol Histopathol.* 2013;28:345-51.

Gfroerer S, Rolle U. Pediatric intestinal motility disorders. *World J Gastroenterol.* 2015;21:9683-7.

Gillick J, Tazawa H, Puri P. Intestinal neuronal dysplasia: results of treatment in 33 patients. *J Pediatr Surg.* 2001;36:777-9.

Gil-Vernet JM, Broto J, Guillén G. [Hirschsprung-neurointestinal dysplasia: differential diagnosis and reliability of diagnostic procedures]. *Cir Pediatr.* 2006;19:91-4. Spanish.

Granero Cendón R, Millán López A, Moya Jiménez MJ, López Alonso M, De Agustín Asensio JC. [Intestinal neuronal dysplasia: association with digestive malformations]. *Cir Pediatr.* 2007;20:166-8. Spanish.

Guo X, Feng J, Wang G. Anorectal electromanometrical patterns in children with isolated neuronal intestinal dysplasia. *Eur J Pediatr Surg.* 2008;18:176-9.

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5:522-31.

Holland-Cunz S, Krammer HJ, Süß A, Tafazzoli K, Wedel T. Molecular genetics of colorectal motility disorders. *Eur J Pediatr Surg.* 2003;13:146-51.

Holschneider AM, Pfrommer W, Gerresheim B. Results in the treatment of anorectal malformations with special regard to the histology of the rectal pouch. *Eur J Pediatr Surg.* 1994;4:303-9.

Holschneider AM, Puri P, Homrighausen LH, Meier-Ruge W. Intestinal Neuronal Malformation (IND): clinical experience and treatment. In: Holschneider AM, Puri P, editors. Hirschsprung's disease and allied disorders. 3rd ed. Berlin Heidelberg New York: Springer; 2008. p. 229-51.

Jáquez-Quintana JO, González-González JA, Arana-Guajardo AC, Larralde-Contreras L, Flores-Gutiérrez JP, Maldonado-Garza HJ. Sigmoid volvulus as a presentation of neuronal intestinal dysplasia type B in an adolescent. *Rev Esp Enferm Dig.* 2013;105:178-9.

Junquera Bañares S, Oria Mundín E, Córdoba Iturriagagoitia A, Botella-Carretero JJ. [Chronic intestinal pseudo-obstruction due to intestinal neuronal dysplasia type B (IND B), concerning one case]. *An Sist Sanit Navar.* 2014;37:157-64. Spanish.

Kapur RP. Hirschsprung disease and other enteric dysganglionoses. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1999;36:225-73.

Kapur RP. Neuronal Dysplasia: A controversial pathological correlate of intestinal pseudo-obstruction. *Am J Med Genet.* 2003;112A:287-93.

Kato Y, Miyahara K, Hatano M, Hasegawa Y, Seki T, Frykman PK, et al. Immature enteric neurons in Ncx/Hox11L.1 deficient intestinal neuronal dysplasia model mice. *Pediatr Surg Int.* 2009;25:961-5.

Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, Bruder E, Farrugia G, Geboes K, et al. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut.* 2010;59:882-7.

Kobayashi H, Hirakawa H, Puri P. What are the diagnostic criteria for intestinal neuronal dysplasia? *Pediatr Surg Int.* 1995;10:459-64.

Kobayashi H, Mahomed A, Puri P. Intestinal neuronal dysplasia in twins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1996;22:398-401.

Kobayashi H, Miyano T, Yamataka A, Lane GJ, Fujimoto T, Puri P. Use of synaptophysin polyclonal antibody for the rapid intraoperative immunohistochemical evaluation of functional bowel disorders. *J Pediatr Surg.* 1997;32:38-40.

Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Inflammatory changes secondary to postoperative complications of Hirschsprung's disease as a cause of histopathologic changes typical of intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg.* 2004;39:152-6.

Koletzko S, Ballauff A, Hadziselimovic F, Enck P. Is histological diagnosis of neuronal intestinal dysplasia related to clinical and manometric findings in constipated children? Results of a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993;17:59-65.

Koletzko S, Jesch I, Faus-Kebetler T, Briner J, Meier-Ruge W, Müntefering H, et al. Rectal biopsy for diagnosis of intestinal neuronal dysplasia in children: a prospective multicentre study on interobserver variation and clinical outcome. *Gut.* 1999;44:853-61.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2013;42:D68-73.

Krammer HJ, Meier-Ruge W, Sigge W, Eggers R, Kühnel W. Histopathological features of neuronal intestinal dysplasia of the plexus submucosus in whole mounts revealed by immunohistochemistry for PGP 9.5. *Eur J Pediatr Surg.* 1994;4:35861.

Li XY, Li XG, Du MG, Chen ZD, Tao ZG, Liao XF. Clinical application of entire gastrointestinal barium meal combined with multi-temporal abdominal films in patients with intestinal neuronal dysplasia type B. *Saudi Med J.* 2013;34:46-53.

Liu W, Zhang Q, Li S, Li L, Ding Z, Qian Q, et al. The relationship between colonic macrophages and MicroRNA128 in the pathogenesis of slow transit constipation. *Dig Dis Sci.* 2015;60:2304-15.

López Sanclemente MC, Castellvi J, Ortiz de Zárate L, Barrios P. Intestinal neuronal dysplasia in a patient with chronic colonic pseudo-obstruction. *Cir Esp.* 2014;92:e59.

Lourenção PLTA, Terra AS, Ortolan EVP, Rodrigues MAM. Intestinal neuronal dysplasia type B: A still little Known diagnosis for organic causes of intestinal chronic constipation. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2016;7:397-405.

Lumb PD, Moore L. Are giant ganglia a reliable marker of intestinal neuronal dysplasia type B (IND B)? *Virchows Arch.* 1998;432:103-6.

Mahesha V, Saikia UN, Shubha AV, Rao KL. Intestinal neuronal dysplasia of the myenteric plexus--new entity in humans?. *Eur J Pediatr Surg.* 2008;18:59-60.

Manchester-University. miRBase [Internet]. Manchester: The University Manchester; 2013 [citado 24 Abr 2018]. Disponível em: <http://www.mirbase.org/>

Martucciello G, Caffarena PE, Lerone M, Mattioli G, Barabino A, Bisio G, Jasonni V. Neuronal intestinal dysplasia: clinical experience in Italian patients. *Eur J Pediatr Surg.* 1994;4:287-92.

Martucciello G, Pini Prato A, Puri P, Holschneider AM, Meier-Ruge W, Jasonni V, et al. Controversies concerning diagnostic guidelines for anomalies of the enteric nervous system: a report from the fourth International Symposium on Hirschsprung's disease and related neurocristopathies. *J Pediatr Surg.* 2005;40:1527-31.

Martucciello G, Torre M, Pini Prato A, Lerone M, Campus R, Leggio S, Jasonni V. Associated anomalies in intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg.* 2002;37:219-23.

Martucciello G, Torre M, Prato AP, Lerone M, Campus R, Leggio S, et al. Associated Anomalies in Intestinal Neuronal Dysplasia. *J Pediatr Surg.* 2002;37:219-23.

Matias ALR. Interpretação clínica da histopatologia nas neuropatias congénitas intestinais [dissertação]. Porto: Universidade do Porto; 2011.

Mattioli G, Castagnetti M, Martucciello G, Jasonni V. Results of a mechanical Duhamel pull-through for the treatment of Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg.* 2004;39:1349-55.

Meier-Ruge WA, Ammann K, Bruder E, Holschneider AM, Schärli AF, Schmittenebecher PP, et al. Updated results on intestinal neuronal dysplasia (IND B). *Eur J Pediatr Surg.* 2004;14:384-91.

Meier-Ruge WA, Brönnimann PB, Gambazzi F, Schmid PC, Schmidt CP, Stoss F. Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B). *Virchows Arch.* 1995;426:549-56.

Meier-Ruge WA, Bruder E, Kapur RP. Intestinal neuronal dysplasia type B: one giant ganglion is not good enough. *Pediatr Dev Pathol.* 2006;9:444-52.

Meier-Ruge WA, Bruder E. Different colon diseases with chronic constipation. In: Meier-Ruge WA, Bruder E, editors. *Histopathology of chronic constipation*. Basel: Karger; 2005. p. 3-32.

Miyazaki E, Ohshiro K, Puri P. NADPH-diaphorase histochemical staining of suction rectal biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease and allied disorders. *Pediatr Surg Int*. 1998;13:464-7.

Montedonico S, Acevedo S, Fadda B. Clinical aspects of intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg*. 2002;37:1772-4.

Montedonico S, Cáceres P, Muñoz N, Yáñez H, Ramírez R, Fadda B. Histochemical staining for intestinal dysganglionosis: over 30 years experience with more than 1,500 biopsies. *Pediatr Surg Int*. 2011;27:479-86.

Moore SW, Laing D, Melis J, Cywes S. Secondary effects of prolonged intestinal obstruction on the enteric nervous system in the rat. *J Pediatr Surg*. 1993;28:1196-9.

Moore SW, Laing L, Kaschula ROC, Cywes S. A histological grading system for the evaluation of co-existing NID with Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg*. 1994;4:293-7.

Moore SW. Advances in understanding functional variations in the Hirschsprung disease spectrum (variant Hirschsprung disease). *Pediatr Surg Int*. 2017;33:285-98.

Nezelof C, Guy-Grand D, Thomine E. Megacolon with hyperplasia of the myenteric plexus. An anatomico-clinical entity, apropos of 3 cases. *Presse Med*. 1970;78:1501-6.

Ng PC, Chan KY, Leung KT, Tam YH, Ma TP, Lam HS, et al. Comparative MiRNA Expressional Profiles and Molecular Networks in Human Small Bowel Tissues of Necrotizing Enterocolitis and Spontaneous Intestinal Perforation. *PLoS One*. 2015;10:e0135737.

Nogueira A, Campos M, Soares-Oliveira M, Estevão-Costa J, Silva P, Carneiro F, et al. Histochemical and immunohistochemical study of the intrinsic innervation in colonic dysganglionosis. *Pediatr Surg Int*. 2001;17:144-51.

- O'Donnell AM, Puri P. A role for Pten in paediatric intestinal dysmotility disorders. *Pediatr Surg Int.* 2011;27:491-3.
- Pan X, Wang R, Wang ZX. The Potential Role of miR-451 in Cancer Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Mol Cancer Ther.* 2013;12:1153-62.
- Peng SS, Lee WT, Hsui WM. An unusual cause of abdominal distension in a 4-year-old boy. Neuronal intestinal dysplasia. *Gastroenterology.* 2011;141:e3-e4.
- Pickard LR, Santoro S, Wyllie RG, Haller JA. Histochemical studies of experimental fetal intestinal obstruction. *J Pediatr Surg.* 1981;16:256-60.
- Pini-Prato A, Avanzini S, Gentilino V, Martucciello G, Mattioli G, Coccia C, et al. Rectal suction biopsy in the workup of childhood chronic constipation: indications and diagnostic value. *Pediatr Surg Int.* 2007;23:117-22.
- Puig I, Champeval D, Barbara PS, Jaubert F, Lyonnet S, Larue L. Deletion of Pten in the mouse enteric nervous system induces ganglioneuromatosis and mimics intestinal pseudoobstruction. *J Clin Invest.* 2009;119:3586-96.
- Puri P. Intestinal dysganglionosis and other disorders of intestinal motility. In: Coran AG, Adzick NS, Caldamone AA, Krummel TM, Laberge J, Shamberger RC, editors. *Pediatric surgery.* Philadelphia: Elsevier Inc; 2012. p. 1279-87.
- Puri P. Intestinal neuronal dysplasia. *Semin Pediatr Surg.* 1997;12:259-64.
- Puri P. Variants Hirschsprung Disease. *J Pediatr Surg.* 1997;32(2):149-57.
- Ricarte Filho JCM, Kimura ET. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50:1102-7.
- Rintala R, Rapola J, Louhimo I. Neuronal intestinal dysplasia. *Prog Pediatr Surg.* 1989;24:186-92.
- Rolle U, Piaseczna-Piotrowska A, Puri P. Interstitial cells of Cajal in the normal gut and in intestinal motility disorders of childhood. *Pediatr Surg Int.* 2007;23:1139-52.
-

Sacher P, Briner J, Hanimann B. Is neuronal intestinal dysplasia (NID) a primary disease or a secondary phenomenon? *Eur J Pediatr Surg.* 1993;3:228-30.

Sacher P, Briner J, Stauffer UG. Unusual cases of neuronal intestinal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 1991;6:225-6.

Sánchez-Mejías A, Fernández RM, Antiñolo G, Borrego S. A new experimental approach is required in the molecular analysis of intestinal neuronal dysplasia type B patients. *Exp Ther Med.* 2010;1:999-1003.

Sandoval FTB. Análise da expressão de microRNAs e alvos candidatos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço [dissertação]. São Paulo: Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo; 2011.

Schäppi MG, Staiano A, Milla PJ, Smith VV, Dias JA, Heuschkel R, et al. A practical guide for the diagnosis of primary enteric nervous system disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;57:677-86.

Schärli AF. Intestinal neuronal dysplasia. *Cir Pediatr.* 1992;5:64-65.

Schimpl G, Uray E, Ratschek M, Höllwarth ME. Constipation and intestinal neuronal dysplasia type B: a clinical follow-up study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:308-11.

Schmittenebecher PP, Glück M, Wiebecke B, Meier-Ruge W. Clinical long-term follow-up results in intestinal neuronal dysplasia (IND). *Eur J Pediatr Surg.* 2000;10:17-22.

Schmittenebecher PP, Sacher P, Cholewa D, Haberlik A, Menardi G, Moczulski J, et al. Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia--a frequent association with implications for the postoperative course. *Pediatr Surg Int.* 1999;15:553-8.

Schofield DE, Yunis EJ. Intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1991;12:182-9.

Seo JK. Intestinal neuronal dysplasia. *Korean J Gastroenterol.* 2007;50:145-56.

Sergi CM, Caluseriu O, McColl H, Elsenstat DD. Hirschsprung's disease: clinical dysmorphology, genes, micro-RNAs, and future perspectives. *Pediatr Res.* 2017;81:177-91.

Síbia CF. Perfil de expressão de microRNAs em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2017.

Skába R, Frantlová M, Horák J. Intestinal neuronal dysplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18:699-701.

Souza CP. Perfil de expressão de microRNAs e seus alvos moleculares em carcinoma pulmonar [tese]. Botucatu: Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2016.

Sun Y, Peng R, Peng H, Liu H, Wen L, Wu T, et al. miR-451 suppresses the NF-kappaB-mediated proinflammatory molecules expression through inhibiting LMP7 in diabetic nephropathy. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;433:75-86.

Swaminathan M, Oron AP, Chatterjee S, Piper H, Cope-Yokoyama S, Chakravarti A, et al. Intestinal Neuronal Dysplasia-Like Submucosal Ganglion Cell Hyperplasia at the Proximal Margins of Hirschsprung Disease Resections. *Pediatr Dev Pathol.* 2015;18:466-76.

Tabbers MM, Di Lorenzo C, Berger MY, Faure C, Langendam MW, Nurko S, et al. Evaluation and treatment of functional constipation in infants and children: evidence-based recommendations from ESPGHAN and NASPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 58:258-74.

Taguchi T, Kobayashi H, Kanamori Y, Segawa O, Yamataka A, Sugiyama M, et al. Isolated intestinal neuronal dysplasia Type B (IND-B) in Japan: results from a nationwide survey. *Pediatr Surg Int.* 2014;30:815-22.

Terra SA, Lourenção PLTA, Silvia MG, Miot HA, Rodrigues MAM. A critical appraisal of the morphological criteria for diagnosing intestinal neuronal dysplasia type B. *Mod Pathol.* 2017; 30:978-85.

Tou JF, Li MJ, Guan T, Li JC, Zhu XK, Feng ZG. Mutation of RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. *World J Gastroenterol.* 2006;12:1136-9.

Ure BM, Holschneider AM, Meier-Ruge W. Neuronal intestinal malformations: a retro- and prospective study on 203 patients. *Eur J Pediatr Surg.* 1994;4:279-86.

Van der Welf CS, Wabbersen TD, Hsiao N, Paredes J, Etchevers HC, Kroisie PM, et al. CLMP Is Required for Intestinal Development, and Loss-of-function Mutations Cause Congenital Short-Bowel Syndrome. *Gastroenterology.* 2012;142:453-62.

Vargas MM, Stolf-Moreira R. Aplicação de microRNAs na prática clínica. *Rev Bras Clin Med.* 2013;11:62-6.

Vijayaraghavan R, Chandrashekar R, Melkote Jyotiprakash A, Kumar R, Rashmi MV, et al. Intestinal neuronal dysplasia (type B) causing fatal small bowel ischaemia in an adult: a case report. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18:773-6.

Voderholzer WA, Wiebecke B, Gerum M, Müller-Lissner SA. Dysplasia of the submucous nerve plexus in slow-transit constipation of adults. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000;12:755-9.

Vougas V, Vardas K, Christou C, Papadimitriou G, Florou E, Magkou C, et al. Intestinal neuronal dysplasia type B in adults: a controversial entity. *Case Rep Gastroenterol.* 2014;8:7-12.

Westfal ML, Goldstein AM. Pediatric enteric neuropathies: diagnosis and current management. *Curr Opin Pediatr.* 2017;29:347-53.

Wu XJ, Zhang HY, Li N, Yan MS, Wei J, Yu DH, et al. A new diagnostic scoring system to differentiate Hirschsprung's disease from Hirschsprung's disease-allied disorders in patients with suspected intestinal dysganglionosis. *Int J Colorectal Dis.* 2013;28:689-96.

Yatuba PBD. O Papel dos microRNAs de Células T na Susceptibilidade/Resistência a Artrite Reumatóide Experimental [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2012.

Zorenkov D, Otto S, Böttner M, Hedderich J, Vollrath O, Ritz JP, et al. Morphological alterations of the enteric nervous system in young male patients with rectal prolapse. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26:1483-91.

Capítulo II

Article

**“MicroRNA molecular profile in patients with Intestinal Neuronal
Dysplasia type B”**

Abstract

Introduction: Intestinal Neuronal Dysplasia type B (IND-B) is a pathological entity characterized by abnormalities in the submucous nerve plexuses of the enteric nervous system, commonly associated with intestinal constipation in childhood. microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs with a potent role in gene expression regulation, and have been demonstrated as potential diagnostic biomarkers in several diseases. **Objective:** To determine the global expression profile of miRNAs in plasma and rectal biopsy tissue samples from patients with IND-B. **Methods:** Fifty patients, aged 0 to 15 years, who had been diagnosed with IND-B, from 1998 to 2010, were included in the study. Peripheral blood samples were collected from all 50 patients and an additional 10 healthy children, without intestinal symptoms (control group). Of the 50 patients from whom blood was collected, 29 also had sufficient rectal tissue for RNA extraction. Rectal biopsies were processed by microdissection and pooled according the different layers of the intestinal wall. miRNA extraction was performed using the miRNeasy Serum/Plasma Kit and the Recover All Total Nucleic Acid Isolation kit for biopsy tissues. Global miRNA expression analysis was performed using the TaqMan Array Human MicroRNA Card A platform. Correlation analysis between miRNA expression in plasma and biopsy samples as well as among tissues derived from the distinct intestinal layers was performed. **Results:** miRNA let-7a was over-expressed (~7 fold higher) in plasma from patients with IND-B compared to controls. miRNA expression analysis in biopsy samples used the mucosal layer as reference control, since ganglion cells of the nerve plexus, which are mostly affected in IND-B patients, are not located in this layer. miRNAs that showed increased (miR-146a, miR-146b) or decreased (miR-451, miR-99a, miR-130a, miR-374-5p, miR-100, miR-365, miR-145, miR 133b) expression, simultaneously in the submucosa and in the association between the submucosal and muscular layers, may have activity related to the neurons of the enteric nervous system. miR-451 was the only miRNA significantly deregulated in patient plasma and biopsy tissues. miR-451 plays a regulatory role on cell proliferation and apoptosis pathways and may be linked to the regulation of GNA11 protein synthesis, which in turn acts on the modulation of transmembrane systems, including intestinal muscle contraction. **Conclusion:** Our results demonstrate the presence of miRNA alterations in the submucosa and muscular layers of the rectum, as well as in plasma from patients with IND-B.

Resumo

Introdução: A Displasia Neuronal Intestinal tipo B (DNI-B) é uma entidade patológica caracterizada por anormalidades nos plexos nervosos submucosos do sistema nervoso entérico, comumente associada à constipação intestinal na infância. Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes com um papel importante na regulação da expressão gênica, e têm sido considerados potenciais biomarcadores diagnósticos em diversas doenças. **Objetivo:** Determinar o perfil de expressão global de miRNAs em amostras de plasma e tecido de biópsia retal de pacientes com DNI-B. **Métodos:** Cinquenta pacientes, com idade entre 0 e 15 anos, diagnosticados com DNI-B entre 1998 a 2010, foram incluídos no estudo. Amostras de sangue periférico foram coletadas de todos os 50 pacientes e 10 crianças saudáveis, sem sintomas intestinais (grupo controle). Dos 50 pacientes dos quais o sangue foi coletado, 29 também apresentavam fragmentos embolcados de tecido retal suficiente para extração de RNA. Estes materiais foram processados por microdissecção e agrupados de acordo com as diferentes camadas da parede intestinal. A extração de miRNA foi realizada utilizando o kit miRNeasy Serum / Plasma e o kit de recuperação de todos os Nucleic Acid Isolation para tecidos de biópsia. A análise global da expressão de miRNA foi realizada utilizando a plataforma TaqMan Array Human MicroRNA Card A. Análise de correlação entre a expressão de miRNA em amostras de plasma e biópsia, bem como entre os tecidos derivados das camadas intestinais distintas foi realizada. **Resultados:** o miRNA let-7a foi superexpresso (~ 7 vezes mais) no plasma de pacientes com DNI-B em comparação com os controles. A análise da expressão do miRNA em amostras de biópsia utilizou a camada mucosa como controle, uma vez que as células ganglionares do plexo nervoso, que estão alteradas em pacientes com DNI-B, não estão localizadas nessa camada. Os miRNAs que apresentaram expressão aumentada (miR-146a, miR-146b) ou diminuída (miR-451, miR-99a, miR-130a, miR-374-5p, miR-100, miR-365, miR-145, miR133b), simultaneamente na submucosa e na associação entre as camadas submucosa e muscular, pode ter atividade relacionada aos neurônios do sistema nervoso entérico. O miR-451 foi o único miRNA significativamente desregulado em tecidos de plasma e nos fragmentos de reto dos pacientes. O miR-451 desempenha um papel regulador nas vias de proliferação celular e apoptose e pode estar ligado à regulação da síntese proteica de GNA11, que por sua vez atua na modulação do sistema transmembrana, incluindo contração muscular intestinal. **Conclusão:** Nossos resultados demonstram a presença de alterações de miRNA na submucosa e na camada muscular do reto, bem como no plasma de pacientes com DNI-B.

1. Introduction

Intestinal neuronal dysplasia type B (IND-B) is a pathological entity of the group of gastrointestinal neuromuscular diseases characterized by complex alterations in the intestinal submucosal nerve plexuses [1]. Patients typically present with severe intestinal constipation, sometimes complicated by episodes of intestinal obstruction [2,3]. The diagnosis of IND-B fundamentally depends on the histopathological analysis of rectal biopsies [4, 5]. Hyperplasia of the submucosal nerve plexuses is the main morphological finding and can be characterized in different manners according to the adopted criterion [6-10]. More than 40 years after its original description [11], despite intensive scientific investigation, the pathology of IND-B remains incompletely elucidated with respect to the definition, etiopathogenesis, diagnostic criteria and therapeutic possibilities [2,12,13].

Disease pathogenesis is an important aspect within the array of uncertainties regarding IND-B. Several hypotheses have been discussed, although none are widely accepted [2,14]. Histopathological changes that characterize IND-B may come from a genetically primary change that directly influences the embryological development of tissues derived from the neural crest [2]. Recent studies have addressed the role of genetic and molecular commands in the migration and development of the neuroenteric cells [14,15]. Different experimental studies in rats and mice have demonstrated that certain mutations may determine megacolon and hyperplasia of the intestinal myenteric nerve plexus [16-19]. However, these findings were not reproducible in human research [20,21]. Another research line conceives IND-B as an adaptive response of the enteric nervous system, secondary to acquired phenomena caused by congenital obstructions or inflammation [3,22,23]. There is also some evidence that the histopathological changes observed in IND-B can be part of the normal development of the enteric nervous system [6,9,24-26].

The discovery of regulatory small non-coding RNAs, in 1993 [27], has opened extensive avenues of research in many disease conditions. microRNAs (miRNAs) are small, noncoding RNA molecules of approximately 19-25 nucleotides length that regulate cell differentiation, proliferation, migration, apoptosis, among other important cellular mechanisms. The growing knowledge about the role of miRNAs as gene expression regulators and their influence in disease have led to the establishment of miRNAs as potential biomarkers, clinically applicable for diagnosis, prognosis and potential therapeutic targets [27-31]. Therefore, we aimed to determine global miRNA expression profile in plasma and biopsy tissues from patients diagnosed with IND-B. Our results are novel since we show deregulated expression of a subset of miRNAs that are potential regulators of genes with roles in disease-associated pathways.

2. Methods

Patients, control volunteers and study design

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu Medical School, UNESP, São Paulo, Brazil (protocol number 11520712.6.0000.541- Attachment). Patients and/or their guardians were previously informed of the purpose of the research, and signed their respective informed consent.

This is a single-center, translational, case-control study, that enrolled 63 patients (<15 years) diagnosed with IND-B at the University Hospital of Botucatu Medical School, UNESP, between 1998 and 2012. The diagnosis of IND-B has been previously established based on histopathological analysis of rectal biopsies or surgical specimens according to the morphological criteria proposed by the Frankfurt Consensus, 1990, with no additional associated intestinal dysganglionosis [32]. Thirteen patients declined to participate and were therefore excluded from the study. Ten volunteers (<15 years) considered healthy and without gastrointestinal symptoms were invited to participate (as the reference control group) and provided a peripheral blood sample.

Global microRNA expression profiles were determined in plasma and rectal biopsy tissues. Analysis of plasma samples miRNA profiles were determined in 50 IND-B patients compared to 10 healthy controls. Of these 50 patients, 29 had archived formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) rectal tissue samples of adequate quantity and quality for microdissection and RNA extraction. Rectal tissue samples were pooled according to their location in the distinct layers of the intestinal wall, and miRNA expression was determined as compared to the mucosal layer as the reference control. The mucosal layer was determined as the most appropriate reference control, since ganglion cells of the nerve plexus, which are mostly affected in IND-B patients, are not located in this layer.

Plasma samples

Peripheral blood samples (4 mL) were collected in Vacutainer® BD tube (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with EDTA and immediately processed to obtain cell-free plasma, by a two-step centrifugation at 1,200 rpm for 15 minutes at 4°C. The plasma fraction (upper phase) was then transferred to a sterile, RNase-free 1.5 mL eppendorf tube and stored at -80 ° C until use.

FFPE rectal biopsy samples

We used 5 sections of 10µm each for microdissection and RNA extraction, as follows: for tissue microdissection, slides were incubated in 100% Xylol (Merk KGaA, Darmstadt, Germany) for 10 minutes and then dehydrated and rehydrated in a series of ethanol: 100% for 5 minutes, 95% for 5 minutes, 80% for 5 minutes, 70% for 5 minutes. Tissues were subsequently stained in a solution of hematoxylin (5:1 dilution) for 15 s. For identification of microdissection areas, slides were stored in MilliQ ddH₂O until the time of scraping (maximum 5 min.) with sterile hypodermic needle 1.60x40mm (Becton Dickinson, Curitiba, PR, Brazil). The areas corresponding to each of the layers of the intestinal wall were dissected using the Leica EZ4 stereomicroscope (Leica Microsystems, China) for visualization and scraping of the tissues. Microdissected samples were pooled according to the intestinal wall layers: mucosa, submucosa and muscular layer. Each of the pooled samples was placed in a sterile, RNase-free 1.5 mL eppendorf tube containing digestion buffer solution from the Recover Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA), for the beginning of total RNA extraction.

RNA Extraction from plasma samples

Total RNA was isolated from plasma using miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. RNA samples were quantified using *NanoDrop 8000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

RNA Extraction from FFPE samples

RNA from FFPE samples was isolated using the *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation* (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following a previously reported protocol with modifications to improve RNA yield [33]. RNA samples were quantified using *NanoDrop 8000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Quantification of miRNA expression

MicroRNA expression was quantified using the TaqMan® Human MicroRNA Array Card (TLDA) assay (card A v3.0) (Life Technologies, Foster City, CA, USA), as previously described [34]. We used the QuantStudio 12K system (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Global data normalization was performed in Expression Suite software (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and miRNA expression profiles were determined using RQ Manager v.1.2 software (Life Technologies, Foster City, CA, USA).

Data Analysis

Expression data were extracted from the QuantStudio™ 12K Flex equipment using ExpressionSuite Software v1.0.3 for Microsoft® Windows®, a data analysis tool that uses the comparative CT ($\Delta\Delta\text{CT}$) method [35,36]. This platform allows relative gene expression quantification through a large number of genes as well as Fold Change (FC) calculation. Correlation analysis between miRNA expression in plasma and rectal tissue samples as well

as among tissues derived from the distinct intestinal layers was performed and visualized using InteractiveVenn [37] and evaluated by Spearman's test. Categorical variables were expressed by the frequency and respective percentages. Continuous numerical variables were expressed as mean \pm standard deviation for parametric data and as median (minimum/maximum) for nonparametric data. The significance level was 5%. Analyses were performed using SPSS software (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. NY, USA).

3. Results

Fifty IND-B patients participated in the study (Figure 1). Thirty-five patients (70%) were male. Median age of patients at the time of diagnosis of IND-B was 3 years (0-15 years). The average time between diagnosis and blood samples collection was 9.34 ± 3.34 years. Mean age of IND-B patients at the time of blood sample collection was 12.32 ± 5.07 years. Median age of volunteers at time of blood sample collection was 2.5 years (0-14 years). Seven volunteers were female and 3 were male.

Identification of plasma microRNA expression profile

We identified 32 miRNAs statistically significantly deregulated (fold change - FC ≥ 2 and $p < 0.05$) in patients with IND-B compared to control group, with 14 miRNAs having increased expression and 18 miRNAs having decreased expression (Figure 2, Table 1).

Identification of microRNA expression profile in FFPE rectal tissue samples

We aimed to identify miRNA expression in the different layers of the intestinal wall (mucosa, submucosa and muscular layer). The mucosal layer was set as the reference control, since the ganglion cells of the enteric nervous system are not located in this layer, but in the submucosa (Meissner Plexus) and in the muscular layer (Auerbach's Plexus).

miRNAs deregulated in the submucosa layer

Eleven miRNAs were statistically significantly deregulated (3 over-expressed and 8 under-expressed) in submucosa compared to the mucosal layer (FC ≥ 2 and $p < 0.05$) (Figure 3, Table 2).

MicroRNAs deregulated in submucosa + muscular layer

Twenty-nine miRNAs were statistically significantly deregulated (3 over-expressed and 26 under-expressed) ($FC \geq 2$ and $p < 0.05$) in the submucosa + muscular layer compared to the mucosal layer reference control (Figure 4, Table 3).

Correlation analysis

The miR-451 was the only miRNA commonly deregulated (under-expressed) in plasma and biopsy samples (Figure 5). There was a statistically significant correlation between the expression quantification of the 10 miRNAs that were simultaneously deregulated in submucosa layer and in submucosa + muscular layer ($r_s = 0.9394$; $p < 0.001$). There was no statistically significant correlation between the expression quantification of the 3 miRNAs that were simultaneously deregulated in submucosa layer and in plasma ($r_s = 0.50$; $p = 0.667$).

4. Discussion

IND-B is a rare disease that remains surrounded by several controversies ranging from its definition as a real disease to the different criteria for its diagnosis and treatment options [2,38,39]. However, in medical practice, we continue to encounter children with severe constipation or intestinal obstruction who undergo to rectal biopsies that show hyperplastic submucosal ganglia consistent with the diagnosis of IND-B [12]. Thus, it is necessary to conduct studies focused on the investigation of the origin and pathophysiology of this disease.

MicroRNAs are small, stable, tissue-expressing and circulating molecules that can be detected by using small amounts of RNA, such as those obtained from biopsy specimens and body fluids, such as plasma or serum. These characteristics make the miRNAs attractive for the molecular characterization of human pathologies, such as IND-B [27-31, 34].

In our study, the analysis of FFPE rectal tissue samples was performed by stratification by groups, according to the layers of the intestinal wall. The mucosal layer was considered as the reference standard (control group), since the ganglion cells of the enteric nervous system, central figure in the pathophysiology of IND-B, are not located in this layer, but in the submucosa (Meissner's Plexus) and in the muscular layer (Auerbach's Plexus). Thus, microRNAs which exhibited increased expression (miR-146a, miR-146b) or decreased expression (miR-451, miR-99a, miR-130a, miR-374-5p, miR-100, miR-365, miR-145, miR-133b) simultaneously in the submucosa and in the association between the submucosa and muscular layer, may have activity related to neurons of the enteric nervous system and be potentially involved in the pathophysiology of IND-B.

Plasma samples from IND-B patients were compared to a group of healthy children (control group) without gastrointestinal symptoms. In this analysis, several miRNAs showed increased or decreased expression in IND-B patients. miRNA let-7a showed approximately 7-

fold higher expression in patients with IND-B. MicroRNA let-7 belongs to a family of miRNAs present in multiple genomic locations, and consists of 9 members [40,41]. Genes such as cyclin A2, *CDC34*, Aurora A and B kinases (*STK6* and *STK12*), *E2F5*, and *CDK8* were characterized as responsive to changes in miRNA let-7a levels. These genes are related to the regulation of the cell cycle, involving mechanisms of apoptosis and cellular proliferation [36], which are biological processes that could explain the hyperplasia of nerve plexuses of the enteric nervous system that occurs in IND-B. Furthermore, miR let-7 suppresses the differentiation of human embryonic stem cell derived neural progenitor cells and influences self-renewal of neural stem cells [41,42]. Over-expression of let-7a influences neural stem cells proliferation and differentiation [41-43]. However, the mechanisms of this interaction have not been elucidated as yet [41].

MicroRNA expression profile analysis in plasma and biopsies showed that miR-451 was consistently under-expressed in all layers of the intestinal wall as well as in patient plasma compared to the respective controls, suggesting a possible role for this miRNA in the pathophysiology of IND-B. The miR-451 has been extensively studied in recent years and is related to cell proliferation and apoptosis, in inflammatory processes such as rheumatoid arthritis and in colorectal cancer [44-47]. Cheug Ng et al (2015) observed increased expression of miR-451 in small bowel samples from patients with necrotizing enterocolitis (22-fold) and spontaneous intestinal perforation (8-fold) compared to small bowel samples of children without acute inflammatory processes, but who had been subjected to surgical treatment due to congenital malformations, such as intestinal atresia and meconium ileus [48]. One must observe that increased miR-451 expression was detected as compared to patients with congenital intestinal malformations, such as IND-B. Therefore, its expression may be actually reduced in IND-B patients, in agreement with our findings. There is also evidence that miR-451 may regulate GNA11 protein synthesis, which plays an important role in the

modulation of transmembrane systems, including intestinal muscle contraction [48]. In addition, Alural et al (2014) observed that downregulation of miR-451 can lead to a neuroprotective and an anti-apoptotic effect in an *in vitro* model of SH-SY5Y neuron-like cells [49].

The definition of IND-B as a primary disease, genetically determined, has been investigated since the original description of monozygotic twins affected by the disease and reports of families in which several members had the histopathological diagnoses of IND-B over multiple generations [20, 50]. Because IND-B and Hirschsprung's disease (HD) are derived from the enteric nervous system, common molecular pathways are likely to be involved in the geneses of the two pathological conditions [51]. However, mutations in genes considered to be most relevant to HD, such as RET, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and other selected genes have not yet been identified in patients with IND-B [21,52-55]. Until now, only some combinations of single nucleotide polymorphisms in the RET proto-oncogene have been identified in patients with IND-B [56].

Experimental studies using rodents have demonstrated that homozygous animals deficient in the NCX/Hox11L.1 gene present with megacolon and hyperplasia of the myenteric nerve plexus, similar to those described in IND-B [16-19]. However, no mutations or molecular defects were evidenced in the Hox11L.1 coding region in humans with IND-B [20,21]. Holland-Cunz et al (2003) reported that mice presenting with a heterozygous deficiency in endothelin B receptor (EDNRB) exhibit histopathological changes similar to IND-B, although they do not exhibit clinical signs of bowel dysmotility [57]. These findings were also not reproducible in human research [53].

One strength of this study is the microdissection performed in archived FFPE rectal tissues, exploring the different layers of the intestinal wall. Thus, it was possible to analyze the expression of miRNAs at the site where the histopathological changes of the IND-B are

found. In addition, miRNA expression analysis was performed using a platform with high sensitivity and specificity to detect changes [34]. These combined strategies led to mapping miRNAs that regulate genes that plays important functions, potentially related to the development of the disease. A limitation of the study that can be pointed out is that it was conducted in a single center, including 50 patients, of which 29 had archived FFPE rectal tissue samples of adequate quantity and quality for microdissection and RNA extraction. This limited sample may be justified based on the rarity of IND-B.

To the best of our knowledge, ours is the first study to determine global miRNA expression profiles in plasma and biopsy tissues from patients diagnosed with IND-B. We provided evidence that there are alterations in the expression of certain miRNAs in the rectal submucosa and muscular layer, which are the layers where normally the ganglion cells are located. Additionally, we showed miRNA expression changes in plasma of patients with IND-B, compared with healthy individuals. These findings reinforce the theory that molecular determinants may be drivers of IND-B pathogenesis, which may pave the way for future scientific investigations.

5. Funding

São Paulo Research Foundation (FAPESP-Brazil), nº 2015/03664-2

National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil-MCTI/CNPQ/Universal (nº 5510647116083991))

6. References

1. Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut* 2010;59:882–7.
2. Holschneider AM, Puri P, Homrighausen LH. Holschneider AM, Puri P, et al. *Intestinal Neuronal Malformation (IND): Clinical Experience and Treatment. Hirschsprung's Disease and Allied Disorders* 3rd ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York:2008;229–51.
3. Csury L, Peña A. Intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int* 1995;10:441–6.
4. Friedmacher F, Puri P. Classification and diagnostic criteria of variants of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2013;29:855–72.
5. Schäppi MG, Staiano A, Milla PJ, Smith VV, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, Mearin ML, Papadopoulou A, Ruemmele FM, Vandenplas Y, Koletzko S. A practical guide for the diagnosis of primary enteric nervous system disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 57: 677-686.
6. Meier-Ruge WA, Bruder E, Kapur RP. Intestinal neuronal dysplasia type B: one giant ganglion is not good enough. *Pediatr Dev Pathol* 2006; 9: 444-452.
7. Meier-Ruge WA, Brönnimann PB, Gambazzi F, et al. Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B). *Virchows Arch* 1995;426:549–56.
8. Kobayashi H, Hirakawa H, Puri P. What are the diagnostic criteria for intestinal neuronal dysplasia? *Pediatr Surg Int* 1995;10:459–64.
9. Meier-Ruge WA, Ammann K, Bruder E, et al. Updated results on intestinal neuronal dysplasia (IND B). *Eur J Pediatr Surg* 2004;14:384–91.
10. Terra SA, de Arruda Lourenção PL, G Silva M, et al. A critical appraisal of the morphological criteria for diagnosing intestinal neuronal dysplasia type B. *Mod Pathol* 2017; 30(7):978-985.
11. Meier-Ruge W. [Casuistic of colon disorder with symptoms of Hirschsprung's disease (author's transl)]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1971; 55: 506-510.
12. Toledo de Arruda Lourenção PL, Terra SA, Ortolan EV, et al. Intestinal neuronal dysplasia type B: a still little known diagnosis for organic causes of intestinal chronic constipation. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2016;7:397–405.
13. Martucciello G, Pini Prato A, Puri P, Holschneider AM, Meier-Ruge W, Jasonni V, Tovar JA, Grosfeld JL. Controversies concerning diagnostic guidelines for anomalies of the enteric nervous system: a report from the fourth International Symposium on Hirschsprung's disease and related neurocristopathies. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 1527-1531.
14. Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 2008; 45: 1-14.
15. Haricharan RN, Georgeson KE. Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg* 2008; 17: 266-275.

16. Hatano M, Aoki T, Dezawa M, Yusa S, Iitsuka Y, Koseki H, Taniguchi M, Tokuhisa T. A novel pathogenesis of megacolon in Ncx/Hox11L1 deficient mice. *J Clin Invest.* 1997;100(4):795-801.
 17. Shirasawa S, Yunker AM, Roth KA, Brown GA, Horning S, Korsmeyer SJ. Enx (Hox11L1)-deficient mice develop myenteric neuronal hyperplasia and megacolon. *Nat Med.* 1997; 3(6):646-50.
 18. Yamataka A, Hatano M, Kobayashi H, Wang K, Miyahara K, Sueyoshi N, Miyano T. Intestinal neuronal dysplasia-like pathology in Ncx/Hox11L1 gene-deficient mice. *J Pediatr Surg.* 2001; 36(8):1293-6.
 19. Yanai T, Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T, Hayakawa T, Satoh K, Kase Y, Hatano M. Acetylcholine-related bowel dysmotility in homozygous mutant NCX/HOX11L1-deficient (NCX^{-/-}) mice-evidence that acetylcholine is implicated in causing intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg.* 2004; 39(6):927-30.
 20. Costa M, Fava M, Seri M, Cusano R, Sancandi M, Forabosco P, Lerone M, Martucciello G, Romeo G, Ceccherini I. Evaluation of the HOX11L1 gene as a candidate for congenital disorders of intestinal innervation. *J Med Genet.* 2000; 37(7):E9.
 21. Fava M, Borghini S, Cinti R, Cusano R, Seri M, Lerone M, De Giorgio R, Stanghellini V, Martucciello G, Ravazzolo R, Ceccherini I. HOX11L1: a promoter study to evaluate possible expression defects in intestinal motility disorders. *Int J Mol Med.* 2002; 10(1):101-6.
 22. Koletzko S, Ballauff A, Hadziselimovic F, Enck P. Is histological diagnosis of neuronal intestinal dysplasia related to clinical and manometric findings in constipated children? Results of a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17: 59-65.
 23. Sacher P, Briner J, Hanimann B. Is neuronal intestinal dysplasia (NID) a primary disease or a secondary phenomenon? *Eur J Pediatr Surg* 1993; 3: 228-230.
 24. Cord-Udy CL, Smith VV, Ahmed S, Risdon RA, Milla PJ. An evaluation of the role of suction rectal biopsy in the diagnosis of intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 1-6; discussion 7-8.
 25. Koletzko S, Jesch I, Faus-Kebetaler T, Briner J, Meier-Ruge W, Müntefering H, Coerdts W, Wessel L, Keller KM, Nützenadel W, Schmittenebecher P, Holschneider A, Sacher P. Rectal biopsy for diagnosis of intestinal neuronal dysplasia in children: a prospective multicentre study on interobserver variation and clinical outcome. *Gut* 1999; 44: 853-861.
 26. Coerdts W, Michel JS, Rippin G, Kletzki S, Gerein V, Müntefering H, Arnemann J. Quantitative morphometric analysis of the submucous plexus in age-related control groups. *Virchows Arch* 2004; 444: 239-246.
 27. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54.
 28. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):855-62.
 29. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004 Jul;5(7):522-31.
 30. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res.* 2011 Dec 1;717(1-2):1-8.
-

31. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D68-73.
 32. Borchard F, Meier-Ruge W, Wiebecke B, Briner J, Müntefering H, Födisch HF, Holschneider AM, Schmidt A, Enck P, Stolte M. Disorders of the innervation of the large intestine--classification and diagnosis. Results of a consensus conference of the Society of Gastroenteropathology 1 December 1990 in Frankfurt/Main. *Pathologe.* 1991;12(3):171-4.
 33. Goswami RS, Atenafu EG, Xuan Y, Waldron L, Reis PP, Sun T, Datti A, Xu W, Kuruvilla J, Good DJ, Lai R, Church AJ, Lam WS, Baetz T, Lebrun DP, Sehn LH, Farinha P, Jurisica I, Bailey DJ, Gascoyne RD, Crump M, Kamel-Reid S: MicroRNA signature obtained from the comparison of aggressive with indolent non-hodgkin lymphomas: Potential prognostic value in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2013;31:2903-2911.
 34. Goswami RS, Waldron L, Machado J, Cervigne NK, Xu W, Reis PP, Bailey DJ, Jurisica I, Crump MR, Kamel-Reid S. Optimization and analysis of a quantitative real-time PCR-based technique to determine microRNA expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *BMC Biotechnol.* 2010 Jun 23;10:47.
 35. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25(4):402-408.
 36. Schmittgen and Livak. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3(6):1101-8.
 37. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R: InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 2015, 16:169.
 38. Granero Cendón R, Millan Lopez A, Moya Jimenez MJ, et al. Intestinal neuronal dysplasia: association with digestive malformations (Article in Spanish). *Cir Pediatr* 2007;20:166-8.
 39. de la Torre Mondragón L, Reyes-Múgica M. R.I.P. for IND B. *Pediatr and Develop Pathol* 2006; 9: 425-426.
 40. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 2007 Aug 15;67(16):7713-22.
 41. Song J, Oh Y, Kim JY, Cho KJ, Lee JE. Suppression of MicroRNA let-7a Expression by Agmatine Regulates Neural Stem Cell Differentiation. *Yonsei Med J.* 2016 Nov;57(6):1461-7.
 42. Cimadamore F, Amador-Arjona A, Chen C, Huang CT, Terskikh AV. SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110: E3017-26.
 43. Schwamborn JC, Berezikov E, Knoblich JA. The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* 2009;136:913-25.
 44. Sun Y, Peng R, Peng H, Liu H, Wen L, Wu T, Yi H, Li A, Zhang Z. miR-451 suppresses the NF-kappaB-mediated proinflammatory molecules expression through inhibiting LMP7 in diabetic nephropathy. *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Sep 15;433:75-86.
 45. MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. Murata K, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Ito H, Matsuda S. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Mar;66(3):549-59.
-

46. MiR-451 inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion in rheumatoid arthritis through mediating p38MAPK signaling pathway. Wang ZC, Lu H, Zhou Q, Yu SM, Mao YL, Zhang HJ, Zhang PC, Yan WJ. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Nov 1;8(11):14562-7.
 47. Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, Gonzalez-Huarriz M, Lopez I, Javier Sola J, Alonso MM, Fortes P, Garcia-Foncillas J. MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Stem Cells*. 2011 Nov;29(11):1661-71.
 48. Ng PC, Chan KY, Leung KT, Tam YH, Ma TP, Lam HS, Cheung HM, Lee KH, To KF, Li K. Comparative MiRNA Expressional Profiles and Molecular Networks in Human Small Bowel Tissues of Necrotizing Enterocolitis and Spontaneous Intestinal Perforation. *PLoS One*. 2015 Aug 14;10(8):e0135737.
 49. Alural B, Duran GA, Tufekci KU, Allmer J, Onkal Z, Tunali D, Genc K, Genc S. EPO Mediates Neurotrophic, Neuroprotective, Anti-Oxidant, and Anti-Apoptotic Effects via Downregulation of miR-451 and miR-885-5p in SH-SY5Y Neuron-Like Cells. *Front Immunol*. 2014 Sep 30;5:475.
 50. Kobayashi H, Mahomed A, Puri P. Intestinal neuronal dysplasia in twins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 22: 398-401.
 51. Sánchez-Mejías A, Fernández RM, Antiñolo G, Borrego S. A new experimental approach is required in the molecular analysis of intestinal neuronal dysplasia type B patients. *Exp Ther Med* 2010; 1: 999-1003.
 52. Barone V, Weber D, Luo Y, Brancolini V, Devoto M, Romeo G. Exclusion of linkage between RET and neuronal intestinal dysplasia type B. *Am J Med Genet* 1996; 62: 195-198.
 53. Gath R, Goessling A, Keller KM, Koletzko S, Coerdts W, Müntefering H, Wirth S, Hofstra RM, Mulligan L, Eng C, von Deimling A. Analysis of the RET, GDNF, EDN3, and EDNRB genes in patients with intestinal neuronal dysplasia and Hirschsprung disease. *Gut* 2001; 48: 671-675.
 54. Tou JF, Li MJ, Guan T, Li JC, Zhu XK, Feng ZG. Mutation of RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1136-1139.
 55. Borghini S, Duca MD, Pini Prato A, Lerone M, Martucciello G, Jasonni V, Ravazzolo R, Ceccherini I. Search for pathogenetic variants of the SPRY2 gene in intestinal innervation defects. *Intern Med J* 2009; 39: 335-337.
 56. Fernández RM, Sánchez-Mejías A, Ruiz-Ferrer MM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Is the RET proto-oncogene involved in the pathogenesis of intestinal neuronal dysplasia type B? *Mol Med Rep* 2009; 2: 265-270.
 57. Holland-Cunz S, Krammer HJ, Süß A, Tafazzoli K, Wedel T. Molecular genetics of colorectal motility disorders. *Eur J Pediatr Surg* 2003; 13: 146-151.
-

7. Figures and Tables

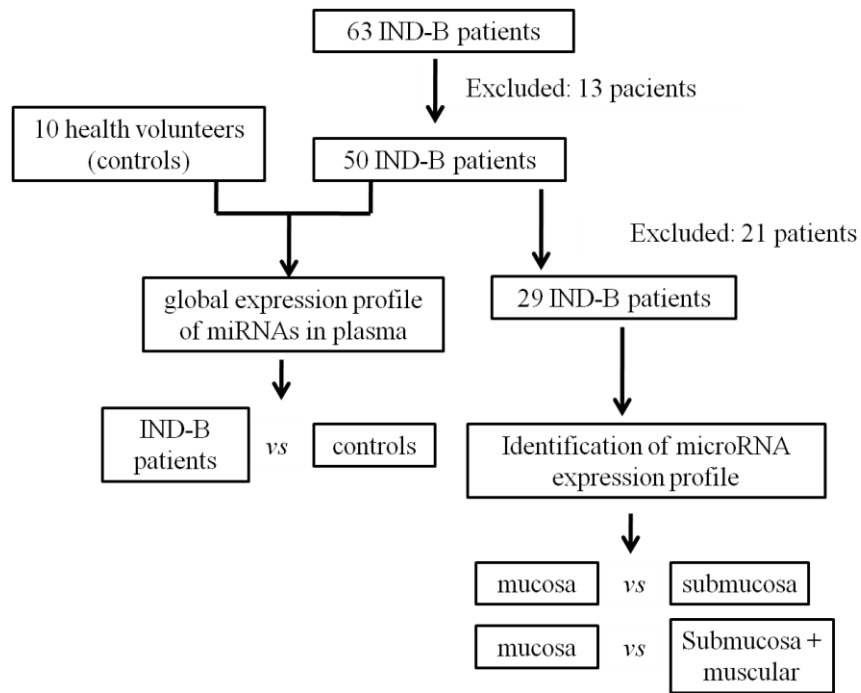


Figure 1: Flowchart of patients in the study.

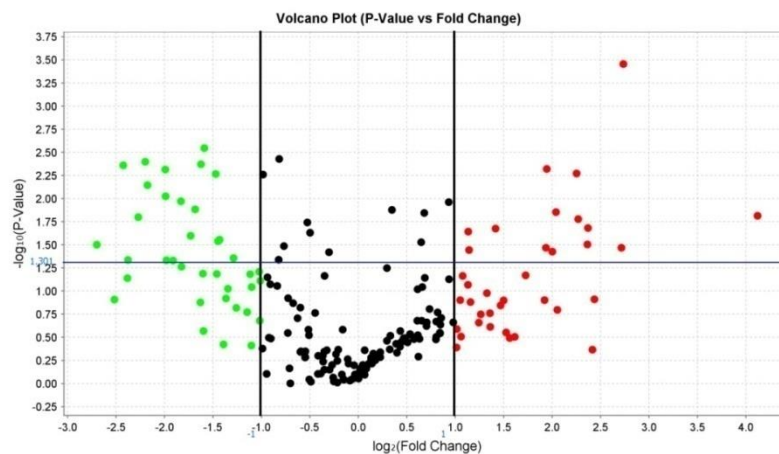


Figure 2: Volcano plot: microRNAs with significantly deregulated expression ($FC \geq 2$ e $p < 0.05$) in plasma of IND-B patients compared to control group.

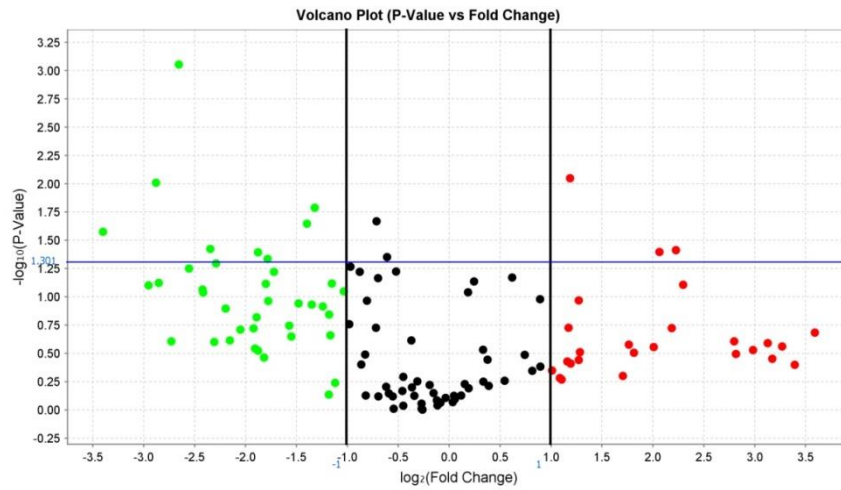


Figure 3: Volcano plot: microRNAs with significantly deregulated expression ($FC \geq 2$ e $p < 0.05$) in submucosa versus mucosa (control) layers.

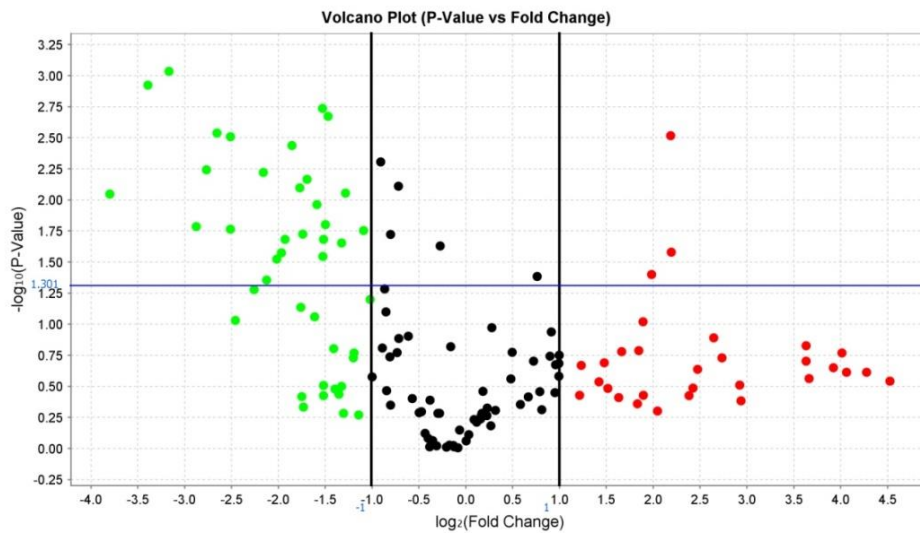


Figure 4: Volcano plot: microRNAs with significantly deregulated expression ($FC \geq 2$ e $p < 0.05$) in submucosa + muscular layer versus mucosa (control).

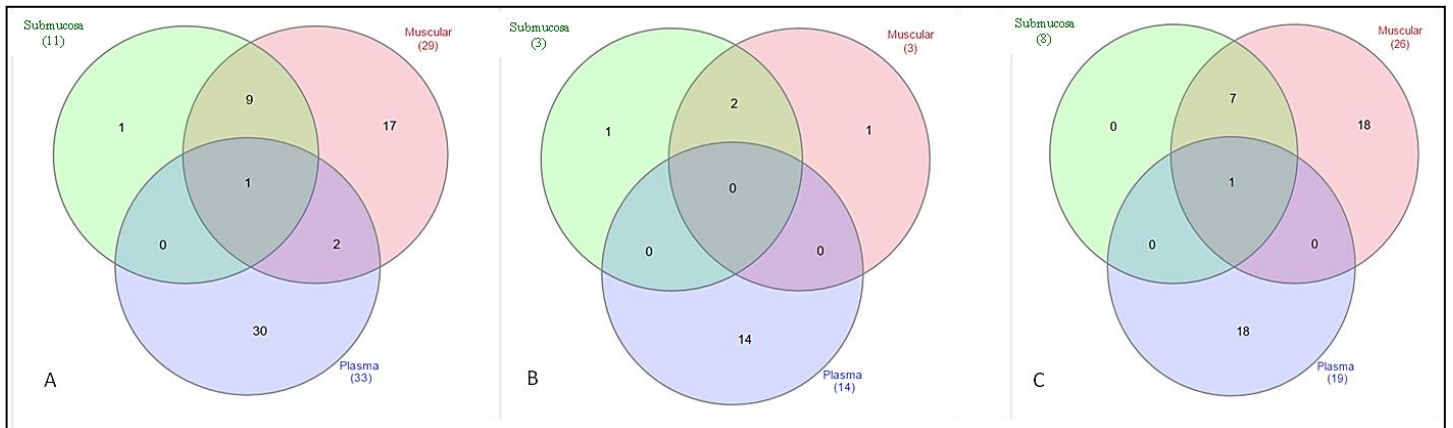


Figure 5: Venn diagram illustrating altered miRNAs in plasma and in FFPE rectal biopsy samples (A), miRNAs with increased expression in plasma and in FFPE rectal samples (B) e miRNAs with decreased expression in plasma and in FFPE rectal samples (C).

Table 1: microRNAs with altered expression in the plasma of IND-B patients compared to control group.

Increased expression			Decreased expression		
miRNA	FC	p	miRNA	FC	p
let-7a-5p	17.409	0.015	miR-195-5p	0.410	0.044
miR-342-5p	6.572	0.034	miR-106b-5p	0.371	0.028
miR-98-5p	6.672	0.000	miR-337-5p	0.367	0.029
miR-196b-5p	5.159	0.031	miR-429	0.266	0.047
let-7e-5p	5.177	0.021	miR-101-3p	0.254	0.047
miR-758-3p	4.827	0.017	miR-590-5p	0.302	0.025
miR-361-5p	4.769	0.005	miR-362-3p	0.311	0.013
miR-125a-5p	4.009	0.037	miR-19a-3p	0.281	0.011
miR-155-5p	3.831	0.034	miR-19b-3p	0.252	0.009
let-7d-5p	4.113	0.014	miR-636	0.361	0.005
miR-539-5p	3.885	0.005	miR-889-3p	0.325	0.004
miR-423-5p	2.672	0.021	miR-210-3p	0.332	0.003
miR-99b-5p	2.210	0.036	miR-193b-3p	0.252	0.005
miR-491-5p	2.195	0.023	miR-214-3p	0.193	0.046
			miR-500a-5p	0.207	0.016
			miR-885-5p	0.221	0.007
			miR-483-5p	0.218	0.004
			miR-451a	0.186	0.004
			miR-660-5p	0.154	0.032

FC: fold change

Table 2: microRNAs with altered expression in the submucosa vs. mucosa (control) layers.

Increased expression			Decreased expression		
miRNA	FC	p	miRNA	FC	p
miR-146b-5p	4.683	0.039	miR-451a	0.401	0.016
miR-146a-5p	4.184	0.040	miR-99a-5p	0.380	0.023
miR-127-3p	2.278	0.009	miR-130a-3p	0.291	0.046
			miR-374b-5p	0.272	0.041
			miR-100-5p	0.197	0.038
			miR-365a-3p	0.095	0.027
			miR-145-5p	0.136	0.010
			miR-133b	0.159	0.001

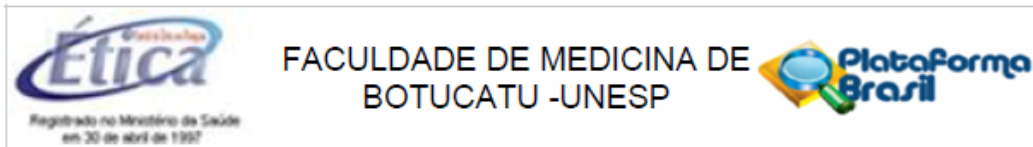
FC: fold change

Table 3: microRNAs with altered expression in the submucosa + muscular layer vs. mucosa (control).

miRNA	Increased expression		miRNA	Decreased expression	
	FC	p		FC	p
miR-134-5p	3.953	0.040	miR-20b-5p	0.470	0.018
miR-146a-5p	4.577	0.026	miR-10a-5p	0.399	0.022
miR-146b-5p	4.547	0.003	miR-744-5p	0.349	0.022
			miR-24-3p	0.347	0.029
			miR-99b-5p	0.247	0.030
			miR-139-5p	0.229	0.044
			miR-628-5p	0.256	0.027
			miR-100-5p	0.262	0.021
			miR-15b-5p	0.299	0.019
			miR-487b-3p	0.354	0.016
			miR-28-3p	0.333	0.011
			miR-27b-3p	0.411	0.009
			miR-132-3p	0.293	0.008
			miR-374b-5p	0.309	0.007
			miR-125a-5p	0.277	0.004
			miR-451a	0.361	0.002
			miR-99a-5p	0.346	0.002
			miR-130a-3p	0.224	0.006
			miR-133b	0.175	0.017
			miR-23b-3p	0.136	0.016
			miR-28-5p	0.147	0.006
			miR-125b-5p	0.175	0.003
			miR-143-3p	0.159	0.003
			miR-1-3p	0.072	0.009
			miR-145-5p	0.095	0.001
			miR-365a-3p	0.111	0.001

FC: fold change

Attachment



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de microRNAs em pacientes com diagnóstico histopatológico de doença neuronal intestinal do tipo B

Pesquisador: Marcos Curcio Angelini

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35679614.0.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Cirurgia e Ortopedia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 821.355

Data da Relatoria: 06/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um subprojeto integrante de projeto maior, já aprovado pelo CEP sob número CAAE11520712.6.0000.5411. Justifica o autor que em meio às lacunas de conhecimento quanto etiopatogenia e diagnóstico da Displasia Neuronal Intestinal, é encontrado um amplo cenário para a investigação científica. Neste momento, a dificuldade de correlacionar alterações genéticas e displasia neuronal intestinal impulsionam a necessidade de se investigar estes pacientes a fim de se confirmar essa ligação. Desta forma, o estudo com microRNAs circulantes de pacientes com diagnóstico histopatológico de displasia neuronal intestinal, pode nos fornecer dados importantes para o melhor entendimento de alterações genéticas com a etiopatogenia da doença, além de poder se tornar, mais tarde, mais um item no arsenal diagnóstico da patologia.

Por fim, elenca a hipótese segundo a qual há uma base genética comum aos pacientes com displasia neuronal intestinal do tipo B.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é, através de análise laboratorial, determinar o perfil global de expressão de microRNAs circulantes no sangue periférico de pacientes com diagnóstico histopatológico prévio de displasia neuronal intestinal compará-los a um grupo controle já coletado em estudos

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

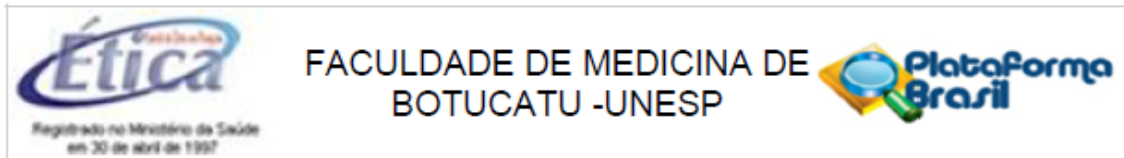
UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1808

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 821.355

anteriores, buscando esclarecer desta maneira, um possível papel genético na fisiopatologia ainda obscura desta doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o projeto há riscos quanto à punção venosa que poderá causar dor e desconforto. Este risco será inerente à coleta de material dos pacientes.

No entanto trará benefícios diretos no que tange às informações sobre a origem genética de displasia neuronal intestinal do tipo B.

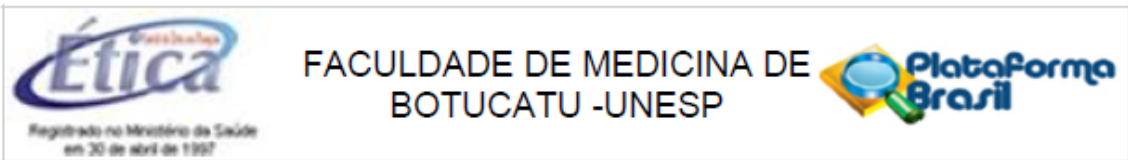
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão analisados 63 participantes, com idade de 0 a 15 anos e com diagnóstico histopatológico de Displasia Neuronal Intestinal Tipo B, realizado a partir da análise histopatológica de biópsias do reto, seguindo critérios estabelecidos por Meier-Ruge et al. (2004), no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, no período de 1998 a 2010. Os pacientes e os seus responsáveis serão convocados, por correspondência e por ligação telefônica, a comparecer à Unidade de Pesquisa Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu (UPECLIN), em data agendada. Nesta ocasião, serão previamente informados quanto à finalidade da pesquisa e os seus responsáveis assinarão Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Crianças com mais de 11 anos de idade deverão assinar Termo específico de Assentimento, de acordo com as normas e resoluções nacionais vigentes. Em seguida, será realizada a coleta de uma amostra de sangue (5ml) para extração de RNA e análise de expressão de miRNAs circulantes. Amostras de sangue periférico de crianças e adolescentes saudáveis já foram coletadas em estudos anteriores e estão disponíveis para serem utilizadas neste estudo como Grupo Controle. O processamento dos materiais e a análise da expressão de miRNAs ocorrerá na Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNIPEX). Para tanto serão coletados de 5-10 ml de sangue por punção de veia periférica, em tubo com EDTA, com o intuito de analisar miRNAs circulantes.

Após será feita análise da expressão global, além de análise estatística, tudo descrito no projeto.

O projeto terá início em 01/01/2015 e término em 01/01/2016 sendo estimado um custo da ordem de R\$ 3.000,00 através de financiamento próprio. Ainda sim foi elencado pelos pesquisadores que houve solicitação de financiamento para o projeto, através do Edital MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 - Faixa A - até R\$ 30.000,00, protocolo nº 5510647116083991.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608	E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 821.355

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No que tange aos termos e autorizações, tem-se que foram devidamente apresentados nos termos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, quais sejam a autorização e cumprimento da diretora da Faculdade de Medicina de Botucatu; declaração de cumprimento das Resoluções.; compromisso de entrega do relatório final; autorização do chefe de departamento para consulta de prontuários, além de compromisso e cumprimento; declaração de ciência e autorização do Superintendente do HCFMB; Em relação ao TCLE e ao termo de Assentimento há de se dizer que foram apresentados no formato de convite e em linguagem adequada.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante dos termos supra relatados, o projeto poderá ser aprovado sem necessidade de envio do projeto à CONEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

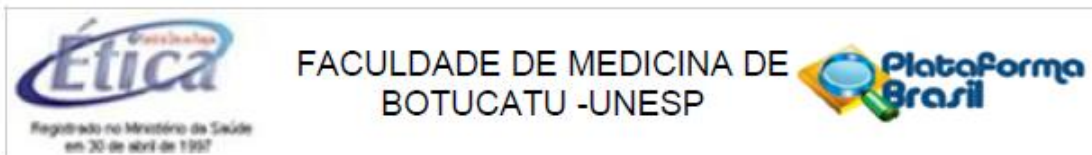
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 06/11/2014, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP solicita aos pesquisadores que ao final da execução deste Estudo seja enviado para análise o "Relatório Final de Atividades"

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.818-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1808 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 821.355

BOTUCATU, 07 de Outubro de 2014

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br