

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 29/11/2019.



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

**Wilson Elias de Oliveira Júnior**

**Perfil de expressão de microRNAs no esôfago  
de crianças portadoras de estenose cáustica**

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 na área de concentração Cirurgia Pediátrica

Orientadora: Profa. Adj. Erika Veruska Paiva Ortolan

Wilson Elias de Oliveira Júnior

Perfil de expressão de microRNAs no esôfago de  
crianças portadoras de estenose cáustica

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 na área de concentração  
Cirurgia Pediátrica

Orientadora: 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

Oliveira Junior, Wilson Elias.

Perfil de expressão de microRNAs no esôfago de crianças portadoras de estenose cáustica / Wilson Elias Oliveira Junior. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Érika Veruska de Paiva Ortolan  
Capes: 40102076

1. Crianças - Doenças - Tratamento. 2. Esofago - Estenose. 3. MicroRNAs. 4. Expressão gênica. 5. Esôfago - Câncer.

Palavras-chave: Câncer de Esôfago; Crianças; Estenose Cáustica do Esôfago; Genética; micro-RNA.

Wilson Elias de Oliveira Júnior

**Perfil de expressão de microRNAs no Esôfago de crianças  
portadoras de Estenose Cáustica**

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 na área de concentração Cirurgia Pediátrica.

Orientadora: Profa. Adj. Erika Veruska Paiva Ortolan

Comissão Examinadora:

---

Profa. Adj. Erika Veruska Paiva Ortolan  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMB/UNESP

---

Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMB/UNESP

---

Prof. Dr. Walmar Kerche de Oliveira  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMB/UNESP

---

Profa. Adj. Simone de Campos Vieira Abib  
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

---

Prof. Dr. Rodrigo Chaves Ribeiro  
Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos “Dr Paulo Prata”- FACISB

**Dedico esta tese,**

Aos meus amados pais, **Wilson Elias de Oliveira e Silvia Rejania Machel de Oliveira** os primeiros a semear educação e respeito, plantaram valores que norteiam a minha vida. Abdicaram de seus sonhos e desejos para oferecer aos filhos oportunidades que não possuíram e realizassem seus sonhos. Sou eternamente grato às orações, apoio incondicional e, acima de tudo, ao amor. O amor de vocês me fortalece, e sem ele não chegaria a lugar algum. Vocês são o meu exemplo, minha inspiração. Tudo o que sou e conquisto, devo a vocês! Eu os amo de alma!

À minha amada esposa **Mirayr Almeida Borba Carvalho de Oliveira** portadora de grande nobreza de caráter, embarcou comigo nesta jornada, mantendo-se ao meu lado em todos os momentos, especialmente nos de desesperança e incertezas, comuns a quem trilha caminhos repletos de desafios. Amor da minha vida, minha companheira, parceira de vida, sempre compreensiva e estimuladora dos meus sonhos. Te amo *vidinha* !

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que em Sua infinita misericórdia abriu os caminhos, forneceu condições, deu forças na escolha das direções a serem tomadas e colocou Seus anjos cruzando os meus caminhos. Agradeço a Ele todas as vitórias e conquistas alcançadas durante toda a minha vida.

Aos **meus pais, minha esposa e a toda minha família** (avô, avós, irmão, sobrinhas, tios, tias, primos, primas, sogros, cunhados e cunhadas) agradeço o apoio, as orações, e especialmente a compreensão do tempo de convívio inúmeras vezes sacrificado ao longo destes últimos anos de minha formação. Por toda torcida, felicidade, carinho, confiança, apoio, incentivo e dedicação encontrada na minha grande, e muito querida, família que sempre fará parte de cada vitória.

À minha orientadora **Profa. Adj. Erika Veruska Paiva Ortolan** a oportunidade de tê-la como preceptora na residência de Cirurgia Pediátrica e orientadora de Doutorado. A senhora é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Demonstra a sua preocupação (e exigência!) não apenas com a execução da atividade proposta, mas em todas as implicações diretas e indiretas, olhando a criança de forma holística em todas as suas facetas. Tenho muito orgulho em referencia-la como uma das responsáveis por minha formação profissional. Agradeço pelos seus valiosos ensinamentos, amizade, paciência, por acreditar e confiar em meu trabalho. Obrigado por ter me motivado a sempre fazer o melhor e buscar referenciais teóricos que atribuíram coerência e consistência a esta tese. A senhora foi fundamental no meu amadurecimento profissional, científico e pessoal.

À disciplina de **Cirurgia Pediátrica FMB/UNESP** na pessoa do **Prof. Dr.**

**Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção** meu preceptor e amigo, pela confiança em mim depositada nestes quatro anos de convivência. Agradeço por todas as oportunidades oferecidas, ao constante apoio e incentivo ao estudo e exercício exemplar da Cirurgia Pediátrica com técnica, dedicação, ética e amor.

A **Profa Dra Patrícia Pintor dos Reis**, pela fundamental assistência, apoio e tempo dedicado a este trabalho. Sua enorme competência e dedicação na orientação da condução dos experimentos trouxeram grandes ensinamentos para mim, e me colocaram em um caminho, até então desconhecido, que hoje sou fascinado. Obrigado pela atenção e paciência ao longo da realização deste estudo, e em especial na fase final de fechamento da tese e confecção do artigo original. Para mim foi um grande prazer trabalhar ao seu lado.

À **Prof. MSc. Tainara Francini Felix** com quem estive lado a lado no desenvolvimento e condução de grande parte deste trabalho enquanto também concluía o seu doutorado em Bases Gerais da Cirurgia. Agradeço sua determinação e empenho desde o início acreditando no sucesso desta pesquisa, toda a dedicação e por não medir esforços na execução dos trabalhos.

A aluna do curso de Medicina da FMB/UNESP **Grazielle do Vale Pires** pela dedicação e interesse, fazendo parte deste trabalho de forma ativa, contemplada com bolsa de Iniciação Científica pela Fundação de Apoio a Pesquisa no Estado de São Paulo (processo número 2015/03287-4).

A **Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP)** e ao **Hospital das Clínicas de Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB)** pelo acolhimento, atenção e principalmente pelo ambiente acadêmico arejado, aberto ao pensamento crítico, com assistência médica de qualidade e pesquisas científicas de ponta. Estas instituições foram fundamentais e

moldaram a minha formação enquanto Cirurgião Pediátrico.

Ao **Departamento de Patologia da FMB/UNESP** na pessoa das professoras **Profa. Tit. Maria Aparecida Marchesan Kobayasi e Profa. MSc. Simone Antunes Terra** pela disponibilidade, apoio logístico e suporte na realização deste estudo.

A toda equipe do **Setor Técnico de Endoscopia do HCFMB** pelo apoio, parceria e exemplo.

A toda equipe do **laboratório Neogene** em especial a **Marco Lopez Lapa e Fábio Eduardo Severino**, pela participação, auxílio no desenvolvimento e esclarecimentos de dúvidas junto a este projeto. Vocês foram fundamentais para a condução e conclusão do mesmo.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, **sra Márcia Fonseca Piagentini Cruz** pela paciência, gentilezas, presteza e apoio técnico.

Àqueles que se tornaram minha família em Botucatu, meus amigos tão queridos **Isadora Pimentel, Raquel Nascimento, Marcos Angelini, Adriana Curtolo, Anelise Valim, Bárbara Sanches, Fernanda Coltri, Francine Ambrózio, Caio Barbosa, e tantos outros** com quem tive o prazer do convívio agradeço a amizade, cumplicidade, exemplo e acolhimento ao longo destes anos.

A equipe de Cirurgia Oncológica Pediátrica do Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos **Dra Vilani Kremer e Dr Rodrigo Chaves Ribeiro** além dos muitos ensinamentos e amizade, pela grande ajuda no ultimo ano possibilitando a conclusão deste doutorado.

Aos professores do curso de graduação em **Medicina do ITPAC/FAHESA**,

em especial **Prof. Dr. Élvio Machado da Rocha, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Bringel, Prof. Dr. Rone Antonio Alves de Abreu, Profa MSc Valéria Rita Correa, Prof. Esp. Jose Geraldo Rigotti de Faria e Profa Esp Maria Lúcia Carneiro Barbosa de Brito** por despertar o pensamento crítico, incentivar a busca do conhecimento científico de qualidade, estimular a docência através de monitorias e fomentar a pesquisa entre seus alunos, mesmo ante a tantas dificuldades como aquelas encontradas no Estado do Tocantins.

O momento de escrever estes agradecimentos é a representação da finalização de um ciclo muito importante em minha vida. Recebi importantes contribuições de muitas pessoas, instituições, departamentos, e setores para o desenvolvimento, realização e conclusão deste trabalho. É muito a agradecer e difícil mencionar todos que fizeram da minha trajetória um caminho de realização, crescimento e amadurecimento. A todos, expresso os meu mais sincero “muito obrigado”.

*Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the Universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don't just give up.*

— Stephen Hawking

*If we want an answer from nature, we must put our questions in acts, not words, and the acts may take us to curious places. Some questions were answered in the laboratory, others in mines, others in a hospital where a surgeon pushed tubes in my arteries to get blood samples, others on top of Pike's Peak in the Rocky Mountains, or in a diving dress on the bottom of the sea. That is one of the things I like about scientific research. You never know where it will take you next.*

— J.B.S. Haldane, no ensaio 'Some Adventures of a Biologist' (1953)

## RESUMO

Oliveira Junior, WE. Perfil de expressão de microRNAs no esôfago de crianças portadoras de estenose cáustica. Botucatu, 2017. [tese], Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

**Introdução:** Por volta de oitenta por cento dos acidentes envolvendo ingestão de cáusticos ocorrem em crianças. A estenose cáustica do esôfago é a sua principal complicação com grande morbidade. Lesões neoplásicas esofágicas podem desenvolver-se como uma complicação tardia desta estenose com um tempo médio de aparecimento entre o acidente e o desenvolvimento neoplásico de 15 a 30 anos. Considerando este risco, biopsias seriadas do esôfago são recomendadas com o objetivo de detecção precoce de displasias. Assim, um conhecimento abrangente da relação biológica entre cáusticos e neoplasia esofágica é de grande importância na identificação de novos biomarcadores que possibilitariam tratamento precoce. MicroRNAs (miRNAs) são RNAs pequenos, não codificadores de proteínas que regulam importantes processos celulares e têm se mostrado como robustos biomarcadores. O perfil global de expressão de miRNAs nesta população, seguida da identificação dos miRNA-alvo, pode levar à identificação da presença e magnitude do dano ao material genético em amostra de tecido esofágico obtido de pacientes portadores de estenose cáustica.

**Objetivos:** Determinar o perfil global da expressão de miRNAs em células da mucosa esofágica de crianças portadoras de lesões por ingestão de cáusticos, com o objetivo de identificar miRNAs como biomarcadores associados a tumorigênese esofágica nesta população específica.

**Materiais e Métodos:** Vinte e sete amostras esofágicas fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) de 15 pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com o tempo transcorrido entre o acidente e a

estenose (Grupo A: menos de 5 anos; Grupo B: mais de 5 anos). Estes tecidos foram então pareados de acordo com o gênero, idade e ano da biópsia, e comparados a amostras esofágicas normais (macro e microscopicamente). Após o pareamento, as amostras foram microdissecadas com agulha e submetidas a extração do RNA usando o *Recover AllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Life Technologies). A análise de expressão global dos miRNAs foi realizada utilizando a plataforma TaqMan Array Human MicroRNA Cards (TLDA) (card A, v3.0) (Life Technologies). Os dados de expressão foram extraídos através do programa Expression Suite Software v1.0.3. Análises através de *softwares* de bioinformática foram utilizadas para identificar genes-alvo de miRNAs, construindo redes de interação proteica.

**Resultados:** Nosso estudo demonstrou um número maior de miRNAs desregulados ( $FC \geq 1,5$  e  $p < 0.05$ ) na mucosa esofágica de pacientes com menos de 5 anos após a ingestão cáustica. 13 miRNAs (9 super- e 4 subexpressos) na mucosa esofágica de pacientes do Grupo A demonstraram-se significativamente desreguladas quando comparados a tecidos esofágicos normais. No Grupo B, 2 miRNAs apresentaram-se super- e 2 subexpressos. Destes, 2 miRNA (miR-374 and miR-574) estão relacionados de forma contundente ao câncer de esôfago segundo estudos recentes. Quando executada a rede de interação proteica, nossa análise evidenciou um número importante de interações entre miRNAs e genes-alvos entre as vias de sinalização molecular da neoplasia de esôfago, com genes fortemente associados à sua tumorigênese.

**Conclusões:** A análise do perfil de expressão global de miRNAs nesta população pediátrica específica é inédita na literatura. Os miRNAs aqui identificados podem estar associados a biologia da transformação esofágica maligna da estenose cáustica para o cancer de esôfago, mesmo nos primeiros anos após a lesão, podendo servir no futuro como novos biomarcadores moleculares de progressão à malignidade. Estudos multicêntricos que reúnam maior tamanho amostral necessitam ser

realizados para confirmar os resultados aqui obtidos e elucidar melhor o mecanismo subjacente e à correlação entre estenose cáustica e câncer de esôfago.

**Suporte Financeiro:** CNPQ número 2014/458734-4; Bolsa de Iniciação Científica FAPESP número 2015/03287-

## ABSTRACT

Oliveira Junior, WE. MicroRNA expression profile in esophagus of children with caustic stenosis. Botucatu, 2017. [thesis], Ph.D. in Surgery, Botucatu Medical School, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

**Background:** 80% of the caustic ingestions occur in children. Esophageal stricture is a major chronic complication with great morbidity. Esophageal neoplasms may develop as a late complication of caustic injury with a mean time between caustic ingestion and cancer development of 15-30 years. Serial biopsies are recommended aiming early detection of premalignant changes. Thus a comprehensive knowledge of biological relation between caustic and esophageal cancer is of major importance to identify the biomarkers that could enable an early treatment. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules and regulate key cellular processes during tumorigenesis and have been demonstrated as an useful diagnostic, prognostic and predictive biomarkers. Global miRNA expression profiling analysis in this population, followed by the identification of miRNA target genes, may lead to the identification of the presence and magnitude of damage to genetic material in a sample of esophageal tissue obtained from patients with caustic stenosis.

**Objectives:** We aimed to identify global microRNA (miRNA) expression changes in cells of the esophageal mucosa from children with caustic lesions compared to paired macroscopic and microscopically normal esophageal tissue.

**Patient and Methods:** 27 formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) esophageal samples from 15 patients were divided into two groups according to the time elapsed after the injury (Group A: less than 5 years, Group B: more than 5 years). Those tissues and their paired by gender, age and year of biopsy to normal (macro and microscopically) esophageal tissues. Group samples were needle microdissected and subjected to RNA

isolation using the Recover AllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit (Life Technologies). All samples were profiled using the TaqMan Array Human MicroRNA Cards (TLDA) (card A, v3.0) (Life Technologies). Data analysis was performed using ExpressionSuite Software v1.0.3. Computational bioinformatics analysis was performed to identify miRNA target genes, as well as to construct protein-protein interaction and miRNA-gene targets networks.

**Results:** Our analysis showed a larger number of deregulated miRNAs ( $FC \geq 1.5$  and  $p < 0.05$ ) in esophageal mucosa of patients with less than 5 years after caustic ingestion compared to those in with more than 5 years. 13 miRNAs (9 over- and 4 under-expressed) were significantly deregulated in Group A compared to paired normal esophageal tissue. In Group B, 2 miRNAs were under- and 2 were over-expressed. Of these, 2 microRNA (miR-374 and miR-574) are strongly related to esophageal cancer according to recent studies. When performed protein-protein interaction network of Group B), analysis showed a number of miRNA-target gene interactions within signal transduction and transcription factor networks in esophageal cancer, with genes strongly related to its tumorigenesis.

**Conclusions:** There is no literature on the research of microRNAs in the population of patients who ingested caustics, especially children. miRNAs identified herein may be associated to the biology of the malignant transformation from caustic stenosis to esophageal cancer, even in early years after caustic lesion and may serve in the future as novel molecular markers for progression to malignancy. Further investigation is needed to elucidate the mechanism underlying the correlation and malignant transformation between caustic stenosis and cancer progression.

**Financial Support:** CNPQ, grant #2014/458734-4; FAPESP Grant #2015/03287-4

## SUMÁRIO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo.....                                                               | 10 |
| Abstract .....                                                            | 13 |
| Lista de abreviaturas .....                                               | 17 |
| Lista de figuras .....                                                    | 18 |
| Lista de tabelas.....                                                     | 23 |
| Lista de quadros.....                                                     | 24 |
| 1. Introdução.....                                                        | 25 |
| 2. Metodologia.....                                                       | 35 |
| 2.1. Casuística .....                                                     | 36 |
| 2.1.1. Critérios de Inclusão.....                                         | 36 |
| 2.1.2. Critérios de Exclusão.....                                         | 36 |
| 2.1.3. Considerações sobre aspectos éticos.....                           | 36 |
| 2.2. Suporte Financeiro.....                                              | 36 |
| 2.3. Delineamento.....                                                    | 36 |
| 2.3.1. Características da série de casos.....                             | 35 |
| 2.3.2. Identificação e grupamento das amostras.....                       | 37 |
| 2.4. Análise Molecular.....                                               | 38 |
| 2.4.1. Método de extração de RNA.....                                     | 38 |
| 2.4.2. Microdissecção com agulha das amostras dos blocos de parafina..... | 38 |
| 2.4.3. Extração de RNA das amostras microdissecadas.....                  | 39 |
| 2.4.4. Avaliação da quantidade e da qualidade do RNA.....                 | 40 |

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.4.5. Reação de Transcrição Reversa de microRNAs.....                                                                        | 40  |
| 2.4.6. Análise da expressão de microRNAs.....                                                                                 | 41  |
| 2.5. Análise dos dados.....                                                                                                   | 41  |
| 2.5.1. Processamento dos dados de expressão.....                                                                              | 41  |
| 2.5.2. Análise estatística e construção da rede de interação<br>proteica ( <i>Protein-Protein Interaction Map: PPI</i> )..... | 42  |
| 3.Resultados.....                                                                                                             | 44  |
| 3.1. Análise da série de casos.....                                                                                           | 45  |
| 3.2. Perfil de expressão global dos microRNAs.....                                                                            | 48  |
| 4. Discussão.....                                                                                                             | 61  |
| 5. Conclusão.....                                                                                                             | 82  |
| 6. Perspectivas Futuras.....                                                                                                  | 85  |
| Artigo Original .....                                                                                                         | 87  |
| Referências Bibliográficas.....                                                                                               | 108 |
| Apêndice 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....                                                           | 120 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|              |                                                                                         |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| ABL          | <i>ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>                               |
| ADAM9        | <i>a disintegrin and metalloprotease domain 9</i>                                       |
| AKT          | <i>serine/threonine kinase</i>                                                          |
| APC          | <i>adenomatous polyposis coli</i>                                                       |
| BCR          | <i>BCR, RhoGEF and GTPase activating protein</i>                                        |
| c-myc        | <i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>                                    |
| CECE/ESCC    | <i>Carcinoma espinocelular do esôfago, do inglês esophageal squamous cell carcinoma</i> |
| DGCR8        | <i>Di George syndrome critical region 8</i>                                             |
| DNA          | <i>Ácido Desoxiribonucleico</i>                                                         |
| EED          | <i>Exame contrastado do esôfago, estômago e duodeno</i>                                 |
| EGFR         | <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>                                                 |
| ErBB3        | <i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 3</i>                                                |
| ERK-5        | <i>extracellular signal-regulated kinase-5</i>                                          |
| FC           | <i>Fold-change</i>                                                                      |
| FFPE         | <i>Fixado(a) em formalina e embebido(a) em parafina</i>                                 |
| FSCN1        | <i>Fascin homolog 1 gene</i>                                                            |
| GA           | <i>Grupo A</i>                                                                          |
| GB           | <i>Grupo B</i>                                                                          |
| GSK3 $\beta$ | <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>                                                  |
| H&E          | <i>Hematoxilina &amp; Eosina</i>                                                        |
| HER-2        | <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>                                         |
| Hsa          | <i>Homo sapiens</i>                                                                     |
| IGF-R1       | <i>insulin-like growth factor I receptor</i>                                            |
| MAPK         | <i>mitogen-activated protein kinase</i>                                                 |
| min.         | <i>Minutos</i>                                                                          |
| miR/miRNA    | <i>microRNA</i>                                                                         |
| miRDIP       | <i>microRNA Data Integration Portal</i>                                                 |

miRTarBase *microRNA Target Interactions Database*

|                       |                                                                                             |                 |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| mRNA/RNA <sub>m</sub> | RNA mensageiro                                                                              |                 |
| mTOR                  | <i>mammalian target of rapamycin</i>                                                        |                 |
| NaOH                  | Hidróxido de sódio                                                                          |                 |
| NF-κB                 | <i>nuclear factor kappa B subunit 1</i>                                                     |                 |
| p-value               | valor de p                                                                                  |                 |
| PDK 1                 | <i>phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>                                          |                 |
| pH                    | Potencial hidrogeniônico                                                                    |                 |
| PI3K                  | <i>phosphoinositide 3-kinase</i>                                                            |                 |
| PIK3CA                | <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate<br/>catalytic subunit alpha</i>                    | <i>3-kinase</i> |
| PKR                   | <i>Protein Kinase RNA-activated</i>                                                         |                 |
| PLCE1                 | <i>phospholipase C epsilon 1</i>                                                            |                 |
| pré-miRNA             | microRNA precursor                                                                          |                 |
| Pri-miRNA             | Transcrito primário longo de microRNA                                                       |                 |
| PTEN                  | <i>phosphatase and tensin homolog</i>                                                       |                 |
| RISC                  | Complexo indutor de silenciamento de RNA, do inglês<br><i>RNA-Induced Silencing Complex</i> |                 |
| RNA(s)                | Ácido Ribonucleico                                                                          |                 |
| rpm                   | rotações por minuto                                                                         |                 |
| RT-qPCR               | PCR quantitativa em tempo real                                                              |                 |
| seg.                  | segundos                                                                                    |                 |
| SOX4                  | <i>SRY-related HMG-box 4</i>                                                                |                 |
| SOX9                  | <i>SRY-related HMG-box 9</i>                                                                |                 |
| TA                    | Temperatura ambiente                                                                        |                 |
| TGF-β                 | <i>transforming growth factor beta 1</i>                                                    |                 |
| UTR                   | Região não traduzida                                                                        |                 |
| VEGF-A                | fator de crescimento endotelial vascular A                                                  |                 |
| Wnt2                  | <i>Wnt family member 2</i>                                                                  |                 |
| YAP 1                 | <i>Yes associated protein 1</i>                                                             |                 |

|            |                                             |
|------------|---------------------------------------------|
| ZEB1       | <i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i> |
| ZEB2       | <i>zinc finger E-box-binding homeobox 2</i> |
| $\Delta t$ | Variação de tempo                           |

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lâminas com a seleção das áreas alvo para servir como “guia” na microdissecção com agulha.....38

Figura 2: Distribuição dos miRNA entre os grupos analisados. Da esquerda para a direita: Dois quadros representativos das amostras do grupo controle, advindas do esôfago de crianças normais (macro e microscopicamente); dois quadros representativos das amostras do grupo de crianças com ingestão cáustica menor que cinco anos; dois quadros representativos das amostras do grupo de crianças com ingestão cáustica maior que cinco anos.....48

Figura 3: Gráfico de *Volcano-Plot* demonstrando o perfil de expressão dos miRNAs nos pacientes do Grupo A.....50

Figura 4: Gráfico de *Volcano-Plot* demonstrando o perfil de expressão dos miRNAs nos pacientes do Grupo B.....51

Figura 5: Análise de predição de alvos moleculares regulados pelos miRNAs expressos nos Grupos A (menos de 5 anos após ingestão) e B (mais de 5 anos) de acordo as ferramentas de bioinformática com identificação de 1579 genes ou RNAm validados no primeiro grupo e 275 genes no segundo.....52

Figura 6: Identificação de vias moleculares reguladas pelos 13 miRNAs com expressão alterada no Grupo A determinadas após a análise de predição dos alvos. Três vias moleculares principais foram identificadas a partir dos 1579 genes validados em tecidos esofágicos: Adesão focal, via de sinalização e ativação de PI3K-AKT.....52

Figura 7: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados no grupo A e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização de adesão focal a partir das interações miRNA-RNAm validados.....54

Figura 8: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados no grupo A e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização PI3K/AKT a partir das interações miRNA-RNAm validados.....55

Figura 9: Identificação de vias moleculares reguladas pelos 4 miRNAs com expressão alterada no Grupo B, determinadas após a análise de predição dos alvos. Cinco vias moleculares principais foram identificadas a partir dos 275 genes validados em tecidos esofágicos: via de sinalização do mTOR, mecanismo de ativação de PI3 quinase, adesão focal, transdução de sinais mediada pelo Wnt, transcrição e tradução Pre-NOTCH.....56

Figura 10: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados no grupo B e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização EGFR a partir das interações miRNA-RNAm validados.....57

Figura 11: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados no grupo B e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização do mTOR a partir das interações miRNA-RNAm validados.....58

Figura 12: Identificação de vias moleculares reguladas em comum pelos 17 miRNAs com expressão alterada nos grupos A e B, determinadas após a análise de predição dos alvos. Quatro vias moleculares principais foram identificadas a partir dos 1678 genes validados em tecidos esofágicos:

adesão focal, via de sinalização da MAP quinase, EGFR, via de sinalização do Wnt.....59

Figura 13: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados nos grupos A e B e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização via de sinalização do Wnt a partir das interações miRNA-RNAm validados.....60

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Resumo dos dados demográficos e clínicos dos pacientes incluídos do estudo.....                                                                                | 45 |
| Tabela 2: Tempo de seguimento, volume de procedimentos de dilatação endoscópica e análise das biópsias dos pacientes incluídos no estudo.....                            | 46 |
| Tabela 3: miRNAs com expressão alterada evidenciados nos pacientes do Grupo A.....                                                                                       | 48 |
| Tabela 4: microRNAs com expressão alterada evidenciados nos pacientes do Grupo B.....                                                                                    | 50 |
| Tabela 5: Expressão, gene(s)-alvo e função dos miRNA em amostras (ou linhas celulares) de CECE de acordo a literatura, listados conforme os resultados deste estudo..... | 51 |

## **LISTA DE QUADROS**

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Classificação endoscópica da lesão esofágica por cáusticos,<br>segundo Zargar et al (1989)..... | 36 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## **Referências Bibliográficas**

Advenier AS, Dorandeu A, Charlier P, et al. Microscopic acute lesions after caustic exposure. *Forensic Science International* 234 (2014) 57–63.

Afzal, N.A.; Albert, D.; Thomas, A.L.; Thomson, M. A child with oesophageal strictures. *Lancet*. v.359, p.1032, 2002.

Anderson, F.H.; Rouse, T.M.; Randolph, J.G. A controlled trial of corticosteroid treatment in children with corrosive injury of the esophagus. *N Engl J Med*. v.33(10), p.637-640, 1990.

Anduze, A.L.; Pterygium surgery with mitomycin C: ten year results. *Ophthalmic Surg Lasers*. v.32, p.341-345, 2001.

Antero DC, Souza JA, Antero MAJ, et al. Aspectos epidemiológicos da ingestão de substâncias cáusticas em crianças. *Arquivos Catarinenses de Medicina* 2008; 37: 42-50.

Apaydin, B.B.; Paksoy, M.; Artis, T., et al. Influence of pentoxifylline and interferon-alpha on prevention of stricture due to corrosive esophagitis. An experimental study in the rat. *Eur Surg Res*. v.33, p.225-231, 2001.

Appelqvist P, Salmo M. Lye Corrosion Carcinoma of the Esophagus: A Review of 63 Cases. *Cancer* 1980; 45: 2655-2658.

Baek SJ, Sato K, Nishida N, Koseki J, Azuma R, Kawamoto K, et al. MicroRNA miR-374, a potential radiosensitizer for carbon ion beam radiotherapy. *Oncol Rep*. 2016; 36(5):2946-2950.

Bakan, V.; Garipardic, M.; Okumus, M.; Ciralik, H.; Ath, Yalçın., et al. The protective effect of erythropoietin on the acute phase of corrosive esophageal burns in a rat model. *Pediatric Surg Int*. v 26, p. 195-201, 2010.

Bakshi, S.R.; Patel, R.K.; Roy, S.K.; Alladi, P., et al. Mitomycin C induced chromosomal aberrations in young cancer patients. *Mutat Res*. v.422, p.223-228,

1998.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.

Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C: The microrna.Org resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Res* 2008;36:D149-153.

Bicakci U, Tander B, Deveci G, et al. Minimally invasive management of children with caustic ingestion: less pain for patients. *Pediatr Surg Int* 2010; 26: 251-255.

Botwe BO, Anim-Sampong S, Sardokie BD, et al. Caustic soda ingestion in children under-5 years presenting for fluoroscopic examinations in an Academic Hospital in Ghana. *BMC Res Notes* 2015; 8:684-691.

Broor, S.L.; Lahoti, D.; Bose, P.P.; Ramesh, G.N.; Raju, G.S.; Kumar, A. Benign esophageal strictures in children and adolescents: etiology, clinical profile, and results of endoscopic dilation. *Gastrointest Endosc.* v.43, p. 474-477, 1996.

Broto, J.; Asensio, M.; Soler, J.C. Conservative treatment of caustic injuries in children: 20 years of experience. *Pediatr Surg Int*, v.15, p. 323-325, 1999.

Brown KR, Jurisica I: Online predicted human interaction database. *Bioinformatics* 2005;21:2076-2082.

Brown KR, Otasek D, Ali M, McGuffin MJ, Xie W, Devani B, Toch IL, Jurisica I: Navigator: Network analysis, visualization and graphing toronto. *Bioinformatics* 2009;25:3327-3329.

Cadranel, S.; Scailen, M.; Goyens, P., et al. Treatment of esophageal caustic injuries: experience with high dose dexamethasone. *Pediatr Surg Int.* v.8, p.97-102, 1993.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353:

1793-801.

Chen G, Peng J, Zhu W, et al. Combined downregulation of microRNA-133a and microRNA- 133b predicts chemosensitivity of patients with esophageal squamous cell carcinoma undergoing paclitaxel-based chemotherapy. *Med Oncol.* 2014; 31:263

Chen XF, Liu Y. MicroRNA-744 inhibited cervical cancer growth and progression through apoptosis induction by regulating Bcl-2. *Biomed Pharmacother.* 2016; 81:379-87.

Chen Z, Li J, Tian L, et al. MiRNA expression profile reveals a prognostic signature for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 2014; 350: 34–42.

Chen, C.W.; Huang, H.T.; Bair, J.S.; Lee, C.C. Trabeculectomy with simultaneous application of mitomycin C in refractory glaucoma. *J Ocul Pharmacol.* v.6(3), p.175-182, 1990.

Chiam K, Wang R, Watson DI, et al. Circulating Serum Exosomal miRNAs As Potential Biomarkers for Esophageal Adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2015; 19(7): 1208-15.

Chiyomaru T, Yamamura S, Fukuhara S, et al. Genistein up-regulates tumor supressor microRNA-574-3p in prostate cancer. *PLoS ONE.* 2013; 8 e58929.

Contini S, Garatti M, Swarray-Deen A, et al. Corrosive oesophageal strictures in children: outcomes after timely or delayed dilatation. *Digestive and Liver Disease* 2009; 41: 263-268.

Contini S, Scarpignato C. Caustic injury of upper gastrointestinal tract: A comprehensive review. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 3918-3930.

Corsi, P. R., et al. Lesão aguda esôfago-gástrico causada por agente químico. *Revista Associação Médica do Brasil.* São Paulo, p. 98-105, 2000.

Costa NM, Lima SCS, Simão TA, Pinto LFR. The potential of molecular markers to improve interventions through the natural history of oesophageal squamous cell carcinoma. *Biosci Rep*. 2013; 33(4): e00057

Crippa E, Folini M, Pennati M, Zaffarano N, Pierotti MA, Gariboldi M. miR-342 overexpression results in a synthetic lethal phenotype in BRCA1-mutant HCC1937 breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(14):18594-604

Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene* 2006; 25: 6220-7.

Dantas, R. O.; Mamede, R. C. M. Esophageal motility in patients with esophageal caustic injury. *The American Journal of Gastroenterology*. v.91, n.6, p.1157-1161, 1996.

Denlinger CE, Thompson RK. Molecular Basis of Esophageal Cancer Development and Progression. *Surg Clin N Am*. 92 (2012) 1089 - 1103.

Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006; 78: 180-9.

Ekingen, G.; Ozden, M.; Maral, H., et al. Effect of the prostacyclin derivate iloprost in experimental caustic esophageal burn. *Pediat Surg Int*. v.21, p.441-444, 2005.

Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Feb;13(2):397-406.

Fassan M, Bafra R, Kias A, et al. MicroRNA dysregulation in esophageal neoplasia: the biological rationale for novel therapeutic options. *Curr Pharm Des*. 2013;19(7):1236-41.

Feber A, Xi L, Luketich JD, et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135:255-60.

Ferreira, C.T.; Pretto, F.M.; Angeli, C.; Nunes, D.A.; Zim, M.C.; Cantalice Neto, A. et al. Estenose de esôfago na criança: etiologia, aspectos clínicos e resultados de dilatações com Savary-Gilliard. GED. v.22, p. 61-67, 2003.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mrnas are conserved targets of micrnas. *Genome Res* 2009;19:92-105

Gallardo, L.M.; Fragoso, T.A.; Sagaro, E.G. Treatment of esophageal stenosis with Savary-Gilliard balloons in children. *G.E.N.* v.49(1), p.15-22, 1995.

Goswami RS, Atenafu EG, Xuan Y, et al. 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.

Goswami RS, Waldron L, Machado J, et al. Optimization and analysis of a quantitative real-time pcr-based technique to determine microrna expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *BMC Biotechnol* 2010;10:47

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP: Microrna targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007;27:91-105.

Guillemot L, Paschoud S, Jond L, Foglia A, Citi S. Paracingulin regulates the activity of Rac1 and RhoA GTPases by recruiting Tiam1 and GEF-H1 to epithelial junctions. *Mol Biol Cell.* 2008 Oct;19(10):4442-53.

Hamza AF, Abdelhay S, Sherif H, et al. Caustic Esophageal Strictures in Children: 30 years' of experience. *Journal of Pediatric Surgery* 2003; 38:828-833.

Harada K, Baba Y, Ishimoto T, et al. The role of microRNA in esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol.* 2016. 51: 520-530.

Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15: 410-5.

Herek, O.; Karabul, M.; Yenisey, C.; Erkus, M. Protective effects of ibuprofen against caustic esophageal burn injury in rats. *Pediatr Surg Int.* v. 26, p. 721-727, 2010.

Hezova R, Kovarikova A, Srovnai J, et al. MiR-205 functions as a tumor suppressor in adenocarcinoma and an oncogene in squamous cell carcinoma of esophagus. *Tumour Biol.* 2016;37(6):8007-18

Hopkins RA, Postlethwait RW. Caustic Burns and Carcinoma of the Esophagus. *Ann Surg* 1981;194:146-8

Hu YX, Correa AM, Hoque A, et al. Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer. *Int J Cancer.* 128: 132-143. 2011.

Huang H, Fan L, Zhan R, et al. Expression of microRNA-10a, microRNA-342-3p and their predicted target gene TIAM1 in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Oncol Lett.* 2016 Jan;11(1):345-351.

Huang J, Zhang SY, Gao YM, Liu YF, Liu YB, Zhao ZG and Yang K: MicroRNAs as oncogenes or tumour suppressors in oesophageal cancer: Potential biomarkers and therapeutic targets. *Cell Prolif.* 47:277–286. 2014.

Iorio MV, Croce CM: MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012, 4(3):143-159.

Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5848-56.

Isolaauri J, Markkula H. Lye ingestion and carcinoma of the esophagus. *Acta Chir Scand* 1989;155(4–5):269–71.

Issaivanan M, Redner A, Weinstein T, et al. Esophageal Carcinoma in Children and Adolescents. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012;34:63–67

Jin YY, Chen QJ, Xu K, et al. Involvement of microRNA-141-3p in 5-fluorouracil and

oxaliplatin chemo-resistance in esophageal cancer cells via regulation of PTEN. *Mol Cell Biochem.* 2016;422(1-2):161-170.

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS: Human microRNA targets. *PLoS Biol* 2004;2:e363.

Kano M, Seki N, Kikkawa N, et al. miR-145, miR-133a and miR-133b: tumor-suppressive miRNA target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2010. 127: 2804-14.

Kay M, Wyllie R. Caustic ingestions in children. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21: 651–654.

Kaya M, Boleken ME, Mmetoglu E, et al. Evaluation of systemic oxidative status and mononuclear leukocytes DNA damage in children with caustic esophageal stricture. *Dis Eso* 2006; 19: 280-284.

Kestens C, Siersema PD, van Baal JWPM. Current understanding of the functional roles of aberrantly expressed microRNAs in esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(1):1-7.

Kochhar R, Sethy PK, Kochhar S et al. Corrosive induced carcinoma of esophagus: Report of three patients and review of literature. *J Gastroenterol Hepatol* 2006 Apr;21(4):777-80.

Kurowski JA, Kay M. Caustic Ingestions and Foreign Bodies Ingestions in Pediatric Patients. *Pediatr Clin North Am.* 2017; 64(3):507-524.

Kyian, G.; Aktas, S.; Ozel, K., et al. Effects of hiperbaric oxygen therapy on caustic esophageal injury in rats. *J Pediat Surg.* v.39, p.1188-1193, 2004.

Larios-Arceo, F.; Ortiz, G.; Huerta, M.; Leal-Cortes, C., et al. Protective effects of melatonin against caustic esophageal burn injury in rats. *J. Pineal Res.* v.45, p.219-223, 2008.

Lee HS, Lee K, Jang HJ, et al. Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis. *Oncotarget*. 2014; 5(11):3472-81.

Lee, M.; Kubih, C.M.; Polhamus, C.D. et al. Preliminary experience with endoscopic intralesional steroid injection therapy for refractory upper gastrointestinal strictures. *Gastrointest Endosc*. v.41(6), p.598-601, 1995.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.

Li J, Shan F, Xiong G, Wang JM, Wang WL, Xu X and Bai Y: Transcriptional regulation of miR-146b by C/EBP $\beta$  LAP2 in esophageal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 446:267–271. 2014.

Li JZ, Gao W, Lei WB, Zhao J, Chan JY, Wei WI, Ho WK, Wong TS. MicroRNA 744-3p promotes MMP-9-mediated metastasis by simultaneously suppressing PDCD4 and PTEN in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7(36):58218-58233.

Li JZ, Gao W, Lei WB, Zhao J, Chan JY, Wei WI, Ho WK, Wong TS. MicroRNA 744-3p promotes MMP-9-mediated metastasis by simultaneously suppressing PDCD4 and PTEN in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7(36):58218-58233.

Li S, Qin X, Li Y, et al. MiR-133a suppresses the migration and invasion of esophageal cancer cells by targeting the EMT regulator SOX4. *Am J Transl Res*. 2015; 7 (8): 1390-403.

Lin G, Sun XJ, Han QB, et al. Epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene amplification are associated with aggressive biological behaviors of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2015; 10(2): 901–906.

Liu F, Tian T, Xia L et al. Circulating miRNAs as novel potential biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma diagnosis: a meta-analysis update. *Diseases of the Esophagus* 2016; 00:1-9.

Liu R, Yang M, Meng Y, et al. Tumor-suppressive function of miR-139-5-p in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013; 8 (10): e77068.

Liu SG, Qin XG, Zhao BS, et al. Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue. *Oncology Letters* 2013; 5: 1639-42.

Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8.

Ma J, Zhan Y, Xu Z, Li Y, Luo A, Ding F, et al. ZEB1 induced miR-99b/let-7e/miR-125a cluster promotes invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2017;398:37-45.

Mamede RCM, Melo Filho FV. Ingestion of caustic substances and its complications. *Sao Paulo Med J/Rev Paul Med* 2001; 119:10-15

Mamede, R. C. M; Mello F. F. V. Incidência e Diagnóstico da Ingestão de Cáustico. *Rev. Brasileira de Otorrinolaringologia*.v. 66. Parte 1, p. 208-213, 2000.

Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos GL, et al. Accurate microrna target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics* 2009;10:295.

Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, et al. Elucidating microrna functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* 2009;37:W273-276.

Matsushima K, Isomoto H, Yamaguchi N, et al. MiRNA-205 modulates cellular invasion e migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous carcinoma cells. *J Transl Med*. 2011; 9:30.

Ni Y, Meng L, Wang L, et al. Micro-RNA 143 functions as a tumor supressor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Gene*. 2013; 517: 197-204.

Noh SY, et al. Corrosive-Induced Carcinoma of Esophagus: Esophagographic and CT

Findings. *AJR* 2017; 208:1–7

Ogawa R, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al. Expression profiling of micro-RNAs in human esophageal squamous cell carcinoma using RT-PCR. *Med Mol Morphol.* 42: 102-109. 2009.

Okonta KE, Tettey M, Abubakar U. In patients with corrosive oesophageal stricture for surgery, is oesophagectomy rather than bypass necessary to reduce the risk of oesophageal malignancy? *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 15 (2012) 713–715

Okumura T, Kojima H, Miwa T, et al. The expression of microRNA 574-3p as a predictor of postoperative outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology* 2016; 14:228.

Olotoye, O.O.; Shulman, R.J.; Cotton, R.T. Mitomycin C in the management of pediatric caustic esophageal strictures: a case report. *J Pediatr Surg.* v.41(5), p.e1-3, 2006.

Othman N, Kendrick D. Epidemiology of burn injuries in the East Mediterranean region: a systematic review. *BMC Public Health.* 2010; 10:83

Pan F, Mao H, Bu F, et al. Sp1-mediated transcriptional activation of miR-205 promotes radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(4):5735-5752.

Poddar, U.; Thapa, B.R. Benign esophageal strictures in infants and children: results of Savary-Gilliard bougie dilation in 107 indian children. *Gastrointest Endosc.* v.4, p. 480-484, 2001.

Riffat F, Cheng A. Pediatric caustic ingestion: 50 consecutive cases and review of the literature. *Diseases of the Esophagus* 2009; 22: 89-94.

Rosseneu, S.; Afzal, N.; Yerushalmi, B.; Ibarguen-Secchia, E., et al. Topical application of mitomycin C in oesophageal strictures. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* v.44, p.336-341, 2007.

Ruol A, Rampado S, Parenti A, et al. Caustic ingestion and oesophageal cancer: intra- and peri-tumoral fibrosis is associated with a better prognosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010; 38: 659-664

Sakai NS, Samia-Aly E, Barbera M, Fitzgerald RC. A review of the current understanding and clinical utility of miRNAs in esophageal cancer. *Seminars in Cancer Biology.* 2013; 23: 512-521.

Sánchez-Ramírez CA, Larrosa-Haro A, Vásquez-Garibay EM, Macías-Rosales R. Socio-demographic factors associated with caustic substance ingestion in children and adolescents. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2012; 76: 253-256.

Sha Z, Zhu X, Li N, Li Y, Li D. Proto-oncogenic miR-744 is upregulated by transcription factor c-Jun via a promoter activation mechanism. *Oncotarget.* 2016; 7(40):64977-64986.

Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I: Navigating the microne--using multiple microrna prediction databases to identify signalling pathway-associated micrnas. *PLoS One* 2011;6:e17429.

Song JH, Meltzer SJ. MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis and treatment of gastroesophageal cancers. *Gastroenterology* 2012; 143:35-47.

Tao K, Yang J, Goo Z, Hu Y, Sheng H, Gao H, Yu H. Prognostic value of miR-221-3p, miR-342-3p and miR-491-5p expression in colon cancer. *Am J Transl Res.* 2014; 6(4): 391–401

Uygun I. Caustic oesophagitis in children: prevalence, the corrosive agentes involved, and management from primary care through to surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2015; 23:423-432.

Wang TY, Liu SG, Zhao BS, Qi B, Qin XG and Yao WJ: Implications of microRNA-197 downregulated expression in esophageal cancer with poor prognosis. *Genet Mol Res.* 13:5574–5581. 2014.

Wang Y, Xin H, Han Z, Sun H, Gao N, Yu H. MicroRNA-374a promotes esophageal cancer cell proliferation via Axin2 suppression. *Oncol Rep.* 2015; 34(4):1988-94

Wu C, Wang C, Xiaocui G, et al. Diagnostic and Prognostic Implications of a Serum miRNA Panel in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE.* 2014; 9(3): e92292.

Wu QY, Wang Y, Tong JC, Zhang M, Zhang K. Expression and clinical significance of Tiam1 gene in esophageal carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(11): 21229–21234.

Xie X, Liu H, Wang M, Ding F, Xiao H, Hu F, et al. miR-342-3p targets RAP2B to suppress proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Tumour Biol.* 2015; 36(7):5031-8

Xishan Z, Ziyang L, Jing D, Gang L. Micro-RNA-320a acts as tumor suppressor by targeting BCR/ABL oncogene in chronic myeloid leukemia. *Sci Rep.* 2015; 5:12460.

Xu X, Wang W, Su N, Zhu X, Yao J, Gao W, Hu Z, Sun Y. miR-374a promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting SRCIN1 in gastric cancer. *FEBS Lett.* 2015; 589(3):407-13

Yan LX, Huang XF, Shao Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 2008; 14: 2348-60.

Yang M, Liu R, Sheng J, et al. Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Once Rep.* 2013; 29(1):169-76.

Yang Q, Luz GY, Li Y, et al. Expression of Rac-1 related to tumor depth, lymph node metastasis and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 2013 Dec;30(4):689.

Yeming, W.; Somme, S.; Chenren, S.; Huiming, J. , et al. Balloon catheter dilatation in children with congenital and acquired esophageal anomalies. *J Pediatr Surg*. v.37, p. 398-402, 2002.

Yu SL, Chen HY, Chang GC, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 48-57.

Zargar AS, Kochhar R, Nagi B, et al. Ingestion of Corrosive Acids. *Gastroenterol* 1989; 97: 702-7.

Zargar SA, Kochhar R, Metha S, Metha SK: The role of fiberoptic endoscopy in the management of corrosive ingestion and modified endoscopic classification of burns. *Gastrointest Endosc*. 1991, 37 (2): 165-9.

Zhang J; Cheng C; Yuan X; He J; Pan Q; Sun F. micro-RNA-155 acts as an oncogene by targeting the tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. Clin. Exp. Pathol* 2014; 7(2):602-610.

Zhang M, Yang Q, Zhang L, Zhou S, Ye W, Yao Q, Li Z, Huang C, Wen Q and Wang J: miR-302b is a potential molecular marker of esophageal squamous cell carcinoma and functions as a tumor suppressor by targeting ErbB4. *J Exp Clin Cancer Res*. 33:102014.

Zhang N, Fu H, Song L, Ding Y, Wang X, Zhao C and Zhao Y, Jiao F and Zhao Y: MicroRNA-100 promotes migration and invasion through mammalian target of rapamycin in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 32:1409–1418. 2014.

Zhang X, Wang M, Han H, et al Corrosive Induced Carcinoma of Esophagus After 58 Years. *Ann Thorac Surg* 2012;94:2103–5

Zhao L, Liu Y, Sun X, He M, Ding Y. Over- expression of T lymphoma invasion and metas- tasis 1 predict renal cell carcinoma metastasis and overall patient survival. J Cancer Res Clin Oncol 2011; 137: 393-8.

Zhao L, Zhang Y. miR-342-3p affects hepatocellular carcinoma cell proliferation via regulating NF- $\kappa$ B pathway. Biochem Biophys Res Commun\_ 2015;457(3):370-7.