RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 29/05/2020.

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.

Agradecimentos

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 chance

FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded

GNDF: 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. Quardo 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 at., 2010; Friedmacher & Puri, 2013; Lourenção et al. 2016). Apesar da intensa investigação científica realizada desde sua primeira descrição, ainda existem inúmeras indefinicões 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).

1. 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 displasia? Peditr 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/Hox11L.1 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/Hox11L.1 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/HOX11L.1-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, Coerdt W, Wessel L, Keller KM, Nützenadel W, Schmittenbecher 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. Coerdt 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 thelarge intestine--classification and diagnosis. Results of a consensus conference of theSociety 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, Coerdt 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.