



**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 All™ 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 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 β	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
H&E	<i>Hematoxilina & 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 _m	RNA mensageiro
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NF- κ B	<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 catalytic subunit alpha</i> 3-kinase
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 <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>
Δt	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, segundo Zargar et al (1989).....	36
--	----

1. Introdução

Lesões esofágicas corrosivas permanecem como um sério problema de saúde pública na população pediátrica. Próximo de 80% das injúrias cáusticas documentadas ocorrem em crianças, e destas pelo menos 85% são acidentais. Dados de 2009 mostram que mais de 125.000 episódios de ingestão de produtos destinados à limpeza doméstica ocorreram em crianças menores de 6 anos nos Estados Unidos, com a maioria dos casos sendo na faixa etária entre 12 a 48 meses de idade (Kay & Wyllie, 2009).

Em recente revisão sistemática conduzida por Othman & Kendrick (2010) avaliando 71 estudos oriundos de 12 países da área mediterrânea oriental, as lesões por cáusticos constituíram uma das principais causas externas de mortalidade, com uma incidência de 112 a 518 injúrias por 100.000 pessoas / ano. Altas incidências como estas encontradas por estes autores são particularmente evidentes em áreas onde as substâncias corrosivas são disponíveis em recipientes que não são à prova de crianças ou obtidas de recipientes maiores de uso domiciliar. Isto demonstra a grande necessidade de prevenção com medidas educativas e de legislação apropriada (Millar & Cox, 2014).

Vários agentes químicos causam lesões na mucosa do trato digestivo, com destaque para dois grandes grupos: álcalis (hidróxido de sódio ou soda cáustica e hidróxido de potássio) e ácidos (clorídrico, sulfídrico, nítrico, fosfórico e acético). Os primeiros são responsáveis por 90% das lesões esofágicas, sendo o restante das lesões atribuídas aos ácidos (Contini & Scarpignato, 2013). Dentre os produtos ingeridos, o mais comum é a soda cáustica (ou Hidróxido de sódio – NaOH), um álcali componente fundamental da maioria dos detergentes industriais e muito utilizado para a fabricação caseira de sabão, que apesar de não ser absorvido na corrente sanguínea, gera efeitos ou complicações sistêmicas decorrentes de sua ação direta nos tecidos com os quais tem contato (Kurowski & Kay, 2017; Millar & Cox, 2014).

Justamente por não ser absorvido, o álcali é capaz de provocar danos de maior extensão na mucosa do trato gastrointestinal do que os ácidos. Além disso, os álcalis ainda provocam destruição devido à liberação de grande quantidade de calor proveniente de reações químicas exotérmicas que ocorrem quando tais substâncias entram em contato com o material intracelular. Os danos teciduais são produzidos por necrose de liquefação através da saponificação das gorduras e solubilização das proteínas permitindo a sua penetração profunda nos tecidos (Kurowski & Kay, 2017; Contini & Scarpignato, 2013).

No processo fisiopatológico da ação do NaOH sobre os tecidos, há uma relação direta entre o tempo de exposição, a concentração do agente e o seu pH. Outros fatores incluem o tipo de agente agressor, a apresentação (sólida ou líquida), o volume de ingestão e a viscosidade do agente alcalino (Ellenhorn, 1997). Quantidades menores, em concentrações mais baixas, resultam em menor lesão da mucosa (Rothstein, 1986; Dantas & Mamede, 1996). Contudo, ingestões de pequena monta em altas concentrações, e especialmente de pH alcalino, usualmente cursam com dor intensa e vômitos ao entrar em contato com a mucosa oral, e podem ser suficientes para resultar em grande morbi-mortalidade (Kurowski & Kay, 2017; Contini & Scarpignato, 2013).

As complicações agudas e crônicas resultantes da ingestão cáustica podem ser devastadoras. Inicialmente durante as primeiras horas e dias após a exposição, o desenvolvimento de edema de vias aéreas e a perfuração gástrica ou esofágica são as preocupações mais emergentes (Millar & Cox, 2014; Kay & Wyllie, 2009). A longo prazo, pode ocorrer estenose esofágica ou gástrica, principalmente nas queimaduras circunferenciais, necessitando de procedimentos de dilatação endoscópica, e em alguns casos mais graves, esofagectomia com interposição colônica. Há ainda o risco aumentado para carcinoma de esôfago, a pior das complicações (Kurowski & Kay, 2017; Contini & Scarpignato, 2013; Mamede & Melo Filho, 2001).

A estenose de esôfago é uma complicação frequente da cicatrização após a lesão cáustica, ocorrendo em 7 a 15% dos pacientes, como consequência da substituição do tecido normal por tecido conjuntivo denso, que apresenta propriedades físicas diversas, provocando a disfunção do órgão. Oitenta por cento das estenoses tornam-se aparentes em 2 a 8 semanas após a ingestão, sendo que aquelas que se manifestam precocemente são geralmente mais intensas. (Millar & Cox, 2014; Contini & Scarpignato, 2013; Kay & Wyllie, 2009; Ferreira, 2003)

A dilatação endoscópica constitui-se no tratamento primário das estenoses cáusticas de esôfago. Contudo, estas lesões tendem a possuir características que dificultam o tratamento endoscópico por serem multissegmentares, rígidas, tortuosas, extensas e, assim, mais difíceis de dilatar endoscopicamente, sendo mais susceptíveis à perfuração esofágica, com maior taxa de recorrência e com menores índices de alta do tratamento endoscópico, se comparadas às estenoses de outras etiologias (Millar & Cox, 2014; Bicakci et al 2010; Cheng & Roffat 2009; Ferreira, 2003). Sabe-se ainda, que cada sessão de dilatação atenua a disfagia com a melhora do

calibre do esôfago, mas sem prevenir a re-estenose, pois com a ruptura do anel fibrótico forma-se uma área cruenta que tem seu processo de cicatrização baseado na síntese e deposição de nova proteína fibrosa (Millar & Cox, 2014; Contini & Scarpignato, 2013).

Múltiplas dilatações, além da associação com a lesão cáustica em si, aumentam o risco de cronicidade do processo inflamatório e irritação esofágica (Contini & Scarpignato, 2013). A associação entre inflamação crônica e estresse oxidativo é bem documentada na literatura. Uma vez que a manutenção da inflamação induz à persistência de estresse oxidativo, pode-se postular que a constância de espécies reativas de oxigênio neste local seria uma força motriz de danos a nível nuclear (Chou et al, 2008 ; Kaya et al, 2006). Uma explicação a nível molecular para este risco aumentado de dano ao DNA, seria que macrófagos sintetizam radicais livres de oxigênio que levam à lesão nuclear nas células epiteliais ao redor do foco do processo inflamatório e aumentam a produção de mediadores quimiotáticos, levando à proliferação celular e elevando o risco de mutações (Kaya et al, 2006).

Kaya et al (2006) através de amostras de sangue periférico, avaliou o dano ao DNA de crianças portadoras de estenoses cáusticas de esôfago em programas de dilatação endoscópica, observando que o estresse oxidativo sistêmico e alterações celulares a nível nuclear ocorrem nestes pacientes como resultado do dano tecidual e de múltiplas dilatações. Sugerem ainda a necessidade de estudos do dano molecular com análise do DNA de células esofágicas, pois embora a relação entre estresse oxidativo e dano ao DNA não esteja totalmente fundamentada, o dano oxidativo ao DNA nos pacientes portadores de estenose cáustica do esôfago pode desempenhar um papel no desenvolvimento do câncer de esôfago.

A incidência da neoplasia de esôfago entre os pacientes portadores de lesão por cáustico é significativamente maior que na população em geral (até 8% de todas as ingestões), apresentando risco 1000 a 3000 vezes maior para Carcinoma Espinocelular de Esôfago (CECE), se comparado a pacientes da mesma faixa etária (Kurowski & Kay, 2017; Pennachi et al, 2017; Millar & Cox, 2014; Ruol et al, 2010; Kay & Wyllie, 2009; Mamede & Melo Filho, 2001; Hopkins & Postlethwait, 1981; Appelqvist & Salmo, 1980). Entretanto, alguns autores advogam que este risco se encontra superestimado, uma vez que não são computados fatores de confusão como tabagismo e alcoolismo (Chirica et al, 2016). O período entre a ingestão e o diagnóstico de câncer pode variar de 1 a 71 anos, sendo mais comum entre 15 a 40

anos após o acidente (Kurowski & Kay, 2017).

Uma incidência fidedigna de quantos pacientes com lesão cáustica desenvolverão CECE não está disponível, pois não existem grandes séries de casos com seguimento maiores que 40 a 60 anos (Hopkins & Postlethwait, 1981). Além disso, a maioria dos artigos que avaliam esta casuística foram publicados há mais de 20 anos e não avaliam outros fatores de risco, incluindo tabagismo e esôfago de Barrett (Kurowski & Kay, 2017).

Tem sido observado na literatura que o grau de estenose do esôfago em si não se correlaciona diretamente ao desenvolvimento de câncer (Kochhar et al 2006). Teoricamente, alguns fatores poderiam levar a patogênese do carcinoma sob a luz da estenose esofágica cáustica severa: o esôfago queimado pelo agente cáustico é exposto a traumas frequentes induzidos por múltiplas dilatações endoscópicas, além de estase alimentar e refluxo gastro-esofágico (Issaivanan et al, 2012; Ruol et al, 2010; Mamede & Melo Filho, 2001; Hopkins & Postlethwait, 1981).

Muitos pacientes, após o tratamento inicial, mantem-se relativamente assintomáticos por vários anos e nenhum outro fator ou evento gatilho é discernível. Ainda assim, estes que não necessitam de dilatações também possuem risco importante de malignização, pois estes indivíduos geralmente perdem o seguimento, dificultando a estimativa destes dados. (Kochhar et al 2006; Hopkins & Postlethwait, 1981). Este grupo de pacientes sem estenose, que geralmente não fazem o acompanhamento adequado, são o de mais difícil diagnóstico de CECE precoce.

Devido ao risco considerável de CECE, alguns autores sugerem que a esofagectomia deve ser executada profilaticamente em todos os pacientes portadores de complicações tardias de lesões cáusticas esofágicas intensas (Zhang et al, 2012; Mamede & Melo Filho, 2001). Entretanto, a decisão da ressecção do esôfago estenosado permanece controversa. Aqueles a favor da ressecção advogam que a incidência de CECE cicatricial neste grupo de pacientes é relativamente alta, devendo ser considerado uma ressecção do esôfago doente como rotina para estes casos. Todavia, outros defendem que este não deve ser um procedimento de rotina, pois a incidência de degeneração maligna pode ser pequena se a estenose estiver completamente resolvida ou estacionada, diminuindo o risco de câncer (Zhang et al, 2012), pois a presença do tecido fibrótico ao redor do tumor oferece proteção contra metástases locais e sistêmicas (Ruol et al, 2010). Somado a isso, alguns trabalhos relatam que a cirurgia de *bypass* esofágico não previne o desenvolvimento de CECE

após ingestão cáustica (Kochhar et al 2006).

Durante o *bypass*, a ressecção do esôfago também permanece controversa, pois a inflamação do esôfago residual e aderências a estruturas adjacentes a longo prazo podem ser uma grande ameaça a pacientes que se submeterão a esofagectomia, resultando em maiores taxas de complicações cirúrgicas pós-operatórias. (Zhang et al, 2012)

Okonta et al (2012) realizaram uma revisão sistemática envolvendo 6 estudos, com um total de 50 pacientes que desenvolveram câncer após estenose cáustica, para avaliar se a esofagectomia, ao invés do *bypass*, é necessária para reduzir o risco de câncer nesta população. Observaram que os estudos concordavam em dois pontos cruciais: o carcinoma induzido por cáusticos pode ocorrer com uma incidência maior se parte ou todo o esôfago fosse deixado durante a reconstrução cirúrgica; e que a esofagectomia total simultânea à reconstrução em pacientes com estenose cáustica oferece melhor prognóstico. Com isto, concluem que a transformação neoplásica parece não poupar a porção macroscopicamente normal do esôfago, denotando a necessidade de esofagectomia sobre o *bypass*.

As taxas de sobrevida em 5 anos em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico com ressecção esofágica do CECE por estenose cáustica varia entre 25 a 33% (Mamede & Melo Filho, 2001; Appelqvist & Salmo, 1980). Se não tratado, nenhum paciente sobrevive por mais de um ano (Appelqvist & Salmo, 1980).

A vigilância endoscópica regular e periódica nesta população é controversa na literatura, sendo a Endoscopia Digestiva Alta para o rastreamento de lesões malignas (ou pré-malignas) nestes pacientes, recomendada em período superior a 20 anos após a ingestão. Biópsias seriadas para rastreamento de displasias são recomendadas para pacientes em seguimento por lesões cáusticas graves pela maioria dos autores, objetivando a tentativa de detecção precoce de mudanças pré-malignas, considerando a alta morbi-mortalidade destes pacientes (Kurowski & Kay, 2017; Pennachi et al, 2017; Chirica et al, 2016; Contini & Scarpignato, 2013; Kay & Wyllie, 2009).

Apesar dos programas de rastreamento endoscópico nesta população serem justificáveis, não existem recomendações formais para rastreamento endoscópico das displasias, incluindo momento de realização e sua periodicidade (Kurowski & Kay, 2017; Chirica et al, 2016). Outro fator a ser considerado, embora o diagnóstico precoce seja desejável, é a possibilidade de seguimento de cada paciente portador

de queimadura esofágica por cáustico por períodos superiores a 50 anos, considerando que a maioria dos pacientes faz parte de um grupo socioeconômico desfavorável, onde esta situação torna-se ainda menos provável (Hopkins & Postlethwait, 1981).

É importante ressaltar que os primeiros sintomas do CECE surgem tardiamente durante a progressão da doença e, portanto, o diagnóstico geralmente é realizado em estágios avançados o que leva a um tratamento ineficiente e por consequência mau prognóstico. O diagnóstico tardio do câncer de esôfago está ligado à sua fisiopatologia, pois a transformação neoplásica que ocorre na mucosa esofágica raramente é detectada nos estágios iniciais. Desta forma, um conhecimento abrangente desta biologia tumoral é de grande importância na identificação de novos biomarcadores (Costa et al, 2013). Até hoje nenhum estudo verificou a presença e magnitude do dano a nível genético-molecular em amostra de tecido esofágico obtido de pacientes portadores de estenose cáustica. O diagnóstico de tais lesões nucleares e seu devido seguimento, além do potencial terapêutico direcionado, poderia fornecer um marcador de diagnóstico precoce de neoplasia nestes pacientes.

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs pequenos de aproximadamente 19 a 25 nucleotídeos de comprimento, não codificadores de proteínas, mas que atuam na regulação de uma grande proporção de genes no genoma humano. Dados atuais da literatura evidenciam que os miRNAs estão envolvidos em diversos processos biológicos importantes, entre eles o desenvolvimento embrionário, a diferenciação celular, a morte celular programada por apoptose, a proliferação celular entre outros (Cummins & Velculescu, 2006; Harfe 2005; Bartel, 2004)

A biogênese dos miRNAs tem início com um transcrito primário longo de centenas de pares de base (pri-miRNA), o qual é sintetizado pela enzima RNA polimerase II, a partir do DNA genômico. No núcleo celular, a enzima Drosha (uma RNase III) cliva este pri-miRNA, formando um complexo de ~650KDa acoplado ao co-fator DGCR8 (Di George syndrome critical region 8). A ação desse complexo em uma molécula de pri-miRNA resulta em um miRNA precursor (pré-miRNA) em forma de grampo com ~70 a 100 nucleotídeos de comprimento. A proteína Exportina-5 exporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma, onde a enzima Dicer (RNase III), cliva a região do loop originando um RNA de fita dupla (dsRNA) de ~18-22 nucleotídeos, sendo a forma madura denominada miRNA. O miRNA maduro de fita simples é então incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA denominada RISC

(*RNA-Induced Silencing Complex*) (Yu et al, 2008; Iorio & Croce, 2012).

O miRNA maduro é capaz de regular a expressão gênica em nível pós-transcricional; essa atividade ocorre pela ligação, por pareamento complementar de bases, da extremidade 5' do miRNA à extremidade 3' não traduzida (3' UTR) do RNAm, levando, na maioria dos casos, à inibição da tradução do RNAm por homologia incompleta ou à degradação por homologia ou parcial de sequências, resultando, na maioria dos casos, na inibição da tradução ou na degradação do RNAm. (Iorio & Croce, 2012; Di Leva, et al 2006; Lu et al, 2005; Calin et al, 2005).

Por serem moléculas pequenas e estarem associadas a um complexo proteico (complexo RISC), os miRNAs são estáveis, e tem sua expressão tecido-específica, podendo ser detectados utilizando pequenas quantidades de RNA, tais como aquelas obtidas de materiais de biópsias. A expressão de miRNAs pode ser quantificada em amostras já disponíveis, e coletadas previamente, por exemplo, amostras de blocos de parafina e fluidos corporais, tais como o plasma ou soro (Iorio, 2009; Yan et al, 2008). Os avanços na descoberta dos miRNAs como reguladores da expressão gênica e seu papel na tumorigênese têm evidenciado os miRNAs como biomarcadores úteis no diagnóstico, prognóstico e como potenciais alvos terapêuticos no câncer.

A expressão alterada de miRNAs tem sido evidenciada em diversas patologias, sobretudo nas neoplasias. Na carcinogênese, eles podem atuar como supressores tumorais ou oncogenes em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de esôfago, alterando mecanismos moleculares de desenvolvimento e progressão tumoral. Alterações na expressão de miRNAs podem ocorrer devido a diferentes mecanismos, em nível genômico, tais como amplificações, deleções e mutações na sequência da molécula de miRNA, defeitos na maquinaria da biogênese de miRNAs ou modificações epigenéticas, tais como alterações no perfil de metilação e remodelação da cromatina (Iorio & Croce, 2012)

Trabalhos recentes evidenciam o envolvimento direto dos miRNAs na indução e desenvolvimento do câncer de esôfago, estando a sua expressão correlacionada ao diagnóstico, estadiamento, progressão e prognóstico desta neoplasia. (Harada et al, 2016; Liu et al, 2016; Wu et al, 2014; Sakai et al 2013; Song & Meltzer, 2012). Achados clínicos recentes indicaram que a regulação positiva do miR-146b foi associada a uma sobrevida ruim no CECE (Li et al, 2014). O miR-100 promoveu migração e invasão através de células-alvo no CECE (Zhang et al, 2014). Em contraste, o miR-197 teve

sua expressão diminuída em pacientes portadores de câncer de esôfago com mau prognóstico, o que pode representar o seu papel como um supressor tumoral (Whang et al, 2014). Além disso, o miR-302b inibiu a proliferação celular do CECE induzindo a apoptose e suprimindo a invasão (Zhang et al, 2014).

Embora a expressão desregulada de miRNAs tenha sido identificada em diversos tipos de tumores, o envolvimento dos miRNAs no processo de tumorigênese ainda precisa ser elucidado. Portanto, estudos para a identificação de perfis de expressão global de miRNAs, bem como caracterização funcional de miRNAs e genes-alvo e seu papel na iniciação e progressão de neoplasias, são necessários para o melhor entendimento da biologia tumoral.

Diante do exposto, considerando:

- a alta incidência de acidentes com ingestão de cáusticos na população pediátrica e seu relevante impacto na qualidade de vida de pacientes com pelo menos 50 anos ou mais de expectativa de vida;
- o fato de que a lesão cáustica é fator de risco estabelecido para carcinoma espinocelular de esôfago (CECE);
- que o dano molecular ocorre em fase antecipada à doença;
- a alta morbimortalidade do CECE, com o agravante deste tumor manifestar sintomas tardiamente, quando o tratamento torna-se apenas paliativo, com baixa sobrevida em 5 anos,
- os avanços na descoberta dos miRNAs como reguladores da expressão gênica e seu papel em diferentes patologias, sugerindo seu papel como biomarcadores robustos para o diagnóstico, prognóstico e potenciais alvos terapêuticos em doenças, particularmente em neoplasias;

Os objetivos deste trabalho foram:

- Primário: 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.
- Secundário: Caracterizar clinicamente a série de casos pediátricos atendidos pela equipe de Cirurgia e Endoscopia Pediátrica do Hospital

das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu após ingestão de cáusticos que evoluíram com estenose cáustica.

2. Metodologia

2.1. Casuística

2.1.1. Critérios de Inclusão

Estudo descritivo-analítico, do tipo série de casos, longitudinal, retrospectivo, unicêntrico, quantitativo, em pacientes menores de 15 anos, portadores de lesão esofágica induzida por cáusticos, submetidos a endoscopia digestiva alta com biópsia, ou esofagectomia, pela equipe de Cirurgia Pediátrica e Endoscopia Digestiva Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, estando ou não em seguimento com programa de dilatação esofágica, no período de junho de 2000 a junho de 2017.

2.1.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos pacientes que por qualquer motivo não foram realizadas biópsias endoscópicas esofágicas em nenhum momento de seu seguimento, ou não possuíam peça cirúrgica do esôfago.

2.1.3. Considerações sobre aspectos éticos

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu através da Plataforma Brasil sob o CAAE 44933115.9.0000.5411.

2.2. Suporte Financeiro

Este estudo recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) no valor de R\$ 45.000,00, concedido através do Edital MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 – Faixa B – até R\$ 60.000,00. Número do processo: 2014/458734-4.

A aluna do curso de Medicina Grazielle do Vale Pires foi contemplada com bolsa de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) para participação neste trabalho de 2015 a 2017. Número do processo: 2015/03287-4.

2.3. Delineamento

2.3.1. Características da série de casos

Através da revisão de prontuários médicos, foram coletados dados clínicos, sócio demográficos (gênero, idade), substância ingerida, necessidade de gastrostomia, tempo de estenose, tempo de seguimento, resultados dos exames de

imagem: esôfago contrastado e endoscopia digestiva alta (Quadro 1); necessidade e número de dilatações, complicações, necessidade de cirurgia, tempo de acompanhamento desde a ingestão, presença de sintomas atuais e resultados de exames anatomopatológicos.

Grau	Aspecto Endoscópico
0	Mucosa normal
1	Edema e eritema de mucosa
2A	Friabilidade, erosões, eritema severo, exsudato inflamatório, ou erosões superficiais
2B	Ulcerações profundas ou em toda circunferência esofágica
3A	Múltiplas ulcerações com áreas necróticas, de coloração marrom, acinzentada ou enegrecida
3B	Necrose extensa

Quadro 1 – Classificação endoscópica da lesão esofágica por cáusticos, segundo Zargar et al (1989).

2.3.2. Identificação e grupamento das amostras

Após o levantamento dos dados de prontuário foi realizada busca e coleta de todas as amostras esofágicas obtidas endoscópica e/ou cirurgicamente destes pacientes ao longo do período do estudo no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, e divididas em dois grupos de acordo com o tempo decorrido após a lesão, sendo o grupo A aqueles com menos de cinco anos de ingestão cáustica, e o grupo B os pacientes portadores de estenose há mais de 5 anos. Após, realizou-se comparação entre resultados de expressão dos microRNAs destas amostras com relação à biópsias esofágicas obtidas endoscopicamente em pacientes menores de 15 anos, atendidos por outras indicações pelo serviço de Cirurgia Pediátrica e Endoscopia Digestiva Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, sem alterações macroscópicas e microscópicas em todos segmentos estudados (esôfago, estômago e duodeno), pareados por gênero, idade e ano da biópsia, entre os anos de 2000 a 2017.

2.4. Análise Molecular

2.4.1. Método de extração de RNA

Para a extração de RNAs primeiramente foi realizada a escolha de áreas-alvo em cortes histológicos de tecido, corados em Hematoxilina & Eosina (H&E), por meio de análise por microscopia óptica. As áreas-alvo consistiam de segmentos das biópsias, ricos em células e com pouco estroma e fibrose. Nessas áreas, foram identificadas e distinguidas adequadamente as camadas mucosa, submucosa e muscular. Essas áreas-alvo selecionadas foram utilizadas como guia na etapa de microdissecção dos cortes de parafina contendo áreas dos tecidos de interesse. A Figura 1 é um exemplo representativo das amostras selecionadas para o estudo.



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

2.4.2. Microdissecção com agulha das amostras dos blocos de parafina

A microdissecção dos tecidos foi realizada em amostras de tecidos esofágicos epiteliais fixados em formalina e emblocados em parafina. Nessa etapa, utilizamos 5 lâminas de 10µm de espessura cada. As lâminas foram incubadas em Xilol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 10 min e após a incubação foram rapidamente transferidas para uma série de etanol, para desidratação e reidratação dos cortes de tecidos: Etanol 100% - 5 min, Etanol 95% - 5 min, Etanol 80% - 5 min, Etanol 70% - 5min. A seguir, as lâminas foram coradas em uma solução de hematoxilina diluída

(5:1) por 15 s, para identificação das áreas a serem microdissecadas. Nessa etapa, as lâminas foram incubadas em água ultrapura - MilliQ ddH₂O, até o momento da raspagem com agulha hipodérmica estéril medindo 1,60x40mm (Becton Dickinson, Curitiba, PR). As áreas correspondentes ao tecido esofágico lesado por cáusticos e ao tecido histologicamente normal foram removidas, separadamente, utilizando o estereomicroscópio Leica EZ4 (Leica Microsystems, China) para a visualização e raspagem dos tecidos. Os tecidos foram colocados em tubos eppendorf de 1,5 mL, livres de RNase e estéreis. A cada tubo foi adicionado 200 µL de tampão de digestão do kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (Ambion/Life Technologies, Austin, TX, EUA) para o início da extração do RNA total, conforme descrito abaixo.

2.4.3. Extração de RNA das amostras microdissecadas

A extração do RNA total foi realizada utilizando o Recover All Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA), segundo o protocolo do fabricante. A partir das amostras microdissecadas e acrescidas de 200 µL de tampão de digestão, foram adicionados 4µL de enzima protease a cada amostra, e incubadas por 2 h a 50°C, permitindo a lise do tecido e liberação do RNA, seguido de 15 min de incubação a 80°C para a inativação da protease. Após esta primeira incubação, foram adicionados 550µL de etanol absoluto e 240µL do reagente isolation additive (fornecido pelo kit) totalizando um volume de 790µL por amostra; essa etapa tem o objetivo de ajudar na separação dos ácidos nucléicos do restante dos componentes celulares. As próximas etapas consistiram na purificação do RNA através de colunas com filtros de sílica, onde o RNA total adere à sílica e os contaminantes são descartados no material filtrado. A purificação foi realizada em duas etapas, na primeira etapa adicionou-se 700µL da solução de lavagem Wash1 (fornecida pelo kit), seguida por centrifugação a 10.000 rpm e temperatura ambiente (TA) por 30 segundos. Desprezou-se o filtrado e na mesma coluna de purificação adicionou-se 500µL da solução de lavagem Wash2/3 (também incluída no kit). As amostras foram então novamente submetidas à centrifugação por 30 seg. a 10.000 rpm em TA. Para evitar a contaminação do RNA com DNA, foi realizado tratamento com DNase. Mix contendo 4µL da enzima DNase, 6µL do tampão 10X DNA buffer e 50µL de água livre de nuclease (nuclease-free) foi preparado. Todos estes reagentes fazem parte do kit de extração. Foram então adicionados a cada amostra, 60µL deste mix no centro da coluna, seguida de incubação por 30 min em TA. Após este tratamento foi realizada a

segunda etapa de lavagem, onde inicialmente adicionou-se 700µL da solução Wash1 seguida por centrifugação por 30seg. a 10.000 rpm em TA. Desprezou-se o filtrado e em seguida na mesma coluna de purificação, adicionou-se 500µL da solução Wash2/3. As amostras foram então novamente centrifugadas por 30 seg a 10.000 rpm em TA. Com o intuito de eliminar soluções de lavagem residuais nos filtros das colunas de purificação, nova centrifugação por 30 seg a 10.000 rpm em TA foi realizada. O filtro foi então transferido para um novo tubo coletor fornecido pelo kit para a eluição do RNA que foi realizada em duas etapas. Primeiro foram adicionados 10µL de água RNase-free no centro do filtro, incubado por 1 min em TA, seguido de centrifugação por 1 min a 14000 rpm em TA. Na segunda etapa foram adicionados 5µL de água estéril e livre de RNase (Sigma) no centro do filtro, incubado por 1 min em TA, seguida por centrifugação por 1 min a 14000 rpm em TA. O RNA total obtido foi então armazenado a -80°C.

2.4.4. Avaliação da quantidade e qualidade do RNA

A quantificação e a avaliação da qualidade/pureza das amostras de RNA total foi realizada no equipamento NanoDrop 8000 (ThermoScientific, EUA), o qual permite quantificar o RNA total contido em cada amostra, bem como verificando também se há contaminação por proteínas e/ou resíduos de solventes orgânicos.

2.4.5. Reação de Transcrição Reversa de miRNAs

A transcrição reversa de microRNAs foi realizada utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, EUA) combinado com o Megaplex™ RT Primers Pool A v2.1 (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa apenas dos miRNAs maduros inclusos no cartão Taqman Low Array Density Card A (Life Technologies, EUA). Na reação foram adicionados ao RNA total (600ng) os seguintes componentes do kit: Megaplex™ RT Primers (10X), dNTPs com dTTP (100mM), MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL), 10X RT Buffer, inibidor de RNase (RNase Inhibitor) (20U/µL). A mistura foi incubada nas seguintes condições: 40 ciclos de 16°C por 2 min., 42°C por 1 min. e 50°C por 1 s; seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 min. O produto da transcrição reversa foi armazenado no -20°C até o momento da utilização.

2.4.6. Análise da expressão de microRNAs

A análise de expressão global de miRNAs foi realizada utilizando a plataforma TaqMan Array Human MicroRNA Cards (TLDA) (card A, v3.0) (Life Technologies), um cartão de microfluidos contendo 384 miRNAs e otimizado para o uso com amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina (FFPE). A plataforma inclui três controles (miRNAs endógenos) para normalização dos dados, e um miRNA exógeno como controle negativo.

Para o preparo da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram utilizados: 450 µL de master mix Taqman® Universal Master Mix II, no UNG (Life Technologies); 6 µL de cDNA (produzido em etapa anterior) e 444 µL de água livre de nuclease (Sigma ddH₂O). Foram adicionados 100 µL desse mix em cada poço da placa; seguido por centrifugação da placa a 1.200 rpm por 1 min, duas vezes. A RT-qPCR foi realizada no equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies). Os dados de expressão de miRNAs foram analisados no programa Expression Suite (Life Technologies); que é componente do equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies). Os dados de expressão de miRNAs foram normalizados utilizando controles endógenos, os quais constituem controles internos que não devem variar significativamente em níveis de expressão nas amostras teste (cáustico) e controle normal. Os controles endógenos mais utilizados em análises de expressão de miRNAs e presentes no cartão TLDA são o RNU-44, RNU-48 e U6 (RNA nucleolar pequeno). A análise dos controles endógenos indica a qualidade das reações de amplificação. Assim, esta análise é fundamental e um dos primeiros passos a serem realizados em estudos de expressão de miRNAs.

2.5. Análise dos dados

2.5.1. Processamento dos dados de expressão

Os dados de expressão foram extraídos do equipamento QuantStudio™ 12K Flex, utilizando o programa *ExpressionSuite Software v1.0.3 for Microsoft® Windows®*, uma ferramenta de análise de dados que utiliza o método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$), esta plataforma permite quantificar a expressão gênica relativa através de um grande número de genes e amostras.

2.5.2. Análise Estatística e Construção da rede de interação proteica (*Protein-Protein Interaction Map* : PPI)

Aplicou-se a análise exploratória dos dados calculando-se as medidas-resumo e frequências absolutas e relativas das variáveis. O plano amostral adotado foi por conveniência não-probabilística, com base no fluxo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, em pacientes que apresentaram os critérios de inclusão do estudo no período de junho de 2000 a junho de 2017.

Algoritmos estatísticos utilizando One-Way ANOVA e clusterização hierárquica foram aplicados com o objetivo de identificar quais miRNAs apresentaram expressão significativamente desregulada em amostras de biópsia de pacientes com lesão cáustica do esôfago. A análise dos dados foi realizada para classificar os perfis de expressão de microRNAs nos pacientes comparado aos controles.

miRNAs significativamente desregulados ($FC \geq 1,5$ and $p < 0,05$) tanto no grupo A quanto no grupo B versus controles de tecidos esofágicos normais foram submetidos a análise de miRNA-alvos através da ferramenta microRNA Data Integration Portal (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) (Shirdel et al, 2011). A utilização do mirDIP é útil na análise global de RNAm-alvo, e consequentemente genes-alvos, de miRNAs, uma vez que realiza a integração entre diversas bases de dados públicas como DIANA-microT (Maragkakis et al, 2009), microRNA.org/miRanda (John et al, 2004; Betel et al, 2008), microCosm Targets (www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/), picTar (pictar.mdc-berlin.de/), PITA (genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html), RNA22 microRNA target detection (cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html) e TargetScan (Lewis et al, 2005; Grimson et al, 2007; Fireman et al, 2009). Foram buscadas interações miRNA-RNAm validadas experimentalmente, com genes envolvidos essencialmente em processos neoplásicos esofágicos.

Assim que determinada a rede de interação entre miRNA-RNAm através do banco de dados Interologous Interaction Database (I2D) (<http://ophid.utoronto.ca/i2d>, v.2.3) (Brown & Jurisica, 2005), os símbolos genéticos foram convertidos para UNIPROT IDs usando a ferramenta Bioconductor (www.bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/org.Hs.eg.db.html). A partir disto, utilizamos o software NAViGaTOR v.2.3.2 para confeccionar as redes de interação proteica (*Protein-Protein Interaction*: PPI) compreendendo os genes e seus vizinhos diretos como pontos e as PPI como arestas (Brown et al, 2009). A rede

resultante foi visualizada utilizando o NAViGaTOR 2.3.1.

3. Resultados

3.1. Análise da série de casos

Inicialmente foram selecionados 20 pacientes, sendo excluídos 5 por ausência de biopsias endoscópicas esofágicas ou de peça cirúrgica do esôfago em algum momento de seu seguimento. Analisou-se retrospectivamente 15 prontuários de pacientes atendidos pela equipe de Endoscopia Pediátrica do serviço de Cirurgia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu por estenose esofágica de origem cáustica que receberam assistência hospitalar entre os anos 2000 a 2017.

Dos pacientes analisados, 9 (60%) eram do sexo masculino e 6 (40%) do sexo feminino. Treze pacientes ingeriram acidentalmente o cáustico, com idades entre 1 e 3 anos, sendo que a maioria (60%) possuía entre 2 e 3 anos no momento do acidente. As duas únicas ingestões intencionais do nosso estudo ocorreram em pacientes maiores de 14 anos.

A forma de apresentação mais comum ingerida foi a soda cáustica *in natura*, diluída de forma caseira, ocorrendo em 12 casos (80%). O produto comercializado como “Diabo verde” que contém em sua composição hidróxido de sódio a 50%, utilizado para desentupir pias, e outros álcali de formulação comercial representaram 2 casos cada (13,33%). Encontramos apenas um caso (6,66%) de ingestão de substância ácida, relacionada a ingestão do produto comercializado como “Limpa Alumínio”, que contém ácido sulfônico e fluorídrico em sua composição.

Quatro pacientes foram atendidos precocemente, logo após a ingestão de cáusticos, com realização de endoscopias digestivas altas em até 48 horas após a ingestão, classificando as lesões de acordo com o proposto por Zargar et al (Quadro 1). Dois foram classificados como Zargar 3b, um como 2a e um como grau 1.

Quanto à necessidade de realização de via alimentar cirúrgica para estas crianças, 9 dos 15 casos necessitaram da realização de gastrostomia, denotando a gravidade dos casos atendidos. Quatro pacientes evoluíram com perfuração esofágica, e entre eles, 3 necessitaram de esofagectomia.

Nos esofagogramas contrastados (EEDs) analisados, todos realizados antes da primeira dilatação endoscópica, a região mais comumente afetada pela estenose foi o terço médio do esôfago, ocorrendo em 5 dos 15 pacientes. Terços proximal e distal foram acometidos igualmente, em 2 casos cada. Um não demonstrou estenose, 2 pacientes tiveram acometimento de toda a extensão do esôfago e 4 pacientes não

tinham o exame disponível no sistema. A frequência média de sessões de dilatação endoscópica nestas crianças foi de 7,7 sessões, variando de nenhuma a 30. Dos 15 pacientes avaliados, 4 não necessitaram deste procedimento em nenhum momento de seu seguimento clínico. A Tabela 1 resume os dados demográficos, achados do EED, necessidade e número de sessões de dilatação, e presença de complicações.

Paciente	Sexo	Idade a ingestão (meses)	Substância	Local da estenose (EED)
1	M	16	“Diabo Verde”	Terço médio
2	M	28	“Limpa Alumínio”	**
3	M	40	Soda cáustica	Terço médio e distal
4	F	36	Soda cáustica	Sem estenose
5	M	17	Sabão caseiro	Terço distal
6	F	28	Soda cáustica	**
7	F	13	Soda cáustica	Terço proximal
8	F	37	Soda cáustica	Terço médio
9	M	24	“Diabo Verde”	**
10	F	43	Soda cáustica	Terço proximal
11	F	180	Soda cáustica	Toda a extensão
12	M	20	Soda cáustica	**
13	M	25	Soda cáustica	Terço médio
14	M	172	Soda cáustica	Toda a extensão
15	M	31	Soda cáustica	Terço médio

Tabela 1: Resumo dos dados demográficos e clínicos dos pacientes do estudo. (Legenda: ** sem registro em prontuário)

O tempo médio de acompanhamento destes pacientes foi de 4,9 anos, variando de 6 meses a 14 anos. Dos pacientes avaliados em nossa casuística, 7 (46,6%) deles apresentavam-se assintomáticos no último registro em prontuário, enquanto 8 crianças (53,4%) relatavam queixas. O sintoma mais frequentemente registrado foi a disfagia (75%).

Identificaram-se 27 amostras de tecido esofágico dos pacientes selecionados

para este estudo no período de 2000 a 2017, e estão sumarizadas na Tabela 2. Neste pool de biópsias, 11 pacientes apresentaram esofagite em alguma de suas biópsias (73,33%), o que mostra o grau de inflamação crônica ao qual o tecido esofágico está submetido após a ingestão do cáustico.

Pct	Δt (anos)	Dilatação (n° de sessões)	Biópsia 1	Biópsia 2	Biópsia 3	Peça Cirúrgica
1	7	11	Esofagite	Normal	Esofagite	#
2	6	18	Esofagite	Infiltrado inflamatório	**	#
3	3	17	Esofagite	Esofagite	**	#
4	5	2	Esofagite	Acantose Glicogênica	**	#
5	10	30	Ulceração em mucosa e infiltrado inflamatório	**	**	Ulcerações até camada muscular, Esofagite
6	4	0	Esofagite	Esofagite	Esofagite+	#
7	13	9	Cicatriz fibrótica	Esofagite	Cicatriz fibrótica	Fibrose e neovascularização, Esofagite
8	2	0	Normal	**	**	#
9	3	0	Normal	**	**	#
10	14	3	Normal	Fibrose	Normal	#
11	1	4	**	**	**	Esofagite ulcerativa crônica fibrosante
12	3	0	Normal	**	**	#
13	1	7	Esofagite	**	**	#
14	1	1	Esofagite	**	**	#
15	2	14	Esofagite	**	**	#

Tabela 2: Tempo de seguimento, número de procedimentos de dilatação endoscópica e análise das biópsias dos pacientes incluídos no estudo

(Legendas: Pct: paciente; Δt : variação de tempo de seguimento; ** biópsia não realizada; #: cirurgia não realizada; +: este paciente realizou mais uma biópsia que também evidenciou esofagite no exame anatomopatológico)

3.2. Perfil de expressão global dos miRNAs

Para a análise do perfil de expressão dos miRNAs, as 27 amostras obtidas dos pacientes de nosso estudo foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo (GA) conteve tecidos de pacientes com tempo de ingestão inferior a cinco anos, enquanto o segundo grupo (GB) conteve aqueles com tempo de ingestão superior a cinco anos. Os grupos contaram com 15 e 12 amostras, respectivamente. Tal divisão visou identificar o impacto do tempo de ingestão na expressão dos miRNAs.

As análises foram realizadas para identificar os diferentes níveis de expressão dos miRNAs comparando os dois grupos descritos ao grupo controle saudável (Figura 2) baseadas nos valores de Cycle Thershold (CT), que é o ciclo da RT-qPCR em que a fluorescência atinge o limiar do gráfico de amplificação sendo então realizada a leitura de expressão do miRNA.

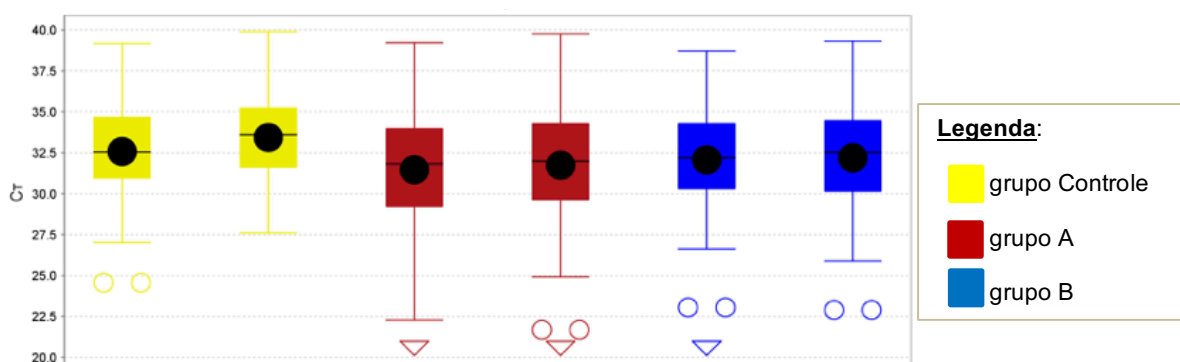


Figura 2: Distribuição dos miRNA entre os grupos analisados. Da esquerda para a direita: Dois quadros representativos das amostras do grupo controle, advindas do esôfago de crianças normais (macro e microscopicamente); dois quadros representativos das amostras do grupo de crianças com ingestão cáustica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

Legenda: Neste gráfico a caixa sólida representa o intervalo dos 50% médios dos valores de CT para o alvo ou a amostra. O círculo preto, dentro da caixa, mostra o valor médio de CT. As extremidades das linhas verticais (ou "bigodes") mostram os valores de CT máximo e mínimo, a menos que os outliers estejam presentes. Os círculos e triângulos são miRNAs outliers de acordo aos valores de CT. Os círculos tem menor valor e são denominados outliers suaves (valores de até 1,5 X região

interquartil), enquanto os triângulos possuem maior CT (valores de até 3,0 X região interquartil) e são classificados como outliers extremos.

Esta análise identificou no grupo com ingestão há menos de 5 anos, 13 microRNAs alterados estatisticamente relevantes (*Fold-Change*: FC) maior ou igual a 1,5 e $p < 0,05$), sendo que os microRNAs miR-29a-3p, miR-886-5p, miR-205-5p, miR-320a apresentaram-se aumentados em relação aos controles, enquanto os demais apresentaram-se diminuídos, conforme demonstram a Tabela 3 e Figura 3. Os valores de FC indicam o número de vezes no qual o miRNA está com expressão aumentada ou diminuída.

miRNA	Fold Change (FC)	logFC	p-value
hsa-miR-886-5p	11.148	4,05	0.016
hsa-miR-205-5p	10.599	4,03	0.024
hsa-miR-29a-3p	7.340	3,87	0.011
hsa-miR-320a	4.994	3,70	0.042
hsa-miR-145-5p	0,29	-0,54	0.01
hsa-miR-126-3p	0,28	-0,55	0.034
hsa-miR-143-3p	0,184	-0,74	0.003
hsa-miR-125a-5p	0,15	-0,82	0.006
hsa-miR-141-3p	0,081	-1,09	0.003
hsa-miR-133a-3p	0,058	-1,24	0.002
hsa-miR-103a-3p	0,034	-1,47	0.011
hsa-miR-139-5p	0,034	-1,47	0.016
hsa-miR-95-3p	0,026	-1,59	0.012

Tabela 3: miRNAs com expressão alterada evidenciados no Grupo A.

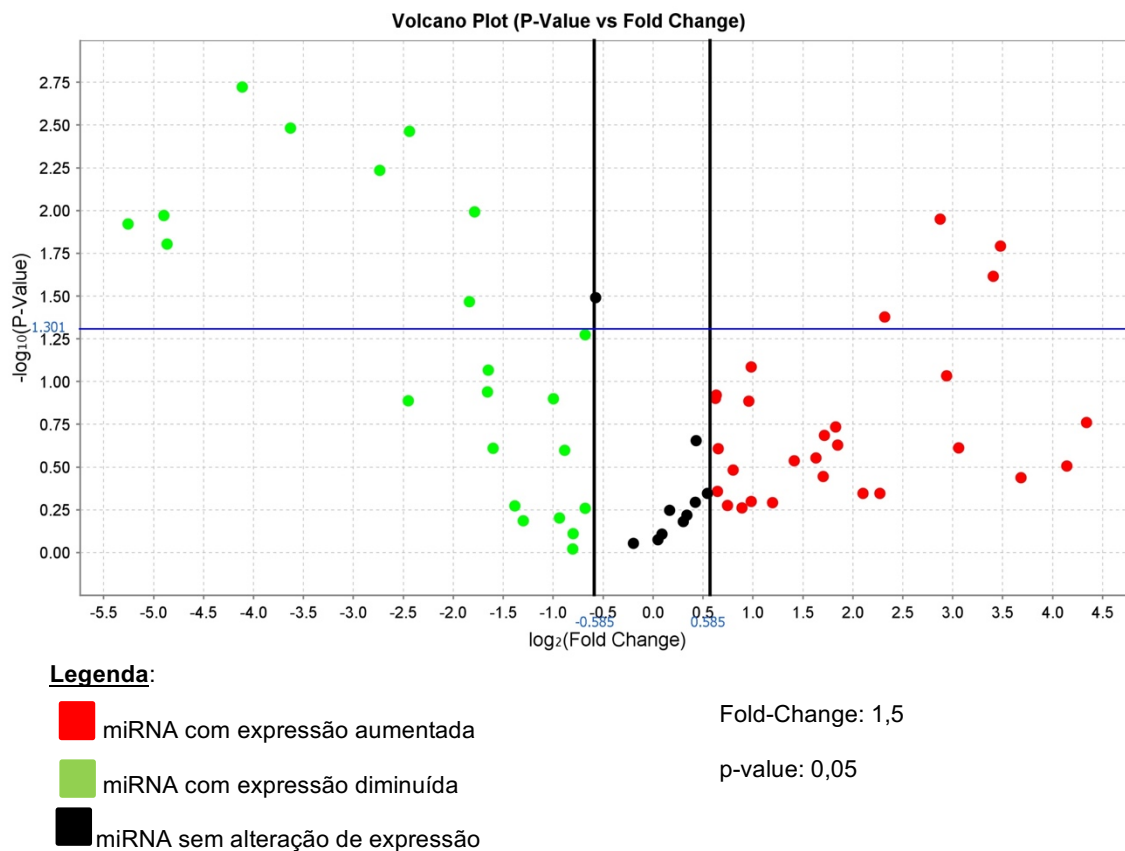


Figura 3: Gráfico de *Volcano-Plot* demonstrando o perfil de expressão dos microRNAs nos pacientes do Grupo A.

No grupo dos pacientes com ingestão de cáusticos há mais de 5 anos, foram encontrados apenas 4 microRNAs alterados estatisticamente relevantes (FC maior ou igual a 1,5 e $p < 0,05$), sendo que dois apresentaram-se aumentados (miR342-3p e miR-374-5p) e dois apresentaram-se diminuídos (miR-574-3 e mir-744-5p), conforme demonstram a Tabela 4 e Figura 4.

miRNA	Fold Change (FC)	logFC	p-value
hsa-miR-342-3p	2.272	3,36	0.043
hsa-miR-374b-5p	2.055	3,31	0.022
hsa-miR-574-3p	0,31	-0,51	0.019
hsa-miR-744-5p	0,18	-0,74	0.037

Tabela 4: microRNAs com expressão alterada nos pacientes do Grupo B

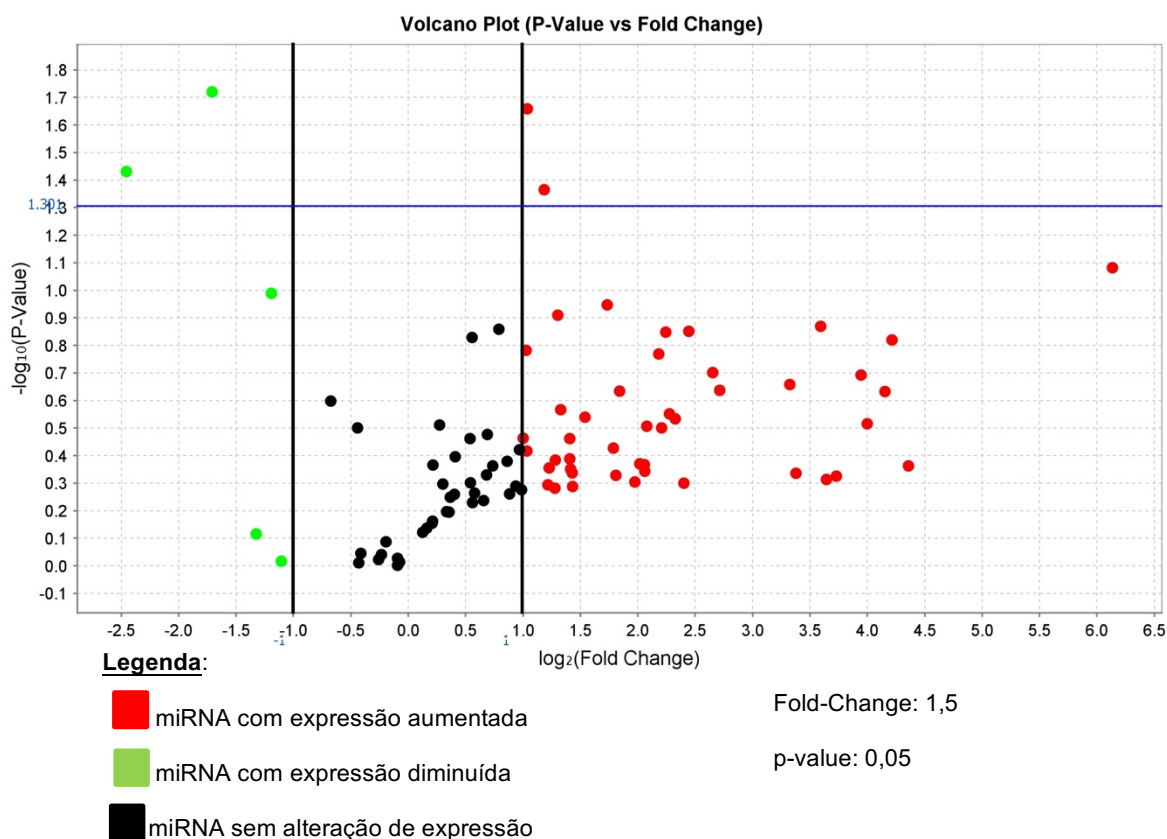


Figura 4: Gráfico de *Volcano-Plot* demonstrando o perfil de expressão dos microRNAs nos pacientes do Grupo B

A partir da expressão global dos miRNA expressos nesta série de casos, avaliando sua relação com os tumores esofágicos, associado ao período de tempo de seguimento estudados e consequentemente a maior probabilidade de transformação maligna de acordo a literatura, optou-se pela construção da rede de interação proteína-proteína para pesquisa de vias moleculares reguladas especificamente por estes miRNAs em tecidos esofágicos conforme descrito em nossa metodologia. Os resultados da identificação de alvos moleculares regulados por miRNAs são evidenciados nos fluxogramas descritos nas Figuras 5, 6, 9 e 12.

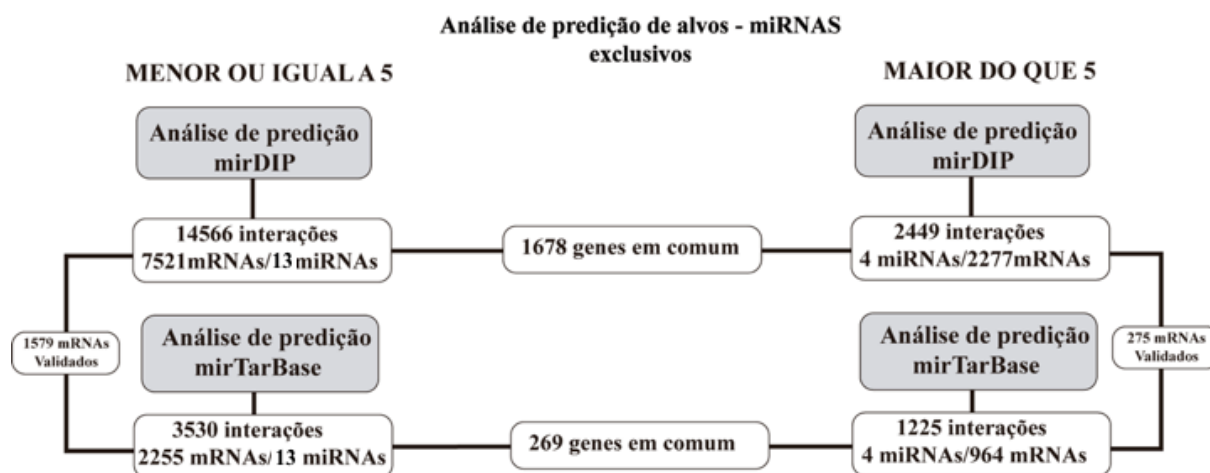


Figura 5: Análise de predição de alvos moleculares regulados pelos miRNAs expressos nos Grupos A (menos de 5 anos após ingestão) e B (mais de 5 anos) de acordo as ferramentas de bioinformática com identificação de 1579 genes ou RNAm validados no primeiro grupo e 275 genes no segundo.

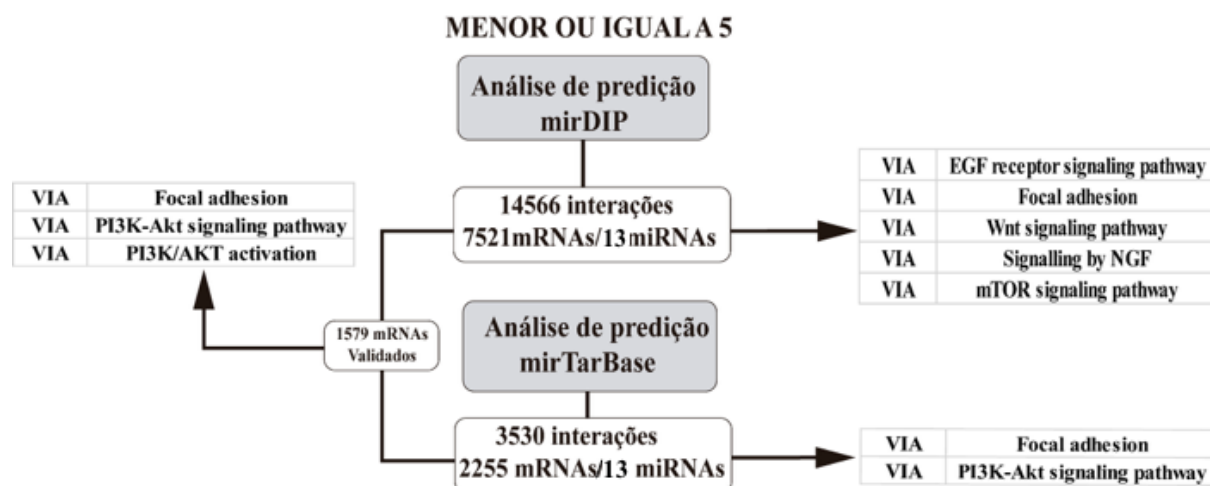


Figura 6: Identificação de vias moleculares reguladas pelos 13 miRNAs com expressão alterada no Grupo A determinadas após a análise de predição dos alvos. Três vias moleculares principais foram identificadas a partir dos 1579 genes validados em tecidos esofágicos: Adesão focal, via de sinalização e ativação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

Os mapas de interação proteica das vias envolvidas na tumorigênese esofágica de acordo com os alvos moleculares regulados por miRNAs, a partir das interações miRNA-RNAm validados, estão apresentados nas Figuras 7, 8, 10, 11 e 13. Com base nestas figuras podemos observar que a utilização de mapas de interação proteica fornecem informações necessárias para prever quais proteínas de um genoma interagem e a maneira que elas interagem. Sua importância está relacionada ao fato de que normalmente as proteínas não agem isoladamente na realização de funções, e sim, atuam formando complexos proteicos. Sua disposição gráfica em forma de rede, facilita a compreensão de suas funções biológicas e o contexto da proteína dentro da rede, o estabelecimento das interações associadas à uma doença ou via molecular específica e desta forma, a identificação de estruturas do mapa que se apresentem como possíveis alvos diagnósticos, prognósticos e eventualmente terapêuticos.

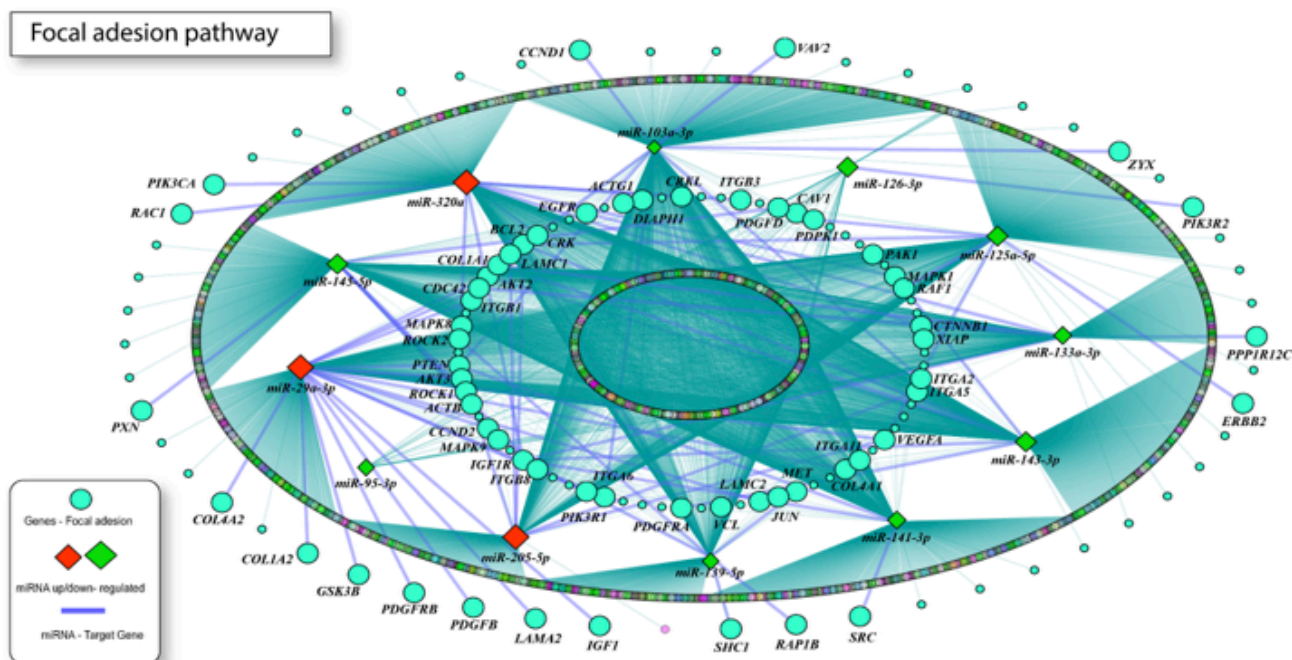


Figura 7: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados no grupo A e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização de adesão focal a partir das interações miRNA-RNAm validados.

Legenda: miRNA com expressão aumentada: losangos vermelhos; miRNA com expressão diminuída: losangos verdes; genes-alvo: círculos azuis claro; interação miRNA-gene alvo: linha reta.

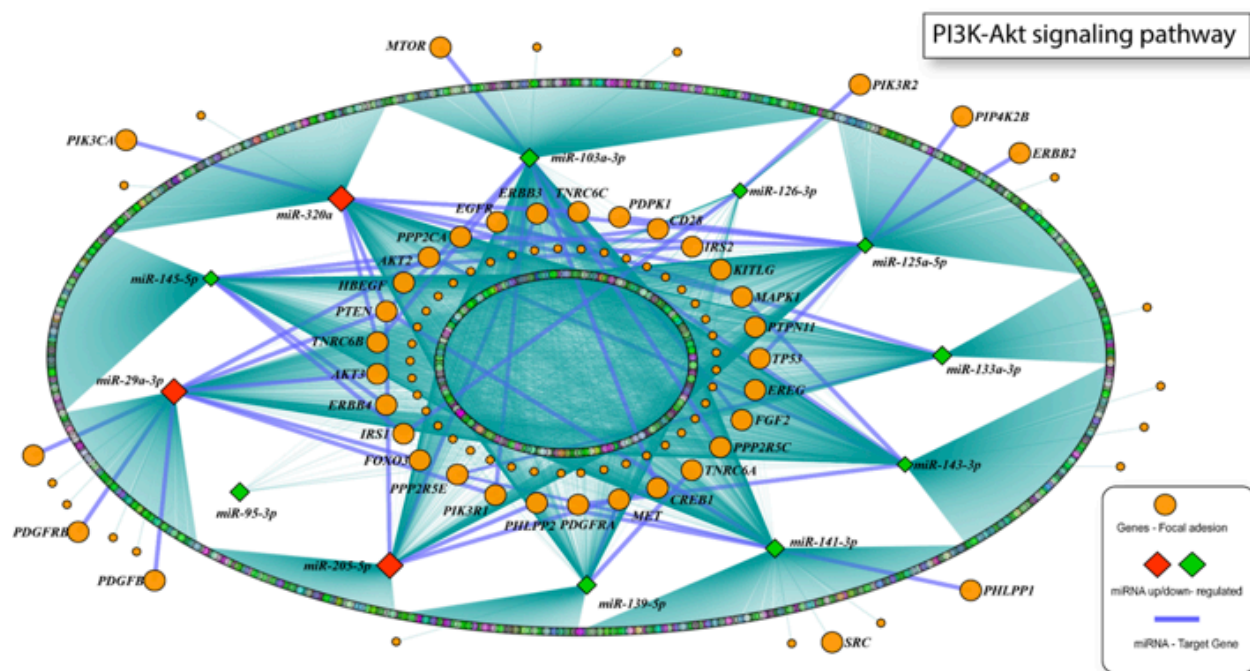


Figura 8: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados no grupo A e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização PI3K/AKT a partir das interações miRNA-RNAm validados.

Legenda: miRNA com expressão aumentada: losangos vermelhos; miRNA com expressão diminuída: losangos verdes; genes-alvo: círculos laranja; interação miRNA-gene alvo: linha reta.

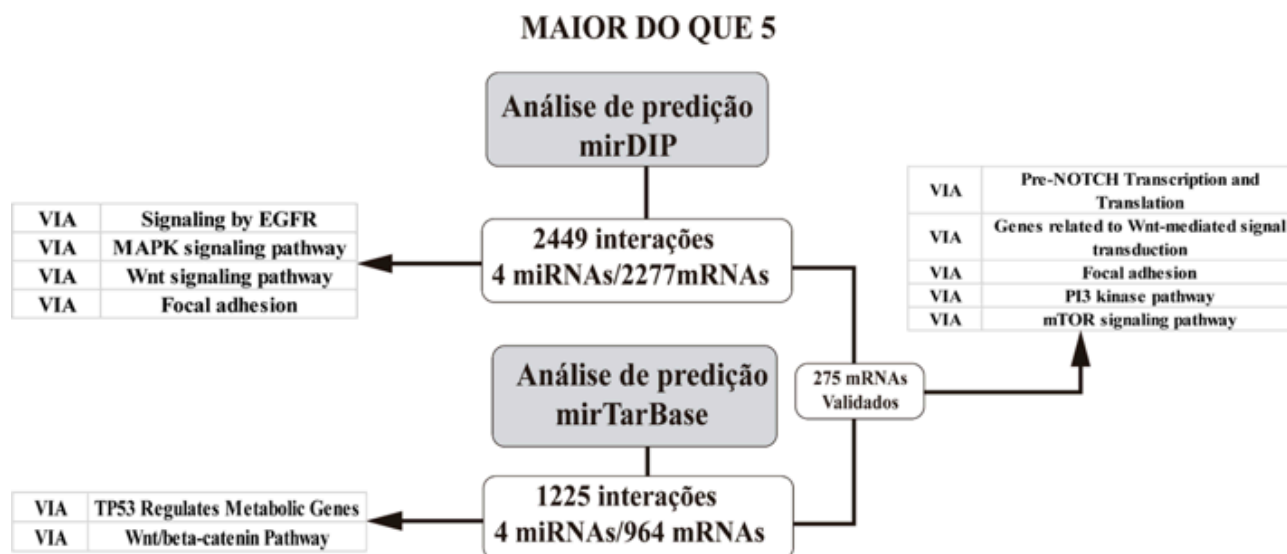


Figura 9: Identificação de vias moleculares reguladas pelos 4 miRNAs com expressão alterada no Grupo B, determinadas após a análise de predição dos alvos. Cinco vias moleculares principais foram identificadas a partir dos 275 genes validados em tecidos esofágicos: via de sinalização do mTOR, mecanismo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

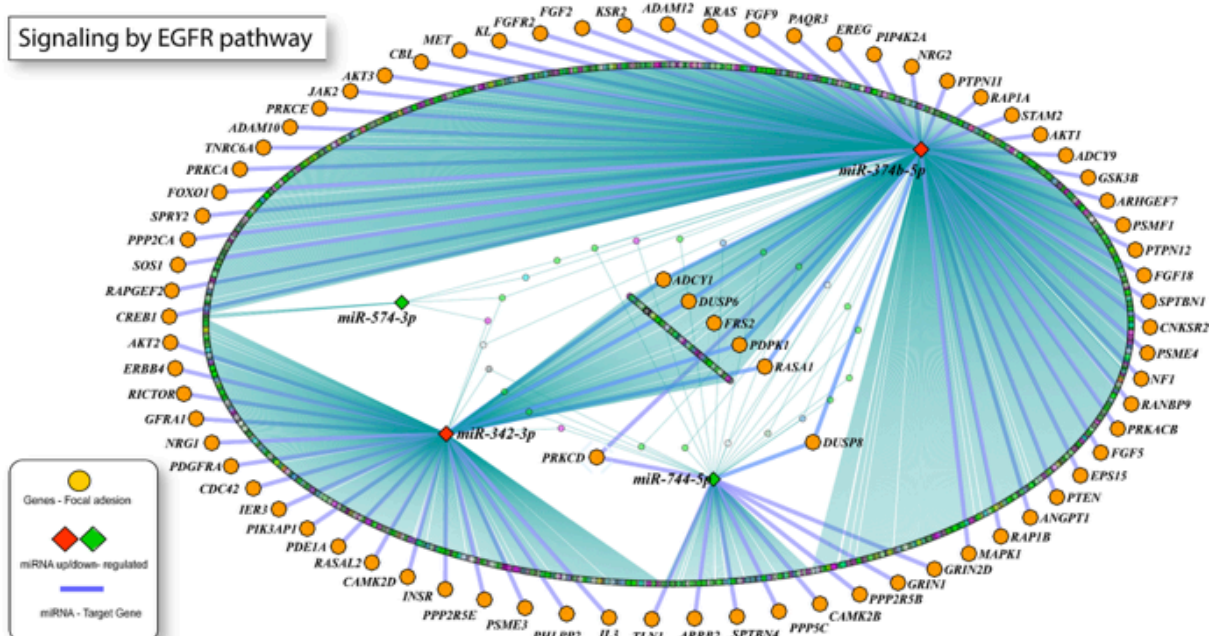


Figura 10: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados no grupo B e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização EGFR a partir das interações miRNA-RNAm validados.

Legenda: miRNA com expressão aumentada: losangos vermelhos; miRNA com expressão diminuída: losangos verdes; genes-alvo: círculos laranja; interação miRNA-gene alvo: linha reta.

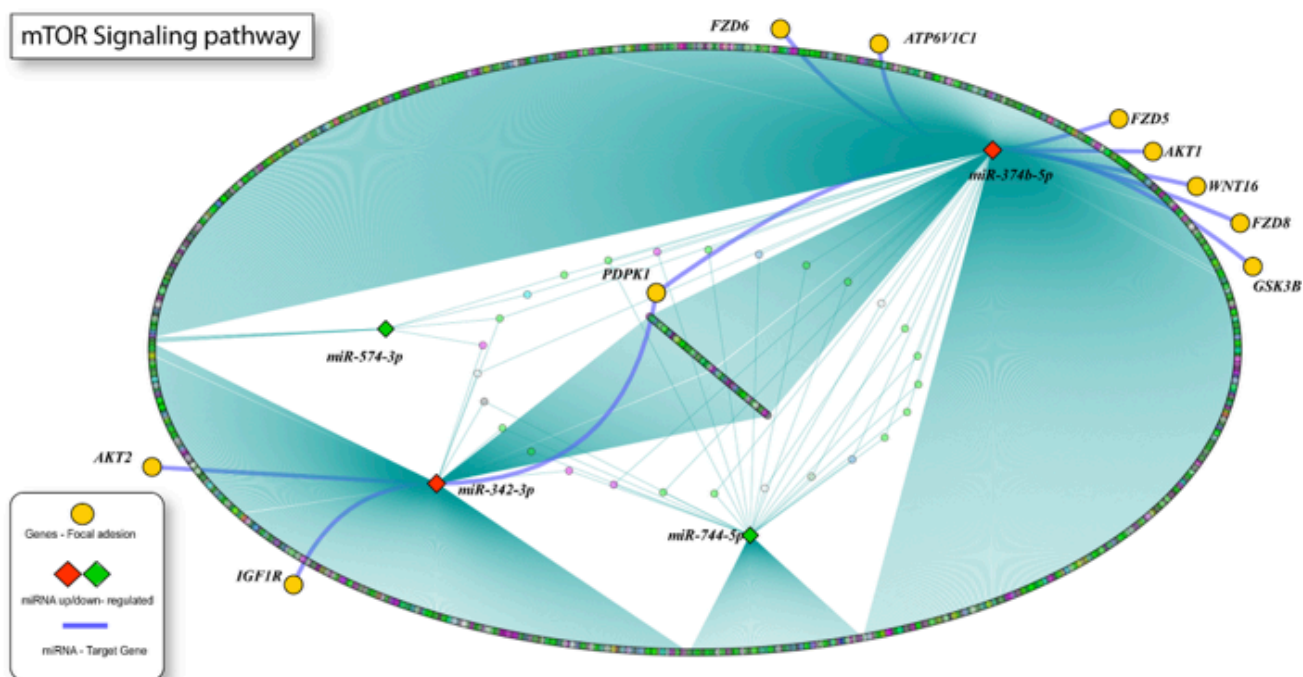


Figura 11: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados no grupo B e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização do mTOR a partir das interações miRNA-RNAm validados.

Legenda: miRNA com expressão aumentada: losangos vermelhos; miRNA com expressão diminuída: losangos verdes; genes-alvo: círculos amarelos; interação miRNA-gene alvo: linha reta.

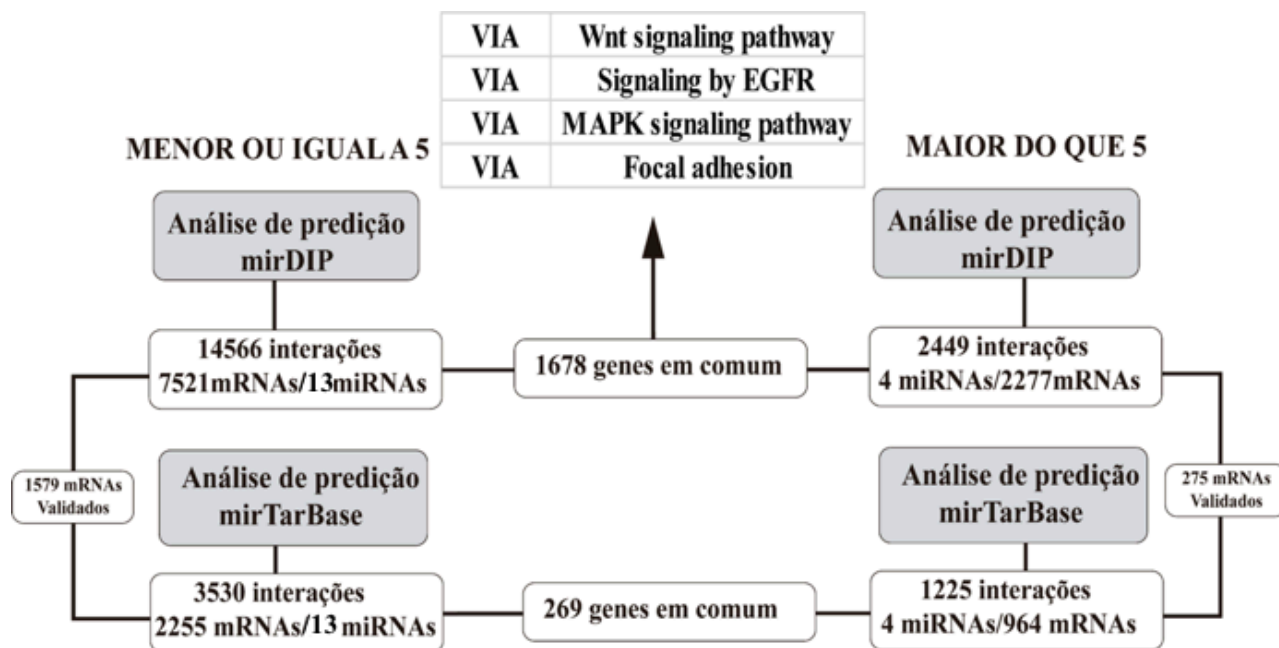


Figura 12: Identificação de vias moleculares reguladas em comum pelos 17 miRNAs com expressão alterada nos grupos A e B, determinadas após a análise de predição dos alvos. Quatro vias moleculares principais foram identificadas a partir dos 1678 genes validados em tecidos esofágicos: adesão focal, via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

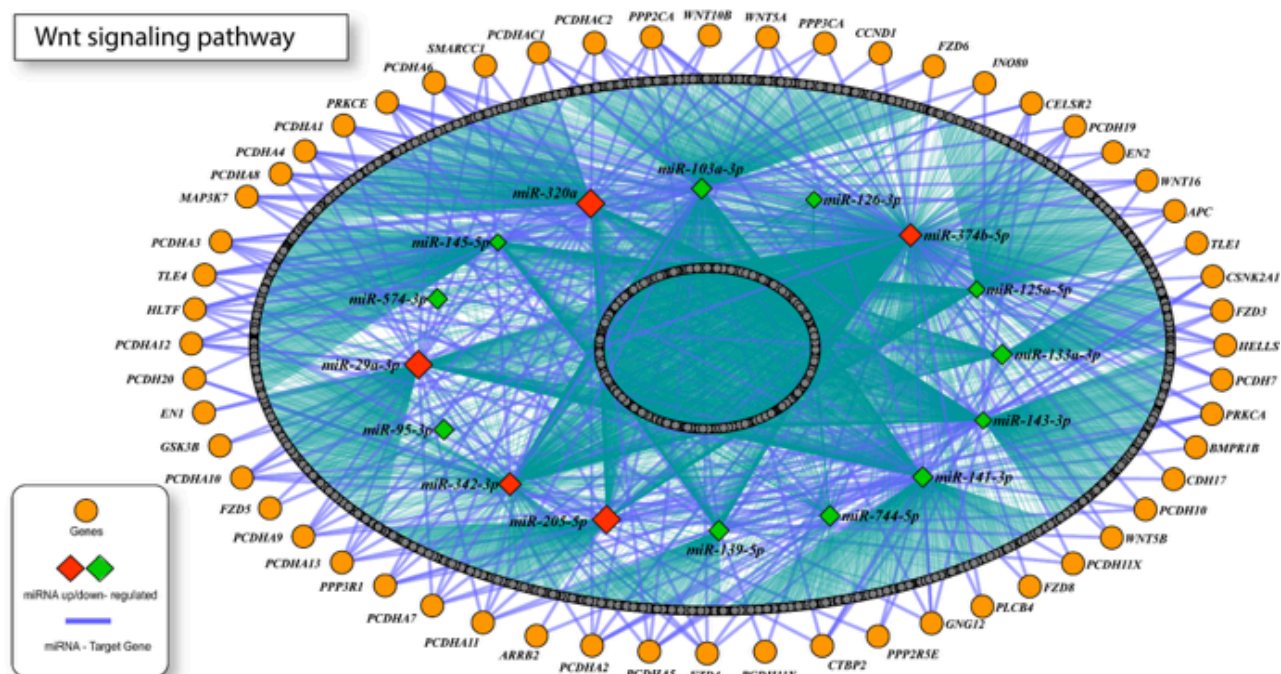


Figura 13: Representação gráfica do mapa de interação proteica entre os miRNAs alterados nos grupos A e B e os genes-alvo envolvidos na regulação da via de sinalização via de sinalização do Wnt a partir das interações miRNA-RNAm validados.

Legenda - miRNA com expressão aumentada: losangos vermelhos; miRNA com expressão diminuída: losangos verdes; genes-alvo: círculos laranja; interação miRNA-gene alvo: linha reta.

4. Discussão

A ingestão de substâncias corrosivas continua a ser um problema de saúde pública importante em países ocidentais, mesmo com a educação da população e regulação da legislação em alguns países, que limita a intensidade e a disponibilidade de substâncias cáusticas. Apesar dos esforços para reduzir sua ocorrência, estas lesões continuam a aumentar nos países em desenvolvimento, persistindo como uma das principais causas de disfunção esofágica na população pediátrica, e estão relacionadas com as variáveis socioeconômicas e educacionais e, principalmente, à falta de prevenção de tais acidentes (Kurowski & Kay, 2017; Chirica et al, 2016; Millar & Cox, 2014; Contini & Scarpignato, 2013; Othman & Kendrick, 2010; Kay & Wyllie, 2009).

A estenose cáustica do esôfago é a complicação tardia mais comum encontrada nestes pacientes, ocorrendo em 7 a 15% dos casos (Kurowski & Kay, 2017; Millar & Cox, 2014; Contini & Scarpignato, 2013). No serviço de Cirurgia Pediátrica e Endoscopia Digestiva Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 2000 a 2017 foram atendidos e acompanhados clinicamente 20 pacientes, contudo, dados os critérios de inclusão do estudo, 15 pacientes foram analisados.

Com relação ao gênero, diversos autores relatam uma frequência maior entre meninos, variando de 57 a 64% (Kurowski & Kay, 2017; Uygun 2015; Sánchez-Ramírez et al 2012). Em concordância a estudos publicados, observamos que crianças do sexo masculino representaram 60% dos casos. Esta incidência pode ser explicada por uma condição biológica relacionada ao sexo que os difere do comportamento de meninas em termos de expressão e interação com fatores de risco, tornando-os mais destemidos e exploradores, gerando maior acesso aos cáusticos e consequentemente aumentando a sua exposição (Sánchez-Ramírez et al 2012).

A incidência da ingestão é bimodal, com aproximadamente 80% de lactentes e pré-escolares e o restante de adolescentes e adultos jovens até os 30 anos de idade. Estudos recentes têm demonstrado que o maior grupo de risco para ingestão acidental são menores que 5 anos, com pico de incidência por volta de 2 anos (Chirica et al, 2016; Millar & Cox, 2014). Botwe et al. (2015) analisaram fluoroscopicamente o esôfago de 57 crianças africanas com suspeita de estenose cáustica, e observaram que 56,1% (32) delas eram menores que 3 anos de idade. Nossa casuística variou de

1 a 15 anos, com uma média de 45 meses de idade, com 86,6% (13) dos pacientes menores que 3 anos. Apesar de após os 2 anos a criança desenvolver habilidades de localização e possuir melhor coordenação motora, ainda não são capazes de discernir adequadamente situações de perigo, predispondo a um maior risco de ingestão, justificando nosso achado em consonância a outros estudos.

Em países desenvolvidos a incidência de lesões cáusticas tem caído devido a esforços relacionados a alterações legislativas e no investimento na prevenção de acidentes. Infelizmente esta não é nossa realidade, nem de outros países em desenvolvimento. Estudos conduzidos na África do Sul e Nigéria evidenciaram que o agente químico esteve disponível e de fácil acesso às crianças acometidas por lesões esofágicas, justificado pela ausência de controle na venda e consumo destas substâncias (Botwe et al, 2015). O tipo de ingestão predominante observado neste trabalho foi a acidental em 13 crianças (86,6%). Este dado é importante, pois a ausência ou a regulação ineficaz de substâncias potencialmente prejudiciais torna o ambiente inseguro, constituindo um risco substancial a crianças e adultos, denotando a importância de investimento em políticas públicas de prevenção e controle destas substâncias.

A maioria dos casos na infância são acidentais, ao contrário de adultos jovens e adolescentes quando a situação mais comum reside na tentativa de auto-extermínio. Tal condição é rara na infância, com taxas descritas de 0 a 0,6% (Uygun, 2015). Huang et al (2004) em sua casuística descreveram 4 casos (16,6%) em pacientes de 10 a 15 anos por tentativa de suicídio. Um valor semelhante foi encontrado em nosso estudo, com 2 casos (13,4%) com 14 e 15 anos.

Substâncias alcalinas são responsáveis por 60 a 80% dos casos de ingestão cáustica. Este dado pode ser explicado pela sua maior disponibilidade e diversidade em produtos de limpeza, além da uma prática, muito utilizada em nosso país, de produção de sabão em casa com utilização de soda cáustica (NaOH). O NaOH é um dos álcalis mais potentes e perigosos (produzindo graves lesões e consequentemente estenoses), pois é transparente como água e geralmente armazenados em recipientes inadequados (especialmente em garrafas também transparentes) que podem ser facilmente confundidos pelas crianças. Neste estudo, a grande maioria das ingestões foram de substâncias alcalinas, em especial da soda cáustica que

representou 80% dos casos.

Formulações líquidas, de alta concentração alcalina, tendem a passar rapidamente através da orofaringe causando lesões graves a nível das constrições esofágicas superior, média e inferior, devido à necrose de liquefação, geralmente transmural gerando posteriormente a estenose esofágica (Hamza et al, 2003; Contini et al, 2009; Uygun, 2015). Após a realização de estudo contrastado do Esôfago-Estômago-Duodeno em alguns dos nossos pacientes foi observado que a região esofágica mais comumente acometida por estenose foi o terço médio do esôfago com cinco casos, seguida por terço proximal (dois casos), terço médio mais terço distal (dois casos) e terço distal isolado (um caso).

A Endoscopia Digestiva Alta (EDA) tem demonstrado ter um papel importante no diagnóstico, tratamento e prognóstico das lesões cáusticas e suas complicações. Estudos prévios documentam um significativo risco de lesão esofágica grave com altas chances de estenose na ausência de queimaduras orofaríngeas. Preconiza-se que seja realizada de forma segura e eficaz, entre 24 a 48 horas após a ingestão, com menor risco de perfuração (Contini & Scarpignato, 2013). Nosso estudo notou que dos 15 casos de ingestão, apenas 4 pacientes foram submetidos a EDA nas primeiras 48h. Tais achados representam a realidade do nosso sistema de saúde frente à continentalidade do Brasil. Endoscópios, profissionais treinados e materiais adequados para dilatação raramente estão disponíveis com facilidade nos hospitais de baixa complexidade. De forma adicional, pode levar de semanas a meses até estes pacientes serem referenciados adequadamente, atrasando ainda mais o tratamento. Em tais situações, as dilatações esofágicas acabam sendo realizadas em uma fase tardia, quando a estenose já está bem estabelecida, altamente fibrótica e frequentemente acompanhada de distorção anatômica significativa do lúmen esofágico.

Quando realizada a classificação endoscópica de Zargar et al (1989) para lesões esofágicas induzidas por cáusticos em nossos pacientes que realizaram EDA nas primeiras 48h, duas crianças apresentaram grau 3b, 1 grau 2a e 1 grau 1. Resultado muito similar foi encontrado por Antero et al (2008) em crianças catarinenses, que de 17 casos de estenose somente 4 pacientes realizaram EDA em até 48 horas, classificando dois pacientes como grau 2b, 1 grau 2a e 1 grau 1.

Diversos estudos tem demonstrado que o grau de lesão esofágica ao exame endoscópico é um indicador preciso de complicações sistêmicas e risco de óbito, com cada aumento de grau da lesão relacionada a um aumento de 9 vezes na morbidade e mortalidade. O índice de estenoses em lesões esofágicas grau 2b e 3 pode chegar a 71 e 100% respectivamente (Contini & Scarpignato, 2013)

Um bom estado nutricional é crucial para um bom prognóstico das crianças vítimas de acidentes com cáusticos, especialmente aquelas com maior risco de evolução para estenose esofágica. Portanto, uma melhora no status nutricional e patência esofágica com manutenção de um bom calibre do órgão são os objetivos no tratamento deste paciente. Nos países em desenvolvimento, a apresentação tardia, a gravidade da estenose, associada à dificuldade de cuidados e condução inapropriada para o caso tornam esta meta desafiadora. Diante de tal cenário, a obtenção de uma via alimentar torna-se fundamental, em especial através da realização de gastrostomia que é eficaz na recuperação nutricional além de poder permitir uma abordagem retrógrada para dilatação em casos mais graves. Dentre os nossos casos, 9 crianças (60%) necessitaram da realização de gastrostomia. Este dado demonstra a gravidade do acidente que gerou a estenose associado aos múltiplos fatores envolvidos (sociais, econômicos, entre outros), condizentes com as evidências atuais (Kurowski & Kay, 2017; Chirica et al, 2016; Millar & Cox, 2014; Contini & Scarpignato, 2013; Uygun, 2015).

O manejo das estenoses esofágicas na população pediátrica é primariamente endoscópico, e se ocorrerem falhas repetidas nesta modalidade aventa-se a possibilidade de cirurgia de substituição do esôfago (Bicakci et al 2010). O principal método realizado para dilatação endoscópica é a utilização de velas de Savary-Gilliard que são seguras e eficazes na vasta maioria dos casos. As dilatações são então repetidas até a obtenção de um calibre satisfatório, permitindo que o paciente possa deglutir adequadamente. A frequência ideal de dilatação não é bem estabelecida na literatura (Cheng & Roffat 2009), sendo preconizado em nosso serviço uma abordagem baseada em sintomas e estudos de imagem conforme a necessidade. Em nossa casuística obtivemos uma média de 7,7 sessões de dilatação endoscópica por paciente durante o período avaliado, variando de nenhuma até 30 sessões. Nossos dados corroboram com as evidências disponíveis que estenoses cáusticas

necessitam de mais dilatações para alcançar um resultado clínico satisfatório em comparação a estenoses benignas de outras etiologias (Contini & Scarpignato, 2013).

As taxas de perfuração após dilatação de estenoses esofágicas benignas variam de 0,1% a 0,4%, porém para estenoses cáusticas este valor flutua entre 0,4% a 32%, caindo de forma expressiva conforme se aumenta a habilidade com o procedimento (Contini & Scarpignato, 2013). No presente estudo foram encontradas, num total de 116 sessões de dilatação esofágica, 4 (3,44%) episódios de perfurações associadas ao procedimento, compatível com o relatado na literatura considerando o tempo de experiência e volume de pacientes deste serviço relacionados a este procedimento.

Seguindo a tendência conservadora observada na literatura (Kurowski & Kay, 2017; Chirica et al, 2016; Contini & Scarpignato, 2013; Uygun, 2015; Bicakci et al 2010), em nossa pesquisa apenas 3 (13,3%) pacientes foram submetidos a esofagectomia, indicadas por falha no programa de dilatação endoscópica e complicações.

A avaliação microscópica de lesões cáusticas não tem sido bem relatadas na literatura. Existe um único trabalho que analisou microscopicamente esôfagos post-mortem por ingestão de cáustico de adultos (Advenier et al, 2014). Nosso estudo mostrou a presença de esofagite em pelo menos uma das biópsias de cada paciente, o que comprova a agressão e inflamação que o tecido esofágico fica exposto após o contato com o cáustico.

Apesar do ambiente inflamatório proporcionado pela estenose cáustica aparentemente relacionar-se com a patogenia das alterações esofágicas (Kaya et al, 2006), a potencial etiologia e gênese do risco aumentado de CECE após a ingestão de cáustico permanece incerta (Kurowski & Kay, 2017). De acordo com a literatura, a maioria dos carcinomas de esôfago ocorrem em áreas de tecido cicatricial e em regiões de estreitamento anatômico, sejam os naturais ou patológicos. Lesões traumáticas intermitentes associadas às dilatações, estase alimentar e refluxo de conteúdo gástrico são associados a piora do estado nutricional e manutenção do processo inflamatório na mucosa esofágica, predispondo à transformação maligna. Contudo, este processo pode levar de uma a várias décadas (Kurowski & Kay, 2017; Pennachi et al, 2017; Millar & Cox, 2014; Ruol et al, 2010; Kay & Wyllie, 2009; Mamede & Melo Filho, 2001; Hopkins & Postlethwait, 1981; Appelqvist & Salmo, 1980).

Dado o mau prognóstico associado a esta neoplasia, a identificação de biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce, avaliação prognóstica e desenvolvimento de terapias-alvo específicas, resultariam na redução da mortalidade destes pacientes. Recentes descobertas sugerem o papel dos miRNAs como moléculas reguladoras e robustos biomarcadores, o que facilitaria o alcance do diagnóstico precoce dos pacientes com CECE (Yang et al, 2013).

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs, de fita simples, que não sintetizam proteínas. Eles atuam de forma relevante na iniciação e progressão do câncer, através da regulação pós-transcricional de moléculas de RNA mensageiro (RNAm). Muitos miRNAs foram conservados evolutivamente entre organismos remotamente relacionados, indicando o seu envolvimento em processos celulares essenciais. Mais de 1500 foram identificados e estima-se que regulem a expressão de 30 a 60% dos genes humanos (Soong & Meltzer, 2012).

Vários estudos têm demonstrado que os miRNA estão envolvidos em numerosos processos fisiológicos de regulação celular, incluindo diferenciação, proliferação, apoptose e metabolismo. Mais da metade dos miRNA humanos estão geneticamente localizados em regiões de fragilidades ou associadas a tumores, incluindo amplificação, perda de heteroziguidade, regiões de quebra de oncogene ou não-oncogene (*breakpoint*). Estas evidências sugerem que os miRNA possuem um papel importante na oncogênese (Kestens et al, 2016; Liu et al, 2013; Zhang et al, 2010; Feber et al, 2008).

Os miRNAs regulam a expressão gênica e assim modificam a expressão de oncogenes e supressores tumorais. A expressão reduzida de miRNAs supressores tumorais, cuja função fisiológica é suprimir a atividade de oncogenes, resulta na expressão elevada destes últimos. Por outro lado, a amplificação de onco-miRNAs, que desempenham papel ativo no desenvolvimento de neoplasias, inibem vários tipos de genes supressores tumorais que levam à disfunções diversas a nível celular como sinalização proliferativa sustentada, evasão de destruição imunológica, imortalidade replicativa, ativação de mecanismos de invasão e metástase, indução de angiogênese, bem como instabilidade e mutação do genoma e resistência à morte celular em diversas neoplasias, incluindo o CECE (Harada et al, 2016; Song & Meltzer, 2012). Assim, levando em consideração a expressão tecido-específica dos miRNAs e a sua habilidade de degradar-se com dificuldade, a realização de perfis de expressão gênica dos miRNAs pode ser utilizada na predição do risco de câncer, diagnóstico

precoce, classificação histológica e avaliação prognóstica (Yang et al, 2013).

Por sua vez o desenvolvimento do câncer de esôfago envolve múltiplos fatores, numerosos genes, e diversos estágios. Estudos prévios demonstraram que a maioria destes tumores se desenvolvem simultaneamente à super-expressão de oncogenes e/ou à repressão da expressão de anti-oncogenes (Hu et al, 2001; Song & Meltzer, 2012). Trabalhos recentes evidenciam o envolvimento direto dos miRNAs na indução e desenvolvimento do câncer de esôfago, estando a sua expressão correlacionada ao diagnóstico, estadiamento, progressão e prognóstico. (Harada et al, 2016; Liu et al, 2016; Wu et al, 2014; Sakai et al 2013; Song & Meltzer, 2012).

Alguns estudos têm reportado a expressão alterada dos microRNAs em amostras de tecidos de CECE. Feber et al (2008) analisaram 35 amostras esofágicas de diferentes subtipos histológicos que envolviam carcinoma espinocelular, adenocarcinoma, esôfago de Barrett, displasia de alto grau, e através da expressão dos miRNAs conseguiram diferenciá-los histologicamente e discriminar tecido tumoral de esôfago normal. Ogawa et al. (2009) examinaram 30 biópsias de CECE comparando-as a 30 amostras de tecido esofagiano normal, e evidenciaram que pacientes com expressão aumentada do miR-129 possuíam menor sobrevida pós-operatória.

Hu et al. (2011) avaliaram a expressão de 10 miRNAs em 10 linhas celulares de câncer de esôfago em 158 amostras de tecido e demonstraram que os miR-30e e miR16-2 estavam associados a maior sobrevida geral e também à sobrevida livre de doença.

Em revisão sistemática realizada por Song & Meltzer (2012) apontaram que o miR-21 e miR-155 tem expressão aumentada no CEE quando comparada a amostras de tecidos normais, enquanto miR-1, miR-99a, miR-100, miR-133a, miR-143, miR-145, miR-203 e miR-375 possuem expressão diminuída neste tumor.

Liu et al. (2013) demonstraram em uma amostra contendo tecidos de 3 pacientes portadores de câncer de esôfago, a expressão alterada de 60 microRNAs entre 770 analisados. Destes, 51 fragmentos estavam super-expressos acima de duas vezes e 9 miRNAs sub-expressos abaixo de metade quando comparados a tecidos sem doença. Nesta amostra os miRNA mais super-expressos foram hsa-miR-15a, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-31, hsa-miR-99b, hsa-miR-101, hsa-miR-130a, hsa-miR-143, hsa-miR-196b, hsa-miR-200a, hsa-miR-210, hsa-miR-452 e hsa-miR-27a; enquanto os mais marcadamente subexpressos foram hsa-miR-30b, hsa-miR-223,

hsa-miR-454, hsa-miR-486, hsa-miR-574-3p e hsa-miR-126.

Observando os miRNA alterados no grupo de pacientes com ingestão de cáustico há menos de 5 anos, o miR-886 desponta dentre aqueles super-expressos. Este miRNA é localizado no cromossomo 5 e vem sendo aceito como um supressor de tumor em diversos estudos. Sabe-se que este funciona como um ligante e inibidor da PKR (Protein Kinase RNA-activated), uma proteína pleotrópica relacionada a defesa celular contra vírus, respostas ao estresse, inflamação e tumorigênese. (Fairman et al., 1995). Entretanto, seu papel molecular exato no desenvolvimento tumoral é ainda desconhecido. Estudos demonstram que sua expressão é reduzida em câncer de pulmão, além de ter seu locus genômico frequentemente deletado em casos de leucemia (Cao et al., 2013; Treppendahl et al., 2012). Lee et al. (2014) demonstraram que a expressão de miR-886 é significativamente diminuída em tumores esofágicos em comparação ao tecido normal peri-tumoral. Entretanto, evidenciou que este microRNA possui sua expressão aumentada em casos de esôfago de Barrett ou metaplasia da mucosa, lesões consideradas pré-malignas. Em nosso estudo, o miR-886-5p encontrou-se aumentado 11 vezes em relação ao grupo controle, sendo o microRNA que apresentou maior aumento, podendo ser correlacionado positivamente com o achado de Lee et al. (2014), uma vez que a região atingida pelo cáustico também sofre múltiplas agressões teciduais que podem culminar com alterações celulares importantes como a displasia.

O segundo miRNA com expressão aumentada em nosso estudo nos pacientes do GA é o miR-205-5p. Este microRNA parece ter íntima relação com a progressão de diversos tumores, dentre eles o carcinoma de células escamosas do pulmão (Cai et al., 2013) e câncer de colo uterino (Xie et al., 2012). O miR-205 pode ser tanto um supressor de tumor, quanto um oncogene. Estudos demonstram que em câncer de mama, ele apresenta-se diminuído, sendo que quando sua expressão está aumentada, este atua inibindo a proliferação celular, a expressão de ERBB3 e de fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) (Wu et al., 2009). Entretanto, o miR-205 apresenta-se aumentado no câncer de pulmão, onde a proliferação celular é estimulada a partir da inibição do gene supressor de tumor PTEN (Jang et al., 2016). Em um estudo recente que avaliou amostras de CECE, Pan et al. (2017) notaram que a expressão elevada deste miRNA levou ao desenvolvimento de um fenótipo agressivo, que promove resistência à radioterapia, com inibição da apoptose e ativação da transição epitélio-mesênquima, através da ativação do gene PTEN e da

via de sinalização PI3K/AKT. Hezova et al. (2016) identificaram que a subexpressão do miR-205 em linhas celulares KYSE-150 de CECE diminuíram a proliferação e migração celular, atuando como oncogene através da regulação do PTEN. De forma contrária às nossas evidências, Matsushima et al. (2011) evidenciaram a expressão diminuída deste miRNA em células de CECE. Essa inibição encontrada estimula a expressão da proteína ZEB2 (*zinc finger E-box-binding homebox 2*), que ativa o eixo TGF- β -ZEB2-E-caderina e assim acelera a progressão do câncer pela indução da transição epitélio para mesênquima facilitando a migração e invasão celular (Matsushima et al, 2011; Harada et al, 2016).

Ainda no grupo dos miRNAs que apresentaram expressão aumentada entre as crianças com menos de 5 anos após a lesão, encontra-se o miRNA-29a-3p. Esta família de miRNAs, transcritos no cromossomo 7 e 1, está intimamente envolvida no processo de carcinogênese e progressão tumoral através de fatores de transcrição gênica (por exemplo com TGF- β e fator de crescimento endotelial) (Wang et al., 2013), sendo seus componentes aberrantemente expressos em tumores como carcinoma de nasofaringe, carcinoma hepatocelular, neoplasia de mama, melanoma, entre outros (Nguyen et al., 2011). Ding et al. (2011) demonstraram em cinco linhas celulares de carcinoma de células escamosas do esôfago que o aumento na expressão dos microRNAs da família miR-29 inibiria a progressão celular ao inibir a expressão da molécula de Ciclina-E. Tal resultado corrobora com nosso achado, visto que a expressão aumentada de miR-29a-3p pode ser um indicativo de uma tentativa inicial de o tecido agredido a partir da ingestão de soda cáustica proteger-se contra a progressão para uma possível neoplasia.

O miR-320a, dentre os microRNAs do GA analisados apresentou um aumento em sua expressão de aproximadamente 5 vezes em relação aos controles. O miR-320a é responsável por suprimir o crescimento celular e o surgimento de metástases ao ligar-se ao gene BCR/ABL (Xishan et. al, 2015). Xishan e colaboradores (2015) demonstraram que na leucemia mieloide crônica, o miR-320a apresenta-se supresso em relação a amostras de tecido medular controle, consideradas normais. Chiam e colaboradores (2015) avaliaram um painel de potenciais biomarcadores para câncer de esôfago, comparando amostras de pacientes com neoplasia a pacientes portadores de Esôfago de Barrett e controles saudáveis. Dentre os microRNAs escolhidos para o painel, os pesquisadores evidenciaram que, quando comparadas a amostras dos indivíduos sadios, a relação miR-25-3-p/miR-320a apresentou um fold-

change de 1,4 porém se correlacionadas às amostras de portadores de Esôfago de Barrett esta relação quase dobra ($FC = 2,3$; $p=0,002$). Este achado pode denotar uma possível influencia destes microRNAs na transformação tecidual esofágica maligna.

A maioria dos miRNAs encontrados nas amostras esofágicas, encontraram-se com expressão diminuída no grupo de pacientes que ingeriram soda cáustica há menos de 5 anos em relação ao grupo controle. São eles os miRNA hsa-miR-126-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-139-5p e hsa-miR-95-3p.

Dentre os microRNAs que estavam diminuídos, temos o miR-126-3p, um microRNA localizado no cromossomo 9 (Croce et. al, 2009). Meister et. al (2010) demonstraram que quando normalmente expresso, o miR-126-3p atua em diversos processos fisiológicos ou patológicos, como inflamação, crescimento de vasos sanguíneos ou câncer. Nie et al. (2015) evidenciaram que miR-126-3p atua como supressor de tumor no câncer de esôfago, quando tem sua expressão aumentada, a medida que atua regulando a via do PI3K/AKT em células EC109. Liu et al. (2013) demonstraram em tecidos tumorais que a expressão do miR-126-3p apresenta-se diminuída em câncer de esôfago comparado com tecidos normais, achado similar ao evidenciado no presente estudo.

A baixa expressão do miR-145 também é observada em vários tipos de câncer, entre eles o de pulmão (Li et al., 2014), próstata (Larne et al., 2015, Doberstein et al., 2013) e bexiga (Chiyomaru et al., 2010). Han et al. (2016) demonstraram que o miR-145-5p, quando tem sua expressão aumentada atua inibindo a proliferação, migração e invasão pelas células tumorais do câncer de esôfago ao ligar-se ao fator de crescimento de tecido conectivo, assim sendo, quando comparado às amostras de tecido considerado normal, amostras deste tecido neoplásico apresentam considerável supressão de miR-145. Kano et al. (2010) evidenciaram que a expressão diminuída do miR-145 resulta na ativação do gene FSCN1, que por sua vez ativa a multiplicação e invasão celular. Da mesma forma, Cui et al. (2015) também demonstraram a sub-expressão do miR-145 em amostras de tecido tumoral esofágico, apresentando através de linhagens celulares a capacidade de supressão tumoral no miR-145 à medida que este liga-se à extremidade 3'-UTR do gene PLCE1, relacionado a regulação do crescimento, diferenciação celular, apoptose e angiogênese.

Trabalhos recentes demonstram a atuação do miR-143-3p como um supressor

tumoral, inibindo a progressão da lesão e o desenvolvimento de metástases. Em amostras de câncer de esôfago este miRNA apresenta-se com expressão diminuída. Com a perda de sua atividade supressora ocorre uma inibição da atividade da proteína ERK-5, o que facilita a proliferação e invasão celular (Ni et al., 2013). Zhenyue et al. (2016) encontraram 28 microRNAs com expressão aberrante em amostras de neoplasia esofágica, sendo que o miR-143-3p apresentou a maior sub expressão em relação a amostras de tecido normal.

A família dos miR-125 inclui 3 miRNAs que possuem diferentes funções no desenvolvimento de tumores, com função supressora tumoral bem estabelecida nos miR-125-a e miR-125b, apresentando-se suprimidos em câncer de bexiga (Huang et al., 2011), ovário (Dahl et al., 2009), mama (Duan et al., 2009), melanoma (Kappelmann et al., 2013) e hepatocarcinoma (Tang et al., 2012). Em nossa amostra este apresentou sub expressão com *fold-change* de 0,15. Fassan et al. (2013) demonstraram que o miR-125a-5p apresenta-se sub expresso em casos de câncer gástrico e adenocarcinoma esofágico. Observaram ainda que quanto mais intensa essa supressão, mais intensa a expressão da proteína HER-2, já conhecida por seu papel crucial na carcinogênese dos tumores esofágicos e de estômago. Contudo, em linhas celulares KYSE de CECE, Ma et al. (2017) evidenciaram que a expressão aumentada do cluster de miRNAs miR-99b/let-7e/miR-125a promoveu migração e invasão *in vitro*, e metástase *in vivo*, com regulação pós-transcricional através do gene ZEB1.

O miR-141, um dos microRNAs sub expressos em nosso estudo, apresenta uma característica peculiar segundo estudos recentes, atuando como oncogene e supressor tumoral (Esquela-Kerscher et al., 2006). Como regulador de supressão tumoral, apresenta-se com expressão diminuída no câncer de gástrico, pancreático, de próstata, osteossarcoma, entre outros. Como oncogene, apresenta-se super expresso em câncer de ovário e nasofaringe (Marchini et al., 2011). Jin et al. (2016) demonstraram que a expressão do miR-141 se apresenta significativamente aumentada em linhagens celulares de CECE, sendo inversamente relacionada à expressão do gene PTEN, um supressor tumoral, denotando o papel de miR-141 como oncogene no câncer de esôfago. Em nosso estudo, entretanto, tal microRNA apresentou-se diminuído.

O miR-95-3p, assim como o miR-141, atua tanto como supressor tumoral, quanto como oncogene. Nos tumores de pâncreas (Zhang et al., 2009) e colorretal

(Huang et al., 2011), tal microRNA apresenta-se como oncogene, a medida que promove o crescimento tumoral, enquanto que nos tumores hepáticos (Xiao et al., 2014) e de região cervical (Nurul-Syakima et al., 2011) apresenta-se como supressor tumoral. Até o término desta revisão (março/2018) não foram encontrados estudos que correlacionem a expressão do miR-95-3p a neoplasias esofágicas.

O miR-133a que apresenta duas cópias, distribuídas nos cromossomos 18 e 20 (Yu et al., 2014), sabidamente atuando como supressor de tumor no câncer de ovário (Guo et al., 2014), bexiga (Yoshino et al., 2011) e gástrico (Gong et al., 2015). Zhang et al. (2015) demonstraram que o miR-133a atua no hepatocarcinoma como supressor de tumor a medida que se liga a molécula IGF-1R, inibindo a proliferação, migração e invasão das células tumorais. No CECE por sua vez, Kano et al. (2010) evidenciaram seu papel supressor tumoral através do controle direto da proteína de ação oncogênica FSCN1 estando a sua expressão inversamente relacionada ao miRNA. Chen et al. (2014) encontraram expressões diminuídas de miR-133a e miR-133b em amostras de CECE quando comparadas a tecidos normais, correlacionando a subexpressão combinada destes miRNAs ao grau de diferenciação e progressão tumoral, indicando o papel destas duas moléculas na progressão do CECE. Li et al. (2015) demonstraram a expressão reduzida do miR-133 em tecidos tumorais, e apresentaram o seu papel supressor a medida que este liga-se ao gene SOX4, impedindo a migração e invasão das células do câncer de esôfago. Em nossa amostra, este miRNA apresentou expressão reduzida, similar aos achados encontrados na literatura relacionada ao CECE.

O miR103 é conhecido por ligar-se a uma quinase ribossomal denominada p90RSK2, responsável por aprisionar as células na fase G0/G1 do ciclo celular, contribuindo para redução da velocidade do mesmo. Além disso, este miRNA aumenta a capacidade proliferativa dos queratinócitos, ligando-se a proteína Wnt3a, que aumenta a expressão de SOX9 e YAP1, fatores que promovem a multiplicação celular (Peng et al., 2015). Geng et al. (2014) demonstraram que o miR-103 apresenta-se aumentado em câncer colorretal, sendo que sua hiper-expressão está altamente associada a proliferação tumoral e migração celular de células malignas. Entretanto, até o término desta revisão (março/2018) não foram encontrados estudos que correlacionem a expressão do miR-205 às neoplasias esofágicas.

Expressão diminuída do miRNA 139-5p tem sido relatada em vários tipos de câncer, com várias funções propostas, sendo a de supressor tumoral a mais descrita

(Yang et al., 2013). Liu et. Al. (2013) compararam a expressão do miR-139-5p em 106 amostras de tecido proveniente de pacientes com CECE com tecidos adjacentes ao tumor, considerados normais, demonstrando uma diminuição em mais de 14 vezes da expressão do miR-139-5p. Este resultado demonstra que a expressão aberrante deste miRNA em células esofágicas pode desencadear efeitos importantes na carcinogênese, pois este pode suprimir a capacidade de proliferação celular e retardar a transição das fases G1/S durante a progressão do ciclo celular. Redução expressiva similar foi encontrada nas amostras do GA, levantando uma possível hipótese do papel do miR-139-5p na transformação maligna do esôfago agredido por cáusticos.

Baseando-se nas evidências recentes da literatura, que demonstram o papel regulador dos miRNA sub-expressos na oncogênese do tecido esofágico em amostras de câncer de esôfago, nota-se a importância dos nossos achados, que demonstraram a influência da lesão cáustica no esôfago, mesmo nos primeiros anos de lesão, com possibilidade de transformação maligna mediada por alterações genéticas.

Dentre os miRNAs com expressão aumentada encontrados no grupo de crianças com lesão há mais de 5 anos, o miR-342-3p demonstrou estar 2,27 vezes mais aumentado que na amostra do grupo controle. Dados recentes da literatura indicam que a expressão deste microRNA é desregulada em diferentes tipos de câncer. Há possível função de supressão tumoral em alguns estudos, apresentando sua expressão reduzida nos tecidos tumorais (Crippa et al., 2016), em neoplasias hematológicas, adenocarcinoma de pulmão (Xie et al., 2015), carcinoma hepatocelular (Zhao & Zhang, 2015), câncer de mama e no carcinoma colorretal (Crippa et al., 2016). Nesta última, em algumas linhagens celulares, a expressão aumentada reativa genes que inibem a proliferação e a invasão celular. Tao et al. (2014) demonstraram expressão aumentada do miR-342 em amostras teciduais de tumores colorretais associadas a pior prognóstico nestes pacientes, demonstrando heterogenicidade intertumoral do papel do miRNA nos diversos genes. Entretanto, até o momento do término desta revisão (março/2018) não foram encontrados estudos que correlacionem a expressão do miR-342-3p às neoplasias esofágicas.

Perfis de expressão do miR-374 tem demonstrado sua super-expressão em muitos tipos de câncer, como o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, linfomas, câncer gástrico, osteosarcoma e carcinoma urotelial da bexiga (Baek et al., 2016; Wang et al., 2015). Xu et al. (2015) encontraram expressão elevada do miR-374 em linhas celulares e amostras teciduais de câncer gástrico quando comparado

a tecido normal adjacente, demonstrando ainda que a inibição deste microRNA suprime a proliferação, invasão e migração de células tumorais, reduzindo a tumorigênese *in vivo*. Wang et al. (2015) avaliaram o papel do miR-374 na regulação da proliferação de linhas celulares de câncer de esôfago. Evidenciaram que a super-expressão deste miRNA aumenta significativamente a proliferação de células neoplásicas, ocorrendo o efeito inverso quando sub-expresso, e reduziu a atividade de transcrição da proteína Axin2, um supressor tumoral, demonstrando um papel importante do miR-374 na tumorigênese esofágica. Em nosso estudo, este miRNA também se mostrou aumentado em 2,05 vezes, demonstrando uma concordância com os estudos recentes, denotando um possível papel deste miRNA na regulação da transformação maligna nestes pacientes.

O miRNA miR-574-3p tem sido reportado como um miRNA supressor de tumor em diversos tipos de cânceres, como câncer gástrico, de esôfago, de bexiga e de próstata (Liu et al., 2016; Ferber et al., 2008; Song & Meltzer, 2012). No câncer de próstata, Chiyomaru et al. (2013) observaram o efeito regulador deste miRNA sobre a via de sinalização Wnt na redução da proliferação celular através da expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Okumura et al. (2016) em estudo que analisou a expressão do miRNAs em casos de recorrência de carcinoma espinocelular, mostraram importante associação entre a expressão diminuída do miR-574-3p e recorrência do câncer nos pacientes analisados, o que implica pior prognóstico e menor sobrevida para estes pacientes. Tal miRNA também foi encontrado com expressão diminuída em nossas amostras, o que pode ser um possível preditor de pior prognóstico a longo prazo para pacientes com estenose cáustica do esôfago que vierem a desenvolver CECE.

Dentre os miRNA diminuídos na amostra do GB o miR-744 é o menos expresso. Este miRNA apresenta-se desregulado em amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, mieloma múltiplo, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular ou câncer de mama (Chen & Liu., 2016 ; Sha et al., 2016). Li et al. (2016) observaram expressão aumentada do miR-744 em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de laringe, e conseguiram estabelecer que quando sub-expresso houve inibição efetiva de metástases pela ativação da cascata de sinalização das proteínas AKT/mTOR e NF- κ B. Apesar da forte relação com o carcinoma de células escamosas de laringe, até o termino desta revisão (março/2018) não foram encontrados estudos que correlacionem a expressão do miR-744 às

neoplasias esofágicas.

A Tabela 5 resume os principais achados na literatura envolvendo os miRNAs de expressão alterada em nosso estudo e aqueles encontrados em amostras teciduais (ou linhas celulares) de CECE.

microRNA	CECE	Cáustico	Gene-alvo	Função	Referências
miR-29a	↓	↑ (GA)	Ciclina-E	Supressor	Ding et al (2011)
miR-125	↑	↓ (GA)	ZEB1	Oncogene	Ma et al (2017)
miR-126	↓	↓ (GA)	PI3K/AKT ADAM9	Supressor	Nie et al (2015), Liu et al (2013)
miR-133a	↓	↓ (GA)	FSCN1 SOX4	Supressor	Li et al (2015), Chen et al (2014), Kano et al (2010)
miR-139	↓	↓ (GA)	NR5A2	Supressor	Liu et al (2013)
miR-141	↑	↓ (GA)	PTEN	Oncogene	Jin et al (2016)
miR-143	↓	↓ (GA)	ERK5	Supressor	Zhang et al (2015), Ni et al (2013)
miR-145	↓	↓ (GA)	FSCN1 PLCE1	Oncogene	Han et al (2016), Cui et al (2015), Kano et al (2010)
miR-205	↑	↑ (GA)	PTEN	Oncogene	Pan et al (2017), Hezova et al (2016)
	↓		ZEB2	Supressor	Matsushima et al (2011)
miR-342	↑	↑ (GB)	Axin2	Oncogene	Wang et al (2015)
miR-574	↓	↓ (GB)	EGFR Wnt	Supressor	Okumura et al (2016)
miR-886	↓	↑ (GA)	PKR	Supressor	Lee et al (2014)

Tabela 5: Perfil de 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. Legenda- ↑: expressão aumentada; ↓: expressão diminuída; GA: Grupo A; GB: Grupo B.

O processo de transformação neoplásica é complexo e progressivo. Basicamente, desenvolve-se a partir do processo inflamatório da mucosa

caracterizado por esofagite, com subsequente hiperplasia celular (na maioria das vezes atípica), seguida de alterações displásicas e finalmente a lesão neoplásica per se (Fassan et al., 2013). Existem evidências demonstrando que a desregulação complexa de miRNA é um dos principais condutores da tumorigênese esofágica no CECE (Harada et al, 2016; Song & Meltzer, 2012).

Sabe-se que o Adenocarcinoma de Esôfago e o CECE possuem diferentes fatores de risco e características demográficas, sugerindo assim que os eventos moleculares condutores da carcinogênese são diferentes (Denliger & Thompson, 2012). Desta forma considerando-se a particular fisiopatologia da lesão cáustica, seria adequado pressupor que a neoplasia esofágica induzida por cáustico também possui eventos moleculares distintos. Levando em consideração que o epitélio que recobre uma cicatriz é mais vulnerável à transformação maligna, especialmente se submetida a injúrias físicas, químicas ou térmicas por períodos prolongados, subentende-se que estes eventos se aproximam mais do CECE pois a patogenia desta neoplasia também está intimamente relacionada a fatores de exposição ambiental (Noh et al, 2017).

Dentre os fatores ambientais associados ao CECE, novos carcinógenos têm despontado, como o Acetaldeído. Trata-se de uma substância química conhecida por induzir mutações genéticas através da inibição da metilação do DNA, relacionada ao desenvolvimento de cânceres do trato aerodigestivo. Má higiene oral, encontrada com frequência nos pacientes portadores de estenose cáustica, altera o microbioma bucal, levando a um aumento populacional de bactérias e fungos capazes de metabolizar pequenas quantidades de álcoois neste carcinógeno, associada a uma redução capaz de metabolizá-lo em ácido acético. Esta proliferação bacteriana resulta em um acúmulo de acetaldeído na saliva com níveis superiores a 100 vezes ao encontrado no plasma. Este metabólito intercala-se ao DNA, formando aductos estáveis não reconhecidos pelos mecanismos de reparo, levando a erros na codificação gênica e consequentemente às mutações (Denliger & Thompson, 2012). Em nossa análise, fatores ambientais como higiene oral, alcoolismo e tabagismo não foram avaliados, não sendo possível estimar sua influencia em nossa população.

Apesar de ligações coerentes entre desregulação de miRNA, mutações específicas e o desenvolvimento do CECE não estarem bem estabelecidos, alguns genes encontrados em nosso mapa de interação proteica que podem se relacionar a fisiopatologia da transformação maligna nos pacientes portadores de estenose cáustica serão discutidos. Uma compreensão mais aprofundada destas mutações e

de seus mecanismos regulatórios é importante, pois o conhecimento neste campo segue em constante evolução favorecendo futuramente a descoberta de outras opções diagnósticas e/ou de terapia direcionada.

Sun et al. (2016) ao construir uma rede integrativa de miRNA em linhas celulares de CECE, conseguiu demonstrar que a função biológica destas células foi enriquecida com múltiplas vias de sinalização desde pequenos processos metabólicos moleculares, apoptóticos até regulação de ciclo celular mitótico e ligação ao DNA, entre outros. Estas alterações resultam em fenótipos de crescimento celular descontrolado e aumento na capacidade de invadir tecidos subjacentes. Estas moléculas cruciais envolvidas em vias de sinalização representam alvos atrativos tanto no esclarecimento da carcinogênese como no desenvolvimento de terapias-alvo para o CECE. Em nosso estudo, a partir das análises de predição de alvos moleculares, validados e voltados à biologia do câncer de esôfago, regulados pelos miRNAs alterados em nossa população, seguida da construção da rede de interação proteica, identificamos três vias de sinalização molecular no grupo A (adesão focal, sinalização e ativação de PIK3/AKT), cinco vias no grupo de pacientes com mais de cinco anos de lesão cáustica (PIK3, adesão focal, mTOR, Pre-NOTCH e Wnt) e quatro vias comuns aos dois grupos (adesão focal, Wnt, MAPK, EGFR).

A via de sinalização Wnt, comum a todos os grupos, é considerada a via molecular canônica, de mecanismo central, na biologia molecular do câncer (Cao et al., 2016; Peng et al., 2015; Wang et al., 2015; Deng et al., 2015; Chiyomam et al., 2013). As proteínas da família Wnt executam papéis importantes no desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e gênese de polaridade celular (Cao et al., 2016; Chiyomam et al., 2013). Em estado fisiológico esta via regula genes envolvidos em processos celulares básicos tais como proliferação celular, diferenciação, migração e morte celular. Sua via de ativação canônica regula um processo complexo de várias etapas envolvendo múltiplas proteínas como Wnt2, GSK3 β , Axin, APC, β -catenin, TCF, c-myc e cyclin D1 (Cao et al 2016; Deng et al., 2015). Deng et al. (2015) demonstraram em 265 amostras tumorais de CECE que a sua super-expressão pode ser considerada um fator adverso na carcinogênese e progressão desta neoplasia.

Super-expressão na via de sinalização de adesão focal (*Focal Adhesion signaling pathway*), também expressa de forma comum nos dois grupos, participa ativamente do processo de invasão celular, e tem sido identificada em múltiplas neoplasias (Luo et al., 2018; Fan et al., 2016; Sun et al., 2016; Nicholas et al., 2013).

A invasão da célula tumoral, não se dá apenas através da degradação da matriz extracelular para criar um caminho de “avanço” celular, porém envolve um processo de comunicação entre a matriz e as células tumorais, assim ativando seus sinais metastáticos. As adesões focais (ou adesões celulares) são as estruturas que possuem um papel central na facilitação da interação entre células-matriz, funcionando como controle de comunicação através dos quais integrinas traduzem sinais advindos da matriz regulando o crescimento celular, sobrevivência e invasão (Luo et al., 2018; Fan et al., 2016).

Estudos recentes demonstram o papel da via de ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR - *Epidermal growth factor receptor*), expressos de forma comum nos dois grupos avaliados em nosso estudo, na estimulação da proliferação celular, com potencial papel na transformação maligna do esôfago de Barrett para Adenocarcinoma (Wang et al., 2014; Chiyomam et al., 2013). No CECE sua super-expressão é associada a mau prognóstico, sem estudos que o relacionem à carcinogênese (Nicholas et al., 2013).

A via molecular de sinalização envolvendo o alvo mamífero da rapamicina (mTOR, ou FRAP1) regulada pelos miRNA encontrados no grupo B, está correlacionada a regulação de fatores de crescimento (como o EGFR), nutrientes e a disponibilidade de energia subjacente à sobrevivência, crescimento, proliferação e morte celular, atuando como um "interruptor mestre" de catabolismo e anabolismo celular. Esta somatória de eventos-chaves são a força motriz da carcinogênese e progressão tumoral (Li et al, 2016). Possuem efeito chave “à jusante” na via de sinalização PI3K/Akt, encontrada em múltiplas neoplasias (Zhu et al., 2015).

Fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) são uma família de lipídio-quinases que em conjunto a Serina/treonina quinases (AKT), formam uma via de sinalização envolvida na regulação do crescimento celular, metabolismo, proliferação, e de processos de homeostase celular. A desregulação da via PI3K/AKT é relacionado a aproximadamente 30% dos casos de câncer (Xia et al, 2018; Sun et al., 2016; Liu et al., 2013). Em estudos *in vitro* sua ativação em linhas celulares promove proliferação e aumento de sobrevivência celular em múltiplos tipos de câncer, como próstata, laringe e esôfago (Xia et al., 2018).

Evidências recentes têm demonstrado que mutações em alguns genes envolvidos (PIK3CA, PTEN, e AKT) nestas vias moleculares podem resultar em transformações neoplásicas em modelos celulares e animais, sugerindo o papel crítico

destes na carcinogênese (Zhu et al., 2015). Em linhas celulares de CECE a relação desta via com o gene PTEN, um dos genes encontrados em nossa rede de interação, leva a codificação de uma fosfatase lipídica de membrana plasmática que atua na regulação da ativação da via PI3K/AKT. Segundo o estudo conduzido por Sun et al. (2016), esta via se mostrou como uma das mais expressas nesta carcinogênese. A ativação aberrante da via mTOR foi evidenciada em 69,5% dos pacientes portadores de CECE no Japão. A relativa alta incidência de mutações nesta via, sugerem que esta desregulação pode levar ao desenvolvimento de CECE, especialmente se considerado o papel sinérgico entre esta e a via PI3k/Akt (Zhu et al., 2015). Esta via (PI3k/Akt) foi identificada tanto no GA como no GB, enquanto a via mTORa apenas nos pacientes com mais de 5 anos de lesão cáustica.

A ativação aberrante da via mTOR induzida pela perda de supressores tumorais e estimulação de oncogenes podem promover, de forma significativa, o crescimento tumoral, angiogênese e invasão celular. Mutações no gene mTOR conferem uma probabilidade de ativação de suas vias de sinalização mesmo em situações de privação de nutrientes. Sua ativação também pode contribuir no desenvolvimento de diversas síndromes relacionadas a tumores benignos bem diferenciados de arquitetura desorganizada, que podem evoluir para malignidade, como na síndrome de Cowden, Peutz-Jeghers e Esclerose Tuberosa (Li et al., 2016).

Interações entre a via mTOR e fatores ambientais tais como tabagismo, etilismo, idade, sexo e índice de massa corporal (IMC) tem sido reportadas (Li et al 2016; Zhu et al., 2015; Kim et al., 2013). Zhu et al. (2015) identificaram que alterações genéticas específicas no gene mTOR podem modificar a susceptibilidade genética ao risco de CECE. Contudo estes efeitos estão intimamente relacionados a outros fatores de risco como IMC, idade, gênero, tabagismo e etilismo. Enfatizam em seus resultados a importância da interação gene-ambiente na determinação da vulnerabilidade ao CECE, apoiando a ideia de que efeitos genéticos de baixa penetrância relacionados a predisposição ao câncer podem ser guiados por outras proteínas e exposições ambientais específicas durante o processo de carcinogênese. Apesar de grandes avanços, ainda não é clara a patogenia desta via na regulação de proteínas específicas do ciclo celular nas células do CECE, e seus mecanismos continuam a ser investigados (Li et al., 2016; Zhu et al., 2015; Kim et al., 2013).

Por regular vias do metabolismo energético e, como o câncer também pode ser considerado como um distúrbio metabólico, existe a hipótese da possibilidade de

atuação do IMC como um mediador entre mTOR e risco de cancer em pacientes específicos (Zhu et al., 2015), como em nossa população de cáusticos. Contudo, neste estudo não foi avaliado o estado nutricional dos pacientes, não sendo possível avaliar o seu impacto nas amostras pertencentes ao grupo B onde esta via de sinalização encontrava-se alterada.

Considerando os achados de nosso estudo encontrados na análise de expressão dos miRNA e na rede de interação proteica, associados às evidências na literatura do efeito ambiental de certas vias moleculares na carcinogênese esofágica, é possível aventar a hipótese que sob a luz da transformação neoplásica do esôfago estenosado por cáusticos, um possível caminho pode dar-se através de múltiplas vias de sinalização, com especial atenção àquelas envolvendo o complexo mTOR/PIK3/AKT.

Estudos como o realizado, e os citados ao longo desta tese, servem como ponto de partida na tentativa de explicar melhor a correlação entre miRNA e a carcinogênese esofágica, buscando formas de melhor entendimento fisiopatológico, para que novos biomarcadores sejam desenvolvidos visando melhorar o prognóstico destes pacientes. O conhecimento aprofundado da genética do câncer ajuda os profissionais envolvidos, auxiliando os pacientes com risco mais elevado, como os portadores de lesões cáusticas, a tomarem melhores decisões sobre estratégias de prevenção e intervenção, envolvendo rastreamento periódico, detecção precoce e (futuramente) terapia direcionada.

5. Conclusão

Nossa casuística de crianças portadoras de estenose esofágica de origem cáustica segue a da literatura sendo a causa mais comum a ingesta accidental em crianças do sexo masculino entre 1 e 3 anos de idade, que necessitam de múltiplas sessões de dilatação endoscópica para a manutenção de uma qualidade de vida adequada.

No presente estudo, nas crianças portadoras de estenose cáustica com menos de 5 anos após a lesão houve 13 miRNAs alterados comparando a indivíduos normais pareados por idade e gênero. Destes, os miRNA hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-205-5p e hsa-miR-320a apresentaram sua expressão aumentada; e os miRNA hsa-miR-126-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-139-5p e hsa-miR-95-3p, a expressão diminuída. Neste cluster, após a análise de predição de alvos miRNA/RNA_m identificaram-se três vias moleculares principais a partir dos RNA_m ou genes validados: adesão focal, via de sinalização e ativação de PI3K-AKT. No grupo dos pacientes com lesão há mais de cinco anos houve 4 miRNAs com expressão aberrante. Expressaram-se de forma aumentada os miRNAs hsa-miR342-3p e hsa-miR-374-5p; e de forma diminuída hsa-miR-574-3p e hsa-mir-744-5p. Dentre essas amostras cinco vias moleculares principais foram identificadas a partir dos genes validados: via de sinalização do mTOR, mecanismo de ativação de PI3 quinase, adesão focal, transdução de sinais mediada pelo Wnt, transcrição e tradução Pre-NOTCH. Tais achados são compatíveis com análises de expressão de miRNA no esôfago (ou linhagens celulares) de pacientes portadores de CECE, indicando um possível papel da regulação destes miRNAs na transformação maligna.

Este estudo revela as características biológicas de expressão global de miRNA na mucosa esofágica de crianças portadoras de estenose cáustica, e através da análise de predição de alvos miRNA / RNA_m, bem como do mapa de interação proteica, é possível sugerir que as vias moleculares de sinalização anormal identificadas possam estar envolvidas na patogenia da progressão maligna para CECE. Desta forma, este trabalho fornece base teórica para estudos futuros sobre o tema nesta população específica.

A análise do perfil de expressão global de miRNAs nesta população pediátrica vítima de lesão por cáusticos é inédita na literatura e demonstra o possível papel da lesão cáustica na carcinogênese do esôfago, mesmo nos primeiros anos após a lesão, com possibilidade de transformação maligna mediada por alterações genéticas.

6. Perspectivas Futuras

Com base nos resultados obtidos, este trabalho espera:

- ter identificado marcador molecular precoce de lesão celular esofágica, obtido através de biopsia endoscópica rotineira;
- formular um protocolo de rastreamento endoscópico pediátrico específico para esta população, incluindo a criança portadora dessa alteração em grupo de acompanhamento endoscópico a intervalos de tempo estabelecidos, iniciando-se antes dos 5 anos após a lesão e preferencialmente anuais, tornando possível a detecção precoce de displasia, cujo tratamento é passível de cura;
- iniciar a discussão do papel da estenose cáustica na carcinogênese esofágica na população pediátrica, possibilitando que futuramente possa contribuir na elucidação do mecanismo subjacente à correlação entre a estenose cáustica e a progressão neoplásica;
- fomentar o debate da formulação de leis que regulamentem e fiscalizem (por parte dos órgãos competentes) o uso, formulação, armazenamento, envase, distribuição destes produtos. Além da urgência de elaboração de políticas públicas que visem a prevenção e educação de todos os indivíduos relacionados aos cuidados das crianças.
- possibilitar que com novos estudos ocorra o desenvolvimento de novos biomarcadores na busca da progressão celular para a malignidade, além de abrir possibilidades terapêuticas a nível molecular específico. Estes marcadores genéticos de origem precoce possibilitarão o rastreio dos casos com potencial de transformação maligna, permitindo o planejamento terapêutico mais adequado, específico e precoce.

Artigo Original

Original Article

microRNA expression profile in esophagus of children with caustic stenosis: is there a pathway towards esophageal cancer?

Wilson Elias de Oliveira Junior MD^a, Tainara Francini Felix MSc^{b,c}, Grazielle do Vale Pires MS^d, Marco Lopez Lapa MSc^{b,c}, Fábio Eduardo Severino PhD^{b,c}, Simone Antunes Terra MD MSc^e, Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção MD PhD^a, Patricia Pintor dos Reis PhD^{b,c}, Erika Veruska Paiva Ortolan MD PhD^a

^a São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, Division of Pediatric Surgery - Department of Surgery and Orthopedics, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

^b São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, Department of Surgery and Orthopedics, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

^c São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, Experimental Research Unit (UNIPEX), Botucatu, São Paulo State, Brazil.

^d São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

^e São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, Department of Pathology, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

Abstract:

Eighty percent of the caustic ingestions occur in children. Esophageal neoplasms may develop as a late complication of caustic injury. Thus a comprehensive knowledge of biological relation between caustic and esophageal cancer is of major importance to identify biomarkers that could enable an early diagnosis and treatment. 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 way before cancer manifestations. This study aimed to identify global microRNA (miRNA) expression changes in cells of the esophageal mucosa from children with caustic stenosis, divided in two groups according to the time elapsed after

the injury, compared to paired macroscopic and microscopically normal esophageal tissue. miRNA expression profiles of needle microdissected tissues were determined using the TaqMan Human MicroRNA Array Card (TLDA) assay (card A v3.0) (Life Technologies). Bioinformatic algorithms were applied to identify predicted miRNA target genes. Protein-protein interaction networks and molecular pathways involving genes and miRNAs were constructed. 13 miRNAs (9 over- and 4 under-expressed) were significantly deregulated in Group A compared to controls. 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. Protein-protein interaction network analysis of both groups showed a number of miRNA-RNA expressing a number of signal transduction and transcription factor networks with genes strongly related to esophageal tumorigenesis. There is no literature regarding microRNAs expression in caustic ingestion children. miRNAs identified herein may be associated to the pathway of the malignant transformation from caustic stenosis to esophageal cancer and may serve in the future as a novel molecular markers of malignancy progression.

Keywords: caustic injury, caustic stenosis, esophageal cancer, microRNA profiling, biomarkers, protein-protein interaction networks.

INTRODUCTION

Caustic esophageal injury remains a serious public health problem in the pediatric population, especially in developing countries. Around 80% of the caustic documented injuries occur in children (Kurowski & Kay, 2017; Millar & Cox, 2014; Kay & Willie, 2009). The substances that may cause esophageal injury vary among countries, but the caustic soda is responsible for 1/3 of all esophageal strictures related to caustic ingestion (Contini & Scarpignato, 2013). The development of strictures depends on the concentration of the substance, and will occur from 10 to 75% of the children. (Othman & Kendrick, 2010). The depth of the injury depends on the caustic concentration in the tissue, which is difficult to assess from the medical history, even if the causative agent and its concentration is known (Kurowski & Kay, 2017; Millar & Cox, 2014; Contini & Scarpignato, 2013). Alkaline agents disrupt both proteins and

fats, destroying cell architecture, a process known as liquefactive necrosis. (Kurowski & Kay, 2017; Millar & Cox, 2014; Contini & Scarpignato, 2013; Kay & Willie, 2009; Dantas & Mamede, 1996).

Esophageal neoplasms may develop 1000-3000 times higher than expected in patients of a similar age as a late complication of caustic injury (Kurowski & Kay, 2017; Pennachi et al, 2017; Millar & Cox, 2014; Ruol et al, 2010; Kay & Wyllie, 2009; Mamede & Melo Filho, 2001; Hopkins & Postlethwait, 1981; Appelqvist & Salmo, 1980). Approximately 1 to 4% of all patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) has also been associated with previous caustic ingestion (Noh et al, 2017). The prevalence of esophageal cancer in patients with previous ingestion of a corrosive agent have ranged from 2% to 16%, varying from 1 to 71 years after injury, most cases occurring 3 to 4 decades later. (Kurowski & Kay, 2017). Survival rates are reported as 40% at 1 year and 13% at 5 years (Isolauri & Markkula, 1989). Survey of these patients with upper endoscopy is recommended from 20 to 50 years after injury, aiming the detection of premalignant changes. (Kurowski & Kay, 2017; Pennachi et al, 2017; Chirica et al, 2016; Contini & Scarpignato, 2013; Kay & Wyllie, 2009).

Esophageal cancer is the 8th in incidence and the 6th cause of death among all cancers worldwide. The overall five-year survival rate is low, considering that most of them are only diagnosed in advanced stages. (Zhang et al, 2012; Mamede & Melo Filho, 2001; Appelqvist & Salmo, 1980). Therefore, the identification of tissue-specific biomarkers is an important strategy for the early diagnosis of Esophageal Squamous Cell Cancer (ESCC), that is the most related to caustic injuries (Costa et al, 2013). Premalignant changes (dysplasias) are histologically well characterized, but there is a lack of information regarding molecular profiles of preneoplastic esophageal lesions (Harada et al, 2016). An understanding of the molecular pathways involved in ESCC carcinogenesis would help improve its diagnosis and therapy. Thus, a comprehensive knowledge of the biological relation between caustic and esophageal cancer is of major importance to identify risk factors and biomarkers which could enable an early diagnosis and treatment.

It is currently known that the molecular mechanisms underlying oncogenesis involve both genetic and epigenetic changes. In the last decade, many studies have suggested that microRNAs (miRNAs) are potent pivotal gene expression regulators and key players in cancer-related mechanisms (Iorio & Croce, 2012). MicroRNAs are small noncoding RNAs, with 21 to 25 nucleotides, which are involved in many

important biological processes, including embryonic development, differentiation, apoptosis, cell proliferation and oncogenesis (Cummins & Velculescu, 2006; Harfe 2005; Bartel, 2004). Multiple studies have shown that the expression of many miRNAs in tumor tissues are up-regulated or down-regulated in several degrees (Harada et al, 2016; Liu et al, 2016; Wu et al, 2014; Sakai et al 2013; Song & Meltzer, 2012). The major biological function of miRNA is the post-transcriptional regulation, which may have a potential impact on genetic pathways (Iorio & Croce, 2012; Di Leva, et al 2006; Lu et al, 2005; Calin et al, 2005). The advances in the discovery of miRNAs as regulators of gene expression and its role in carcinogenesis has suggested these molecules as ideal biomarkers for diagnosis, prognosis and as a potential therapeutic target in human cancer.

The identification of significantly deregulated miRNA expression and miRNA target genes is a first step towards better characterization of cancer biology and is essential for understanding of the pathogenesis of malignant development. Global miRNA expression profile analysis in samples of esophageal tissue in this population, may lead to the identification of the miRNA target genes. Thus, this study aimed to evaluate the global miRNA expression profiling of microdissected esophageal mucosa samples of children with caustic stenosis compared to paired macroscopic and microscopically normal esophageal tissue.

METHODS

Ethics Statement

This study was performed in accordance with the ethical standards and according to the Declaration of Helsinki and according to national and international guidelines. Our study has been approved by the Research Ethics Boards of the Botucatu Medical School, UNESP, Botucatu, SP (1089452/2015).

Patient samples

Inclusion criteria were patients under 15 years old, admitted at your hospital with esophageal lesion induced by caustics, submitted to upper digestive endoscopy, or esophagectomy followed or not in a program of esophageal dilatation, during a 17-year

period. Exclusion criteria were: patients in whom endoscopic biopsies were not performed at any time of follow-up or had no surgical specimen of the esophagus. Formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) esophageal samples from included patients were retrospectively collected from our Department of Pathology, and divided into two groups according to the time elapsed after the injury, group A with samples from children with less than 5 years after injury, and group B with more than 5 years after injury. These samples were paired by gender, age and year of biopsy to macroscopically and histopathologically normal esophageal tissues. Samples from 15 patients were obtained (15 Group A and 12 Group B). The identification of global miRNA expression changes in this injured tissues used the TaqMan quantitative real-time PCR (TLDA) assay, as described below.

RNA Extraction

Samples obtained from FFPE tissue blocks were needle microdissected using the stereo microscope Leica EZ4 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) before RNA extraction, ~~in order to isolate the target tumor or normal cell populations.~~ 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 (Goswami et al, 2013). RNA samples were quantified using *NanoDrop 8000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Quantification of miRNA expression

miRNA 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 (Goswami et al, 2010). 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).

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed to correlate deregulated miRNA expression. Categorical variables were described using frequencies and percentages and continuous variables were summarized using mean (range) and median values.

Statistical analyses were performed using SAS software version 9.3 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Statistically significant difference was defined as $p < 0.05$.

miRNA target prediction analysis

Significantly deregulated ($FC \geq 1.5$ and $p < 0.05$) miRNAs in both groups vs. their corresponding normal esophageal tissues were subjected to target prediction analysis using the computational tool microRNA Data Integration Portal (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) (Shirdel et al, 2011). mirDIP tool is useful for global prediction of miRNA target genes, since it integrates several public databases such as DIANA-microT (Maragkakis et al, 2009), microRNA.org/miRanda (John et al, 2004; Betel et al, 2008), microCosm Targets (www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/), picTar (pictar.mdc-berlin.de/), PITA (genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html), RNA22 microRNA target detection (cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html) and TargetScan (Lewis et al, 2005; Grimson et al, 2007; Friedmann et al, 2009). Experimentally validated miRNA-mRNA interactions with genes involved essentially in neoplastic esophageal processes were researched.

Protein-Protein Interaction (PPI) network analysis

This analysis was performed to determine miRNA-mRNA interaction networks. We used Interologous Interaction Database (I2D) (<http://ophid.utoronto.ca/i2d>, v.2.3) (Brown & Jurisica, 2005), a database of protein-protein interactions for assembly of networks. Gene symbols were first converted to UNIPROT IDs using Bioconductor (www.bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/org.Hs.eg.db.html). Next, we used NAViGaTOR v.2.3.2 (Brown et al, 2009), to assemble PPI networks, comprising genes and their direct neighbors as nodes, and PPIs as edges. Resulting network was visualized using NAViGaTOR 2.3.1. Our complete dataset may be provided in NAViGaTOR 2 XML file format (<http://ophid.utoronto.ca/navigator>), upon request.

RESULTS

Demographic and clinical data

We analyzed 27 biopsies from 15 patients with esophageal caustic lesions. Gender distribution showed that 60% (9) of patients were male and 40% (6) were female. Toddlers were 86,6% (13) of our population at ingestion, most of them between 2 and 3 years of age, all accidentally. Caustic soda (consisting of sodium hydroxide at high concentrations) were the substance predominantly ingested. Nine children required gastrostomy, denoting the severity of our cases. Four children evolved to esophageal perforation, three of whom required esophagectomy. The mean follow-up time of these patients were 4.9 years, ranging from 6 months to 14 years. In the histopathological analysis of the biopsies samples, 11 patients had esophagitis in at least one of their biopsies (73.33%), showing the degree of chronic inflammation and aggressions which these tissues were submitted after the caustic ingestion. Demographic and other clinical features data are shown in Table 1.

Deregulated miRNA expression in esophageal samples exposed to caustic ingestion

After divided into two groups according to the time after ingestion (less or more than 5 years), miRNA expression analysis of group A cases showed that 13 miRNAs (4 over- and 9 under-expressed) were significantly deregulated (fold change $FC \geq 1,5$ and $p < 0.05$) compared to corresponding macroscopically and histologically normal esophageal tissues (data are shown in Table 2 and Figure 1A). In group B, there were 4 deregulated (fold change $FC \geq 1,5$ and $p < 0.05$) miRNAs caustic samples compared to normal esophageal tissues, 2 over-expressed (miR-342-3-p and miR-374-5p) and 2 under-expressed (miR-574-3p and miR-744-5p) (Table 3 and Figure 1B).

Predicted miRNA target genes

Prediction of the target genes of the deregulated (fold change $FC \geq 1,5$ and $p < 0.05$) microRNAs showed that 17 microRNAs could be identified to regulate 1,678 target genes. It showed that most target genes of the differentially expressed microRNAs were involved in signaling transduction mechanisms and transcription related to esophageal tumorigenesis. Graphical representation of these main data is shown in Figure 2 for group A, Figure 3 for group B and Figure 4 for both groups.

DISCUSSION

In this study, we identified distinct miRNA expression profiles between patients with less and more of five years after esophageal caustic injury, suggesting that there may be important differences in the complexity of miRNA changes associated with the development and progression of these lesions. Interestingly, molecular pathways modulated by miRNAs identified in our study and reported in the literature may represent potential diagnostic and prognostic targets for the development of novel management strategies for these patients way before malignant transformation to ESCC.

Changes in miRNA expression contribute to cancer development and progression, and different miRNA expression profiles are associated with biological tumor behavior (Kasinski & Slack, 2011).

Our results showed that 13 miRNAs, 4 over-(hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-320a) and 9 under- expressed, (hsa-miR-126-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-95-3p) were deregulated ($FC \geq 1.5$ and $p < 0.05$) in the group of children with less than 5 years after caustic ingestion compared to histologically normal esophageal tissues paired by age, gender and year of biopsy. In patients with more than 5 years after injury, 4 miRNAs, 2 over-(hsa-miR342-3p, hsa-miR-374-5p) and 2 under- expressed (hsa-miR-574-3p, hsa-mir-744-5p) were detected as deregulated ($FC \geq 1.5$ and $p < 0.05$) compared to histologically normal esophageal tissues. Our results suggest that, although specific changes are found in each group, they are compatible with miRNA expression in the esophagus (or cell lines) from patients with ESCC, indicating a possible role of miRNA regulation implying that common pathways may also be complementing each other towards malignant transformation to esophageal cancer.

We identified a number of miRNAs related to esophageal cancer that had been previously reported and a number of miRNAs that had not been reported or related to cancer by other groups. Liu et al (2013) analyzed the expression of 770 miRNAs from ESCC samples, and found that 60 miRNAs were significantly deregulated ($FC \geq 2$ and $p < 0.05$), 51 over- and 9 under-expressed in cancer tissue compared with normal tissue. The results of our study showed that hsa-miR-126 and has-miR-574-3p were downregulated, respectively on group A and B, what is consistent with the results of Liu et al. However, our study also showed that hsa-miR-143 and hsa-miR-145 were

markedly downregulated in the group A, which opposes the results of Liu et al. This disagreement is possibly due to the non-malignant state of caustic-affected esophageal cells when compared to ESCC cells used on the study.

Decreased miR-886 expression has been previously identified in several cancer types, such as lung carcinoma, leukemia and esophageal cancers, and this miRNA has been suggested as a tumor suppressor by inhibition of *PKR* (*protein kinase RNA-activated*) (Cao et. al, 2013; Treppendahl et. al, 2012). Lee et al (2014) demonstrated miR-886 under-expression in cancer samples compared to normal tissues. Nevertheless, they found an over-expression in samples from metaplastic or Barrett's esophagus, considered a pre-malignant condition. In this study, in group A, miR-886 was over-expressed 11-times when compared to normal samples, what was similar to Lee findings. This miRNA deregulation may represent an organism response to all sort of tissue aggressions which occur both in caustics and in patients with Barrett's esophagus that can lead to cancer.

Between under-expressed deregulated ($FC \geq 1,5$ and $p < 0,05$) miRNAs identified in patients from group A, miR-133a and miR-139-5p are both related to tumor suppression. miR-133a downregulation have been detected in esophageal (Chen et al 2014), ovarian (Guo et. al, 2014), bladder (Yoshino et. al, 2011) and gastric cancers (Gong et. al, 2015). The role of miR-133 in the regulation of genes that control cell migration and invasion, such as *FSCN1* (*Fascin homolog 1 gene*) (Kano et al, 2010) and *SOX4* (*SRY-related HMG-box 4*) has been demonstrated in cell lines of ESCC (Li et al, 2015). The deregulation of miR-139-5p has also been observed to be a frequent event in ESCC and other types of cancer (Yang et al, 2013). Liu et al (2013) showed a 14-fold decrease expression of miR-139-5p in ESCC samples compared with normal tissues, significantly associated with an increased risk for esophageal cancer. This results suggest that the alteration of miR-139-5p levels in ESCC cells may trigger major downstream events in carcinogenesis, because this miRNA can suppress cell proliferation capability and participate in the delay of G1/S phase transition during cell cycle progression.

Over-expression of miR-374 can be found in many types of cancer, such as head and neck squamous cell carcinoma, follicular lymphoma, osteosarcoma and bladder urothelial carcinoma. This deregulation has been associated with tumorigenesis, including the development and progression of esophageal cancer (Baek et al, 2016; Xu et al 2015). Wang et al (2015) found that over-expression of miR-

374 significantly increased cell proliferation in ESCC cell lines, and demonstrated a possible role of this miRNA in esophageal cancer by suppressing the transcription activity, as well as the expression, of *Axin2* (*Axis inhibition protein 2*), a tumor suppressor. Our results showed that miR-374a was markedly increased in samples from patients with more than 5 years after caustic lesions, which may imply a possible role on malignant transformation.

Decreased miR-574-3p expression was found in the group B. Deregulated miR-574 expression has been previously identified in several cancer types, such as gastric, bladder, prostate and esophageal cancers; and this miRNA has been suggested as a tumor suppressor by controlling cell proliferation, migration and invasion ability (Liu et al, 2016; Ferber et al, 2008; Song & Meltzer, 2012). In prostate cancer, miR-574 was related to regulate *Wnt signaling* reducing proliferation by targeting *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) (Chiyomaru et al, 2013). A recent study (Okumura et al, 2016) showed an association between decreased expression of miR-574-3p and tumor relapse and poor overall survival rate, suggesting the tumor suppressor effects of miR-574-3p in ESCC.

The pathophysiologic mechanism of esophageal cancer related to caustic ingestion is not well established (Noh et al, 2017). Pathological findings have shown that epithelium overlying an injured area is known to be vulnerable to neoplastic transformation, especially if subjected to chemical, physical, or thermal aggression for prolonged periods. This fact implies that these events are closer to ESCC which pathogenesis is related to environmental exposure factors. Thus, malignant transformation process is complex and progressive, consisting as the final event of a progressive multistep process of dedifferentiation from native esophageal mucosa to cancer (Fassan et al, 2013).

Some miRNAs have been found consistently deregulated in both types of esophageal cancer, and this histologically independent molecular aberrations suggests their association with a major oncogenic function, starting early in various signaling pathways (Harada et al, 2016; Song & Meltzer, 2012). Altered signaling pathways may result in phenotypes of uncontrolled growth and increased capability to invade the surrounding tissue (Sun et al, 2016). The *Wnt signaling* pathway, found in our PPI of group A and B, is a well-known pathway involved in regulating self-renewal and oncogenesis in many systems, and has been reported to play an important role in

progression, metastasis, and invasion in ESCC (Cao et al 2016; Deng et al, 2015). Overexpression of *EGFR*, also found in both groups, is associated with aggressive biological behaviors in ESCC, and may play a role in Barrett carcinogenesis to stimulate cellular growth (Lin et al, 2015; Nicholas et al, 2013).

The *mTOR* (*mammalian target of rapamycin*) signaling pathway strongly correlates with growth factors, nutrients and the energy availability underlying cellular proliferation, adhesion, survival, and motility which is the conductive thread to malignant transformation of cells and tumor progression (Li et al, 2016). It is a key downstream effector of the *PI3K/Akt* (*phosphatidylinositol-3-kinase / serine/threonine kinase*) signaling pathway, which regulates several cellular processes that are critical for oncogenesis, and plays a modulating role in regulating stem-like cells in ESCC (Xia et al, 2018; Sun et al, 2016; Liu et al, 2013). At present, it remains unclear how *mTOR* signaling regulates ESCC cells specific expression of cell cycle proteins (Li et al 2016). Recently (Zhu et al, 2015) reported possible interactions between *mTOR* and environmental factors. Both signaling pathways were found in group A and B, with mTOR being exclusively expressed in the PPI of patients with more than 5 years after caustic ingestion.

Based on recent literature evidence demonstrating the regulatory role of miRNAs expressed in esophageal cancer samples on esophageal tissue tumorigenesis, we note the importance of our results. These denote the influence of the caustic lesion in the esophagus, even in the first years after injury, with possibility of malignant transformation mediated by genetic alterations. Moreover, based on our findings and literature data of molecular pathways on esophageal carcinogenesis, it is possible to hypothesize that the malignant transformation of caustic esophageal lesions may be through multiple signaling pathways, with special attention to those involving the mTOR / PIK3 / Akt complex.

CONCLUSION

There is no literature about miRNAs expression in caustic ingestion in children. miRNAs identified herein may be associated to the biology of the malignant transformation from caustic stenosis to esophageal cancer and may serve in the future as novel molecular markers malignancy progression. This study provided theoretical basis for future research on this field with this specific pediatric population. Further investigation is needed to elucidate the mechanism underlying the correlation and malignant transformation between caustic stenosis and cancer progression. Knowledge of cancer genetics helps health care practitioners providing tools to high-risk patients, such as those with caustic lesions, to make better decisions about prevention and intervention strategies, involving periodic screening, early detection, and (future) targeted therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research funds were obtained in part from the Coordination for the Improvement of Higher Level Education (CAPES #2014/458734-4). G.V.P. was funded through São Paulo Research Foundation (FAPESP) scholarship # 2015/03287-4. Authors have no conflicts of interest to disclose.

Table 1: Demographics and features of clinical presentations in our series

Pt.	Age (mo) / Sex	Accidental (Y/N)	Substance	Δt (years)	Dilatation (n.)	Esophagitis at biopsy (n. biopsies)
1	16 / M	Y	NaOH 50%	7	11	2 (3)
2	28 / M	Y	Acid	6	18	1 (2)
3	40 / M	Y	Caustic soda	3	17	2 (2)
4	36 / F	Y	Caustic soda	5	2	1 (2)
5	17 / M	Y	Caustic soda	10	30	1*
6	28 / F	Y	Caustic soda	4	0	4 (4)
7	13 / F	Y	Caustic soda	13	9	1(2)*
8	37 / F	Y	Caustic soda	2	0	0 (1)
9	24 / M	Y	NaOH 50%	3	0	0 (1)
10	43 / F	Y	Caustic soda	14	3	0 (3)
11	180 / F	N	Caustic soda	1	4	1*
12	20 / M	Y	Caustic soda	3	0	0 (1)
13	25 / M	Y	Caustic soda	1	7	1 (1)
14	172 / M	N	Caustic soda	1	1	1 (1)
15	31 / M	Y	Caustic soda	2	14	1 (1)

Pt: patient; M: male; F: female; Y: yes; N: no; Δt : time of follow-up; *: patient submitted to esophagectomy

Table 2: miRNA expression in esophageal tissue with caustic stenosis compared to normal tissue in children from Group A

miRNA	Fold Change (FC)	logFC	p-value
hsa-miR-886-5p	11.148	4,05	0.016
hsa-miR-205-5p	10.599	4,03	0.024
hsa-miR-29a-3p	7.340	3,87	0.011
hsa-miR-320a	4.994	3,70	0.042
hsa-miR-145-5p	0,29	-0,54	0.01
hsa-miR-126-3p	0,28	-0,55	0.034
hsa-miR-143-3p	0,184	-0,74	0.003
hsa-miR-125a-5p	0,15	-0,82	0.006
hsa-miR-141-3p	0,081	-1,09	0.003
hsa-miR-133a-3p	0,058	-1,24	0.002
hsa-miR-103a-3p	0,034	-1,47	0.011
hsa-miR-139-5p	0,034	-1,47	0.016
hsa-miR-95-3p	0,026	-1,59	0.012

Table 3: miRNA expression in esophageal tissue with caustic stenosis compared to normal tissue in children from Group B

miRNA	Fold Change (FC)	logFC	p-value
hsa-miR-342-3p	2.272	3,36	0.043
hsa-miR-374b-5p	2.055	3,31	0.022
hsa-miR-574-3p	0,31	-0,51	0.019
hsa-miR-744-5p	0,18	-0,74	0.037

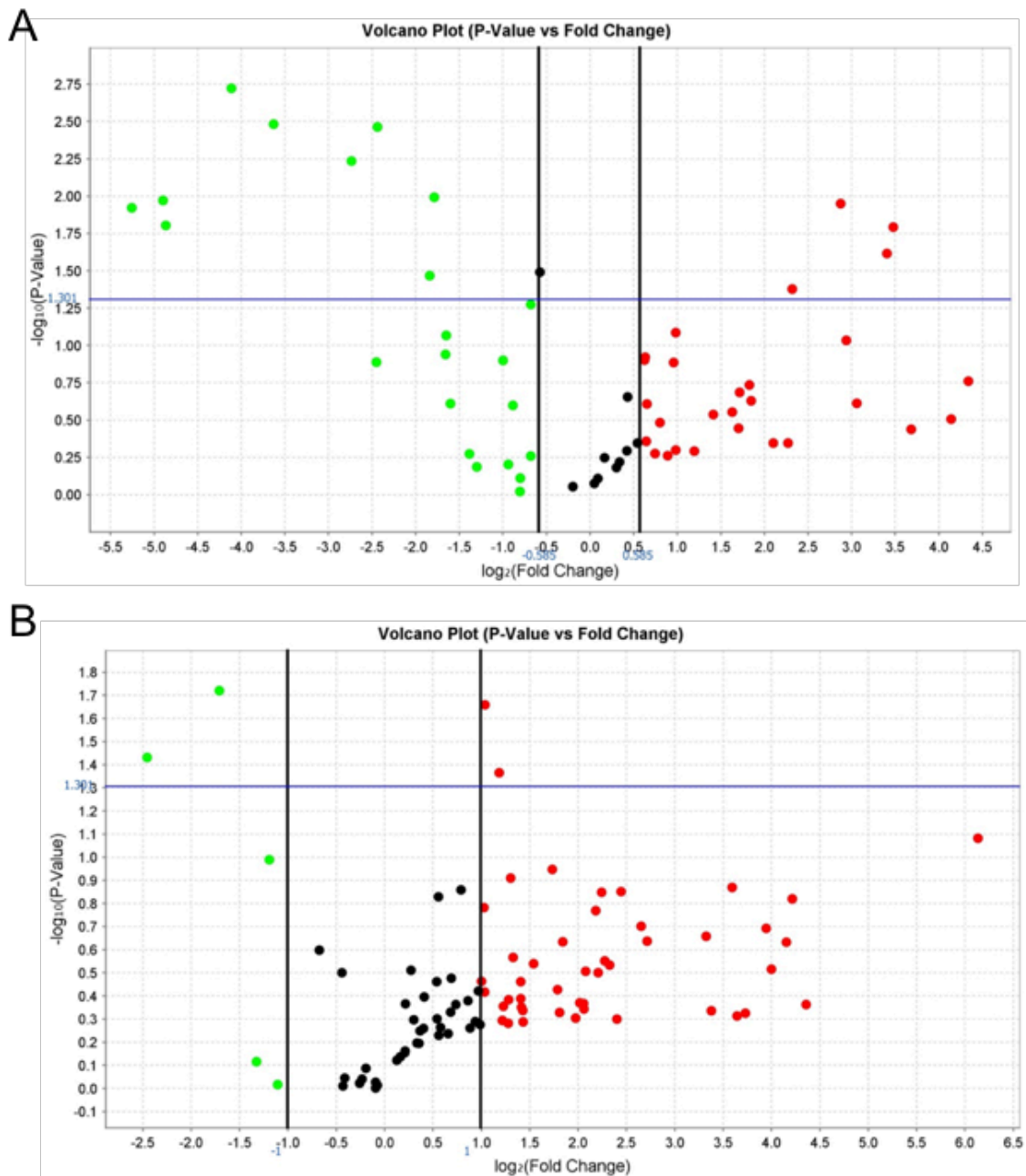


Figure 1: miRNA expression profiles in esophageal mucosa of patients after caustic ingestion. Volcano plot showing significantly deregulated ($FC \geq 1.5$ and $p < 0.05$) miRNAs in (A) group A, with less than five years after ingestion and (B) group B with more than five years. Green and red dots represent significantly under-expressed and over-expressed miRNAs, respectively

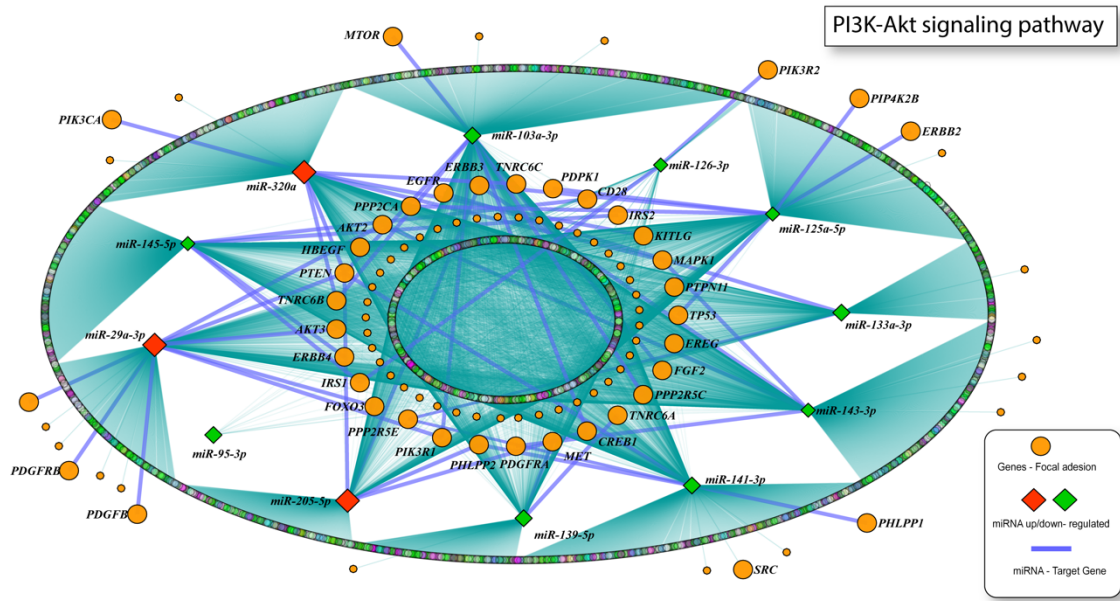


Figure 2: PPI interaction network between miRNAs deregulated in group A and predicted mRNA targets related to PI3K/Akt signaling pathway and esophageal cancer.

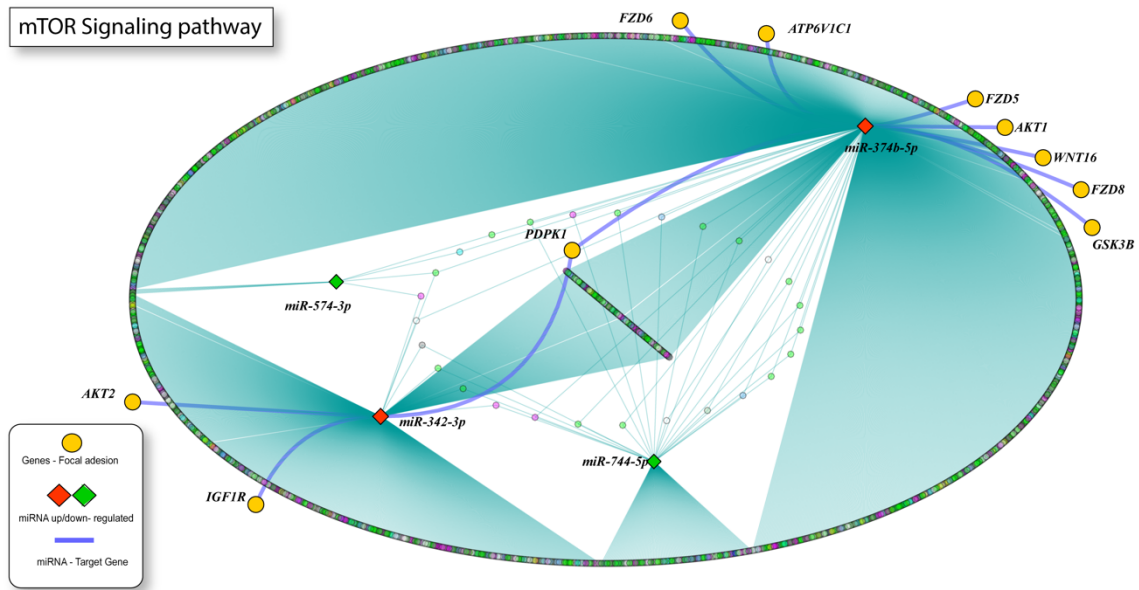


Figure 3: PPI interaction network between miRNAs deregulated in group B and predicted mRNA targets related to mTOR signaling pathway and esophageal cancer.

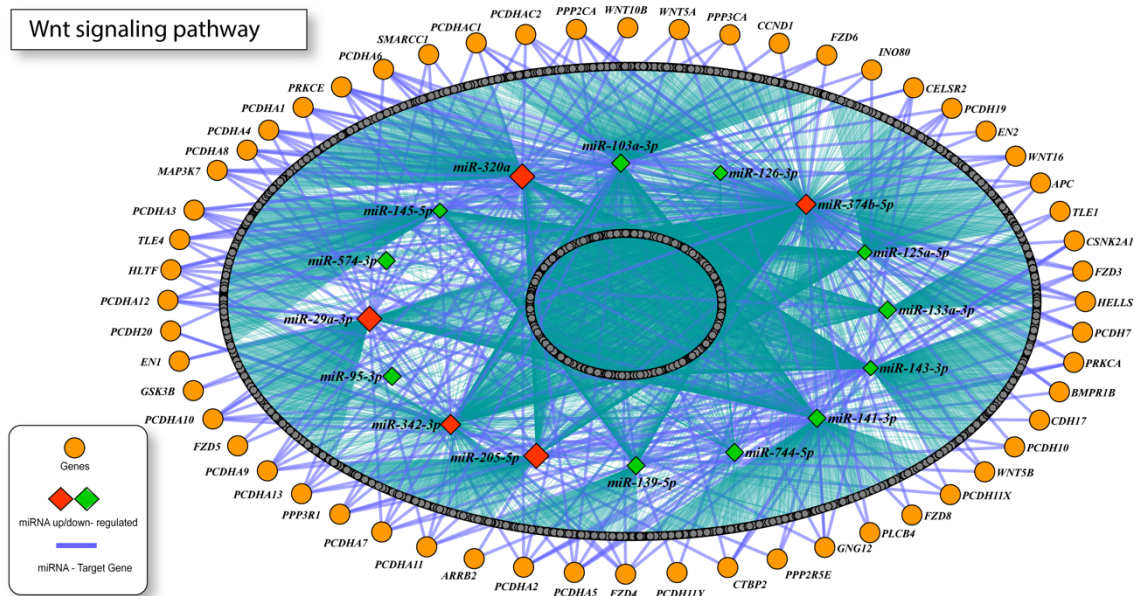


Figure 4: PPI interaction network between miRNAs deregulated in both groups and predicted mRNA targets related to Wnt signaling pathway and esophageal cancer.

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.; Scaillen, 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 suppressor 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 β 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.; Ibarquen-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.

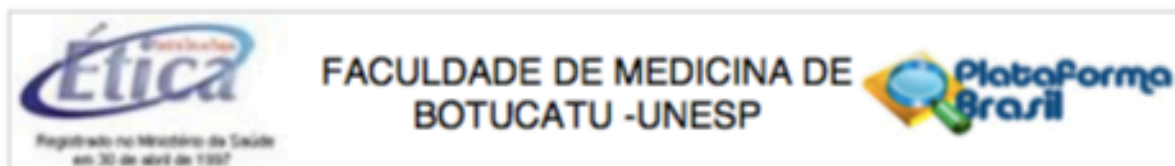
Zhang N, Fu H, Song L, Ding Y, Wang X, Zhao C and Zhao Y, Jiao F and Zhao Y: MicroRNA-100 promotes migration and invasion through mammalian target of rapamycin in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 32:1409–1418. 2014.

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- κ B pathway. Biochem Biophys Res Commun_ 2015;457(3):370-7.

Apêndice 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de expressão de microRNAs no esôfago de crianças com estenose cáustica

Pesquisador: Wilson Elias de Oliveira Júnior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 44933115.9.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Cirurgia e Ortopedia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.089.452

Data da Relatoria: 01/06/2015

Apresentação do Projeto:

Lesões esofágicas cáusticas são frequentes na população pediátrica, sendo a maioria de natureza acidental (85%). Ingestões de pequena quantidade de substâncias cáusticas podem ser suficientes para resultar em severa morbi-mortalidade. A longo prazo pode ocorrer estenose esofágica, necessitando de procedimentos de dilatação endoscópica, e em alguns casos mais severos esofagectomia com interposição colônica. Nesses pacientes existe risco aumentado para desenvolvimento do carcinoma espinocelular de esôfago (CECE), por isso, biopsias seriadas para rastreamento de displasias são recomendadas para pacientes em seguimento por lesões cáusticas severas. Desta forma, esta pesquisa tem como objetivo avaliar o perfil de expressão de miRNAs em biopsias de mucosa esofágica em material parafinado de crianças portadoras de lesões por ingestão de cáusticos, visando fazer o diagnóstico precoce de transformações malignas.

Objetivo da Pesquisa:

Esta pesquisa tem como objetivo identificar marcadores moleculares precoces de lesões esofágicas, obtidas através de biopsia endoscópica rotineira, tornando possível a detecção precoce de displasia em nível molecular através do estabelecimento de perfis de expressão de miRNAs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos desta pesquisa são mínimos, visto se tratar de análise de biopsias esofágicas contidas

Endereço: Chácara Buínoili, s/n

Bairro: Rubião Júnior

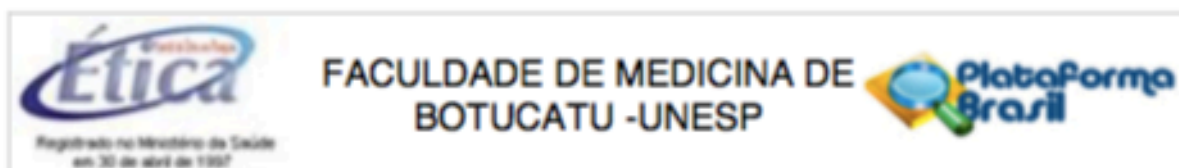
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.089.452

em blocos de parafina e por não envolver contato direto com os pacientes. Esta pesquisa não envolve benefícios diretos aos pacientes, mas poderá no futuro auxiliar na detecção precoce de displasias esofágicas em portadores de lesão esofágica induzida por cáusticos, abrindo possibilidades terapêuticas a nível molecular específico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão analisadas biópsias esofágicas obtidas endoscopicamente de forma retrospectiva de pacientes menores de 18 anos, portadores de lesão esofágica induzida por cáusticos, estando ou não em seguimento no programa de dilatação esofágica do serviço de Cirurgia Pediátrica e Endoscopia Digestiva Pediátrica do HC/FMB. Serão excluídos pacientes portadores de cirrose hepática, intoxicações por drogas, insuficiência renal crônica, neoplasias, doenças psiquiátricas, choque com hipoperfusão, e aqueles com lesões esofágicas relacionadas a trauma. Serão analisadas 20 amostras de mucosa esofágica de pacientes portadores de lesão esofágica induzida por cáusticos e 10 amostras controles, com indivíduos pareados por idade, mas não pareados por sexo no período de 2000 a 2015. O RNA dos tecidos emblocados em parafina será extraído e a análise de 384 miRNAs humanos será feita utilizando-se a plataforma TaqMan® Array Human MicroRNA. Softwares específicos serão utilizados para comparar os perfis de miRNAs entre casos e controles.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE (Pais ou Responsáveis Legais) e o Termo de Assentimento (Pais ou Responsáveis Legais e Criança/Adolescente) estão escritos de forma clara com informações sobre os objetivos da pesquisa, sigilo e participação voluntária dos envolvidos.

Todas as demais autorizações pertinentes foram incluídas. O projeto terá financiamento próprio.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a análise do processo CAAE: 44933115.9.0000.5411, sou de parecer favorável a sua aprovação sem a necessidade de envio do mesmo a CONEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

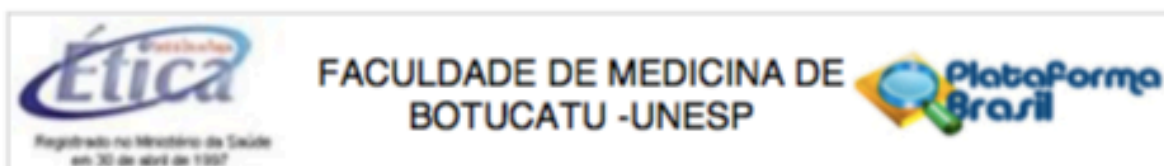
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 01 de Junho de 2015, sem

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



Continuação do Parecer: 1.089.452

necessidade de envio à CONEP.

Ao final da execução do estudo é necessário apresentar ao CEP o "Relatório Final de Atividades".

BOTUCATU, 01 de Junho de 2015

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

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