



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**SÍLVIA MARIA PERRONE CAMILO**

**GASTRINEMIA E EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS G, D  
E ENTEROCROMAFIM-LIKE NO ESTÔMAGO DE PACIENTES USADORES  
CRÔNICOS DE INIBIDORES DE BOMBA DE PRÓTONS INFECTADOS OU  
NÃO PELO *HELICOBACTER PYLORI***

**UBERABA-MG**

**2020**

**SÍLVIA MARIA PERRONE CAMILO**

**GASTRINEMIA E EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS G, D  
E ENTEROCROMAFIM-LIKE NO ESTÔMAGO DE PACIENTES USADORES  
CRÔNICOS DE INIBIDORES DE BOMBA DE PRÓTONS INFECTADOS OU  
NÃO PELO *HELICOBACTER PYLORI***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Medicina Translacional, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Dra. Renata Margarida Etchebehere.

Co-orientadora: Dra. Élia Cláudia de Souza Almeida

**UBERABA**

**2020**

ii

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

C19g Camilo, Sílvia Maria Perrone  
Gastrinemia e expressão imunohistoquímica das células G,  
D e enterocromafim-*like* no estômago de pacientes usuários  
crônicos de inibidores de bomba de prótons infectados ou não  
pelo *Helicobacter pylori* / Sílvia Maria Perrone Camilo. -- 2020.  
68f. il.: fig., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Fe-  
deral do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2020  
Orientadora: Dra. Renata Margarida Etchebehere  
Coorientadora: Profa. Dra. Élia Cláudia de Souza Almeida

1. Gastroenteropatias. 2. Omeprazol. 3. Gastrinas. 4. Soma-  
tostatina. 5. Células Tipo Enterocromafim. 6. *Helicobacter pylori*.  
I. Etchebehere, Renata Margarida. II. Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.33

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Membros Titulares**

Dra. Millena Prata Jammal, Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON),

Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia/ UFTM/ Uberaba, Minas Gerais;

Dr. Rodolfo Pessato Timoteo, Instituto de Ciências da Saúde, Disciplina de Patologia Especial/ UFTM/ Uberaba, Minas Gerais;

Dra. Renata Calciolari Rossi, Departamento de Patologia, Disciplina de Patologia/ UNOESTE/ Presidente Prudente, SP

Dr. Cesar Penazzo Lepri, Departamento de Biomateriais, Disciplina Clínica Odontológica Integrada/ UNIUBE/ Uberaba, Minas Gerais;

Dra. Renata Margarida Etchebehere – orientadora, Subunidade de Patologia Cirúrgica, Hospital de Clínicas/UFTM, Uberaba, Minas Gerais.

### **Membros Suplentes**

Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, Disciplina Agressão, Defesa, Adaptação e Doença/ UNIUBE/ Uberaba, Minas Gerais;

Dr. Gilberto Antônio Borges, Disciplina Materiais Dentários/ UNIUBE/ Uberaba, Minas Gerais;

Dra. Fernanda Oliveira Magalhães, Disciplina de Semiologia/ UNIUBE/ Uberaba, Minas Gerais;

Dra. Sanívia Aparecida de Lima Pereira, Disciplina Laboratório de Biopatologia e Biologia Molecular, CEFORES/ UFTM/ Uberaba, Minas Gerais;

Dra. Fernanda Rodrigues Helmo, Pós-graduação em Ciências da Saúde,  
Disciplina de Imunologia/ UFTM/ Uberaba, Minas Gerais;

Dra. Márcia Fernandes de Araujo, Disciplina Laboratório de Biopatologia e  
Biologia Molecular, CEFORES/ UFTM/ Uberaba, Minas Gerais

**Defesa da Tese:** 30 de abril de 2020

**Aos meus pais,**

*Hamilton Perrone (in memorian) e Sidney Nazareth Gonçalves Perrone agradeço a Deus por tê-los tido como pais, exemplos em minha vida. Vocês estiveram sempre ao meu lado, me encorajando em todos os momentos de dificuldade e vibrando a cada conquista. Agradeço também, por me darem dois irmãos queridos: Elizabeth Regina Perrone e Hamilton Antônio Perrone.*

**Ao meu esposo,**

*Luiz Humberto Camilo, pela sua presença em minha vida, me apoiando sempre, e com sua sabedoria inata, me ajudando a realizar os nossos projetos. Agradeço-o muito mais porque juntos construímos a nossa família, minha obra prima.*

**Aos meus filhos,**

*Luana Perrone Camilo e Lucas Perrone Camilo, meus amados filhos, por me darem a oportunidade de conhecer o maior amor do mundo: o de ser mãe. Por eles, me esforço a cada dia para me tornar uma pessoa melhor e ser um exemplo em suas vidas. Vocês são motivo de orgulho de toda nossa família.*

## AGRADECIMENTOS

**À Deus** pela saúde, força e coragem para concretizar meus planos. Agradeço pela fé que dá sentido a tudo e vontade de continuar sempre lutando para melhorar.

**À minha orientadora Dra. Renata Margarida Etchebehere**, principalmente pela amizade, pela oportunidade da convivência, sempre com sabedoria e com palavras de incentivo. Agradeço pela confiança e por ter acreditado que com sua orientação e auxílio faríamos um bom trabalho. Fica aqui toda a minha gratidão e admiração pela sua competência profissional e postura ética.

**Aos pacientes** que participaram do estudo, tornando possível a realização desta tese.

**À Universidade Federal do Triângulo Mineiro** por me acolher desde a minha graduação, residência médica, mestrado e agora me dando oportunidade de realizar mais este projeto. A Universidade é meu segundo lar, e faz do meu trabalho motivo de prazer e satisfação.

**A todos** aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram durante a realização desta tese e que não foram citados anteriormente.

## RESUMO

CAMILO, Sílvia Maria Perrone. **Gastrinemia e expressão imunohistoquímica das células G, D e enterocromafim-like no estômago de pacientes usadores crônicos de inibidores de bomba de prótons infectados ou não pelo *Helicobacter Pylori***. 2020. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba (MG), 2020.

**Introdução:** A inibição ácida com o uso crônico de inibidores de bomba de prótons e o possível aumento da gastrina podem ser seguidos de alterações na regulação da produção do ácido clorídrico. No entanto, não se sabe se esse uso crônico altera a presença de células G, D e enterocromafin-like no estômago ou a razão entre as células G e D em humanos. **Objetivo:** Avaliar o número de células G - produtoras de gastrina, células D – produtoras de somatostatina e células ECL – produtoras de histamina, em pacientes usadores crônicos de inibidores de bomba de prótons (mais de 6 meses), com ou sem infecção pelo *Helicobacter pylori*. **Material e Método:** Biópsias de 105 pacientes, 81 usadores crônicos de inibidores de bomba de prótons e 24 controles, foram processados imuno-histoquimicamente e submetidas à contagem de células G, D e ECL em campos microscópicos de grande aumento e em 10 glândulas. **Resultados:** Células G, D e ECL foram semelhantes entre os grupos e parece não serem afetadas pela infecção por *Helicobacter pylori*. A razão células G/D foi maior no grupo dos usadores crônicos de IBP do que nos controles. **Conclusão:** O uso crônico de inibidores de prótons parece não interferir na contagem das células G, D e ECL, porém interfere na razão entre as células G e D. Estudos de longo prazo, especialmente incluindo pacientes que usam IBP por > 3 anos, são necessários para definir o período de uso que pode levar a uma mudança significativa no número das células da mucosa do estômago.

**Palavras-chave:** Omeprazol. Gastrina. Somatostatina. Células ECL. *Helicobacter pylori*.



## ABSTRACT

CAMILO, Sílvia Maria Perrone. **Gastrinemia and immunohistochemical expression of G, D and enterocromafim-like cells in the stomach of chronic user patients of proton pump inhibitors infect or not by the *Helicobacter pylori***. 2020. 68 f. Thesis (Doctorate in Health Sciences) - Triângulo Mineiro Federal University, Uberaba (MG), 2020.

**Background:** Acid inhibition from chronic proton pump inhibitor use and a possible increase in gastrin can lead to changes in the regulation of hydrochloric acid production. However, it has not known whether such chronic use changes the presence of G, D, and enterochromaffin-like cells in the stomach or the relationship between G and D cells. **Objective:** To analyze the number of gastrin-producing G cells, somatostatin-producing D cells, and histamine-producing ECL cells in patients who are chronic proton pump inhibitor users (more than 6 months), with or without related *Helicobacter pylori* infection. **Materials and Methods:** Biopsies from 105 patients, including 81 chronic PPI users and 24 controls, were processed immunohistochemically and subjected to counting of G, D, and ECL cells in high-magnification microscopic fields and in 10 glands. **Results:** G cell, D cell, and ECL cell counts were similar across the groups, and appeared to be unaffected by *Helicobacter pylori* infection. The ratio between G/D cells was higher in the chronic PPI users group than in controls. **Conclusion:** Chronic PPI use does not affect G cell, D cell, and ECL cell counts significantly, but may alter the ratio between G cells and D cells. Longer-term studies, especially inclusive of patients who have used PPIs for >3 years, are needed to define the period of use that may lead to significant shift in stomach mucosal cell populations.

**Keywords:** Omeprazole. Gastrin. Somatostatin. ECL cells. *Helicobacter pylori*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATPase	Adenosinatrifosfatases
Células D	Células produtoras de Somatostatina
Células G	Células produtoras de Gastrina
CE	Células enterocromafins
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
ECL	Enterocromaphin Cell Like
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
HC	Hospital de Clínicas
HDC	Histidina descarboxilase
HE	Hematoxilina-eosina
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
IBP	Inibidores da Bomba de Prótons
IHQ	Imunohistoquímica
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
WS	Whartin-Starry
SNC	Sistema nervoso central

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inibidores da bomba de prótons.....	<b>14</b>
Figura 2. Regulação fisiológica e farmacológica da secreção gástrica: a base para a terapia das doenças ácido-péptica.....	<b>15</b>
Figura 3. A- Anticorpo anti-célula G (LSBIO®-USA); B Anticorpo anti-célula D (SANTA CRUZ®-USA); C Anticorpo anti-enzima histidina descarboxilase (HDC-PROGEN®-USA).....	<b>30</b>

## SUMÁRIO

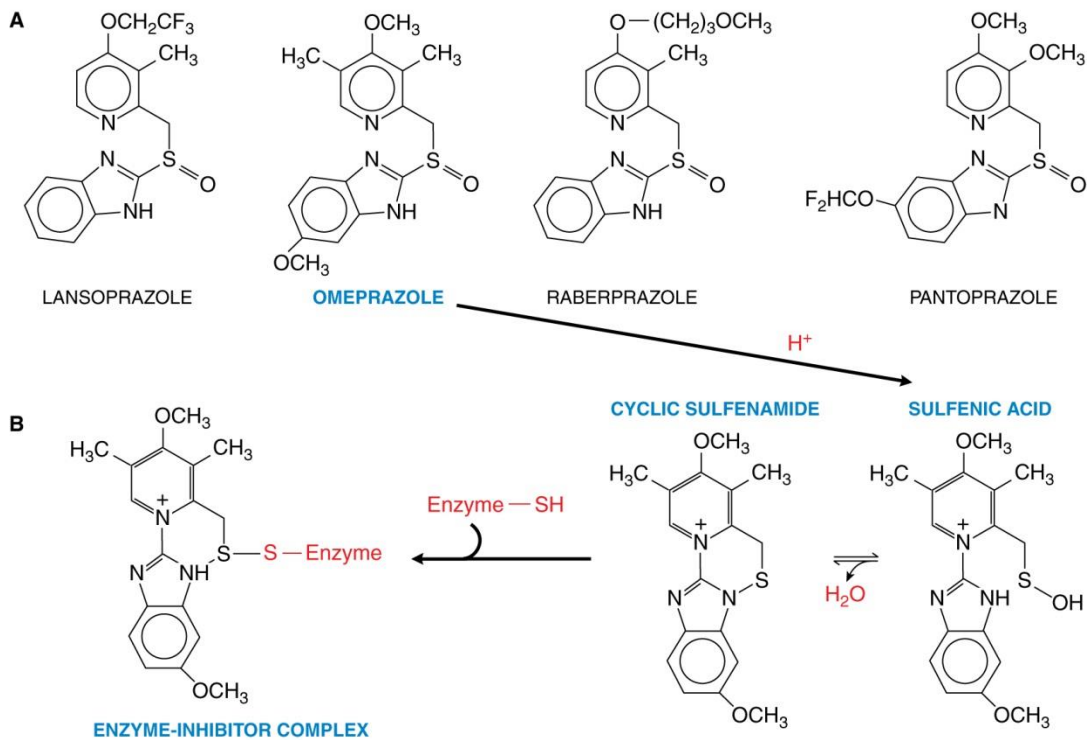
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	<b>26</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>6 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>31</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>52</b>
7.1 CONCLUSÕES GERAIS .....	52
7.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>60</b>
ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	60
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	61
ANEXO C - QUESTIONÁRIO .....	66
ANEXO D – ACEITE DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO .....	67

## INTRODUÇÃO

Os IBP são os supressores mais potentes da secreção de ácido gástrico. Nas doses habituais, esses fármacos diminuem a produção diária de ácido (basal e estimulada) em 80-95% (WALLACE; SHARKEY, 2012). São pró-fármacos que exigem a ativação em ambiente ácido. Após a sua absorção na circulação sistêmica, o pró-fármaco difunde-se nas células parietais do estômago e acumula-se nos canalículos secretores ácidos, onde é ativado pela formação de uma sulfenamida tetracíclica catalisada por prótons, retendo o fármaco de modo que não pode difundir novamente através da membrana canalicular (Figura 1). A seguir, a forma ativada liga-se de modo covalente a grupos sulfidríla de cisteínas na  $H^+$ ,  $K^+$  - ATPase, inativando irreversivelmente a molécula da bomba (Figura 2). A secreção de ácido só retorna após a síntese de novas moléculas da bomba e sua inserção na membrana luminal, proporcionando, assim, uma supressão prolongada da secreção ácida (de até 24 a 48 horas), apesar das meias-vidas plasmáticas muito mais curtas do composto original (0,5 a 2 horas). Como bloqueiam a etapa final na produção de ácido, os IBP são eficazes na supressão ácida, independentemente de outros fatores estimuladores (WALLACE; SHARKEY, 2012). Além disso, sabe-se que os IBP não só inibem a secreção de ácido gástrico bloqueando  $H^+$ ,  $K^+$  - ATPase nos passos terminais do processo de secreção de ácido gástrico, mas também protegem a mucosa gástrica (KATAGIRI et al., 2005).

Os inibidores de bomba de prótons (IBP) são amplamente utilizados por milhões de pessoas para indicações e durações que não foram bem testadas ou aprovadas. Estes medicamentos estão disponíveis sem receita médica em alguns países e geralmente são considerados como classes seguras de terapêutica (XIE et

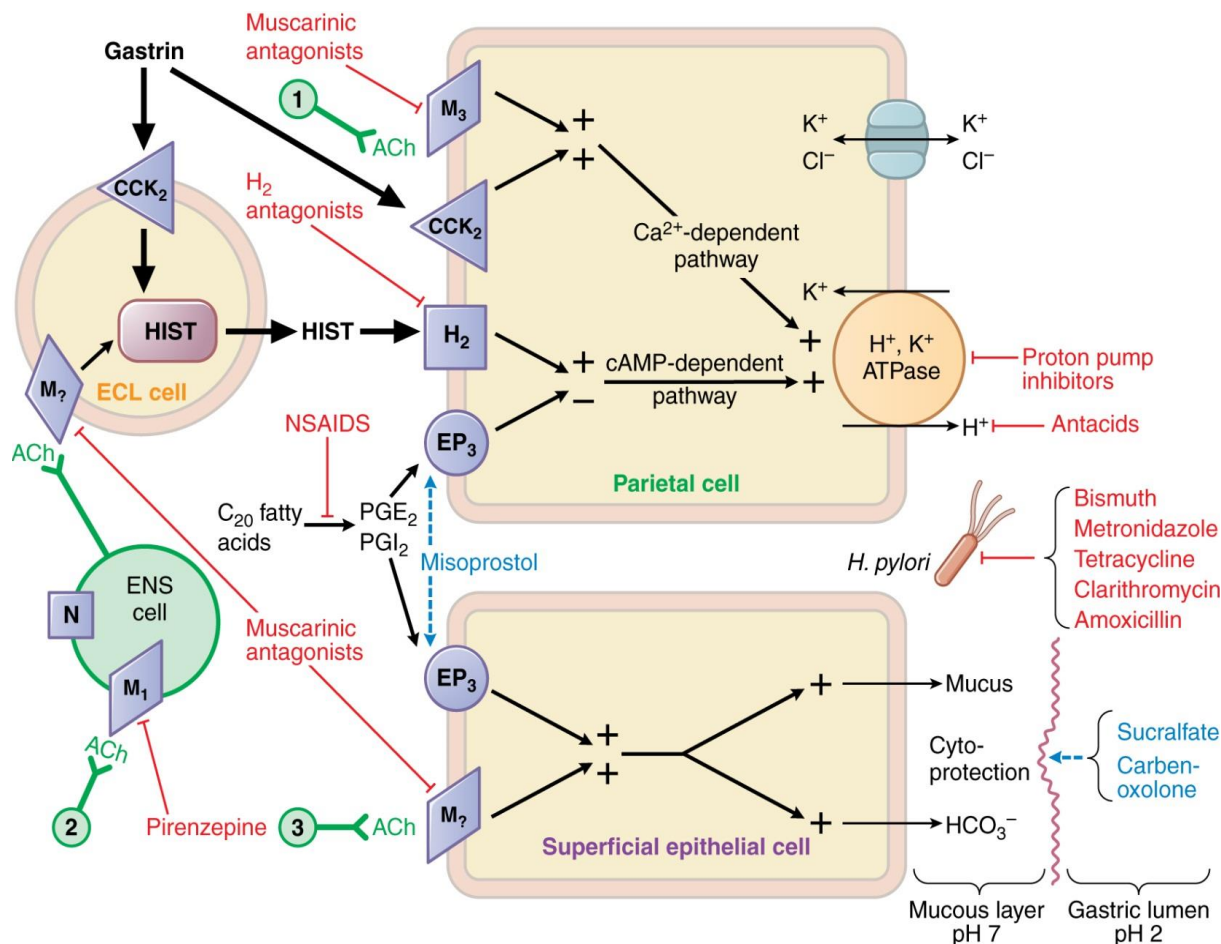
al., 2017). Tem-se estimado que até 10% da população usam IBP (WALDUM; SORDAL; MJONES, 2019). Eles são muitas vezes prescritos, e frequentemente começaram de forma inadequada durante uma internação hospitalar, e seu uso se estende para uma duração prolongada sem indicação médica apropriada. Resultados de dados representativos do National Health and Nutrition Examination Survey, onde as análises foram ponderadas para representar a população adulta dos Estados Unidos da América, mostraram que o uso de IBP nas prescrições aumentou de 3,9% para 7,8% de 1999-2000 para 2011-2012, representando uma duplicação do índice de prescrições. Os estudos estimam que entre 53% e 69% das receitas de IBP são para indicações inadequadas, onde os benefícios do uso podem não justificar os riscos para muitos usuários (XIE et al., 2017). A farmácia vigilância deve ser encorajada a enfatizar a necessidade de limitar o uso e a duração da terapia para casos em que haja uma indicação médica clara e onde o benefício supere o risco potencial (XIE et al., 2017).



Fonte: WALLACE; SHARKEY, 2012

Figura 1. Inibidores da bomba de prótons.

**A.** Inibidores da H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase gástrica (bomba de prótons). **B.** Conversão de omeprazol em uma sulfenamida nos canalículos secretores ácidos da célula parietal. A sulfenamida interage covalentemente com grupos sulfidríla na bomba de prótons, inibindo assim irreversivelmente sua atividade. Os outros três inibidores da bomba de prótons sofrem conversões análogas.



Fonte: WALLACE; SHARKEY, 2012

Figura 2. Regulação fisiológica e farmacológica da secreção gástrica: a base para a terapia de distúrbios ácido-pépticos. São mostradas as interações entre uma célula do tipo enterocromafin (ECL) que secreta histamina, uma célula ganglionar do sistema nervoso entérico (ENS), uma célula parietal que secreta ácido e uma célula epitelial superficial que secreta muco e bicarbonato. As vias fisiológicas, mostradas em preto sólido, podem ser estimulatórias (+) ou inibitórias (-). 1 e 3 indicam possíveis entradas de fibras colinérgicas pós-ganglionares; 2 mostra entrada neural do nervo vago. Os agonistas fisiológicos e seus respectivos receptores de membrana incluem receptores acetilcolina (ACh), muscarínicos (M) e nicotínicos (N); gastrina, receptor de colecistoquinina 2 (CCK2); histamina (HIST), receptor H<sub>2</sub>; e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), receptor EP<sub>3</sub>. Em vermelho indica alvos de antagonismo farmacológico. Uma seta tracejada azul clara indica uma ação do medicamento que imita ou aprimora um caminho fisiológico. Mostrados em vermelho são os medicamentos usados para tratar distúrbios pépticos-ácidos.



Os AINEs são anti-inflamatórios não esteróides, que podem induzir úlceras por inibição da ciclo-oxigenase. O Omeprazol é o IBP mais utilizado no tratamento da úlcera péptica, doença de refluxo gastroesofágico e na erradicação do *Helicobacter pylori* (HP) em combinação com amoxicilina e claritromicina (KATAGIRI et al., 2005). O tratamento com Omeprazol pode resultar em um aumento nos níveis da gastrina sérica. A hipergastrinemia acontece por um mecanismo de *feedback* negativo entre o pH intragástrico e a atividade da célula G antral (LAMBERTS et al., 1988). O aumento da gastrina por volta de 200-250 pg/ml depende do grau e duração da inibição da secreção ácida, e atinge um platô por volta de 3 meses de tratamento (LAMBERTS et al., 1993). Essa hipergastrinemia é responsável, em alguns pacientes, pela hipersecreção rebote de ácido que acontece após interrupção dos IBP (WALDUM; SORDAL; MJONES, 2019). Entretanto, os níveis retornam ao normal após a interrupção (SMITH; NADELLA; OSBORNE, 2017). Arroyo Villarino et al. (1997) observaram que o aumento nos níveis da gastrina com o uso de omeprazol em 1,5 vezes o valor normal acontece no primeiro mês de tratamento e permanece estável durante o resto do tratamento no período de 24 meses. Por outro lado, Cheung e Leung (2019) relataram que o aumento nos níveis da gastrina acontece em pacientes usuários crônicos de IBP por mais de 3 anos.

Sabe-se que a gastrina é caracterizada por sua capacidade trófica (DELLE FAVE et al., 1998). Os relatos de hiperplasia de células enterocromafim-*like* (ECL) e carcinoides gástricos reportado em 45% dos ratos tratados por 2 anos com Omeprazol 140 pg/kg, surgiram dúvidas sobre a segurança dessa droga em humanos. Deve-se notar que a dose usada foi aproximadamente 500 vezes a dose atualmente usada em humanos, e que os ratos foram tratados durante toda a sua vida (ARROYO VILLARINO et al., 1997).

Estudo com animais mostrou que o tratamento a longo prazo com Omeprazol produziu alterações significativas na população das células endócrinas no antro; isto é, pronunciado aumento na densidade das células G combinada com uma diminuição na densidade das células D e conseqüentemente um marcado aumento na razão células G/D. Estas observações suportam a hipótese que a razão nas células do antro G/D é governada pelo pH intragástrico. No entanto, alterações dessa magnitude não têm sido observadas em estudos em humanos (LAMBERTS et al.,1988).

Liu et al. (2005) citam que, na mucosa do corpo gástrico, as células semelhantes à ECL formam uma proporção importante das células endócrinas, no entanto, nenhum estudo foi realizado para definir as porcentagens exatas dessas células endócrinas. Outros autores observaram que o tratamento com Omeprazol a longo prazo resultando em hipergastrinemia e em um aumento significativo na densidade de células argidófilas depois de um ano de tratamento é encontrado somente em um pequeno grupo de pacientes estudados por mais de 24 meses (CREUTZFELDT et al., 1989).

Arnold e Koop (1989) não notaram diferenças nas células endócrinas gástricas G, D e ECL em pacientes tratados com Omeprazol por até 2 anos. O efeito nas células endócrinas observados em animais durante os estudos incluem aumento das células G antrais, diminuição de células antrais D e aumento das células ECL fúndicas. O aumento de células G e a diminuição das células D é a consequência de acloridria alcançada por doses muito elevadas de Omeprazol e resulta em hipergastrinemia. As doses terapêuticas no homem não produzem acloridria completa. Portanto, os níveis séricos de gastrina aumentam durante o tratamento

com Omeprazol apenas moderadamente e são similares em magnitude aos que ocorre após a vagotomia proximal seletiva (ARNOLD; KOOP, 1989).

Assim, outros estudos devem ser feitos para melhor conhecimento das consequências do uso dos IBP, principalmente após mais tempo de uso e seu sinergismo com a infecção por HP e com a atividade inflamatória da bactéria.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Estudos de anatomia e fisiologia comparativa indicam que a secreção de ácido gástrico foi desenvolvida durante a evolução dos vertebrados há aproximadamente 350 milhões de anos atrás (POHL et al., 2008).

Nos mamíferos, a produção de ácido gástrico e o armazenamento temporário de alimentos ocorrem no estômago (BEASLEY et al., 2015). O estômago é uma porção muscular e caracteristicamente curvada do canal digestivo proximal que está presente em todos os vertebrados com mandíbulas que requerem armazenamento de alimentos ou digestão preliminar em um ambiente ácido. Para acomodar as variações da dieta, o tamanho e a forma do estômago variam amplamente entre as espécies de vertebrados e os vários compartimentos funcionais ocupam diferentes frações do órgão (KIM; SHIVDASANI, 2016).

Sabe-se que espécies que se alimentam de matéria em decomposição têm uma acidez gástrica significativamente maior em comparação com espécies que se alimentam de insetos, folhas ou frutos. Por si só, os padrões estão de acordo com a hipótese de que o papel do estômago é inibir a entrada microbiana no intestino, embora esses padrões também possam ser explicados por outros fenômenos, os carnívoros precisam mais de ácido para lise de proteína, sendo a secreção de pepsinogênio e sua ativação em pepsina no estômago modulada por um pH ácido (BEASLEY et al., 2015).

O ácido gástrico desempenha um papel importante na regulação da função gástrica, protegendo contra agentes patogênicos gastrointestinais, facilitando a digestão e absorção de certos nutrientes e modulando o comportamento alimentar,

tornando-se claro que o ácido gástrico tem efeitos clinicamente relevantes no mundo desenvolvido (POHL et al., 2008).

O estômago produtor de HCl é composto por duas regiões principais, a mucosa oxíntica e a antral. Na mucosa oxíntica, localizam-se as células parietais secretoras de ácido, porção que constitui 80% da mucosa gástrica secretora de ácido. A mucosa oxíntica encontra-se no corpo gástrico proximal e fundo. Na mucosa oxíntica encontram-se as células secretoras de histamina, ECL e células principais secretoras de pepsinogênio. A mucosa distal representa 20% da mucosa gástrica e contém glândulas pilóricas antrais com células G secretoras de gastrina. Ambas as regiões incluem células mucosas superficiais, células mucosas do colo, células enterocromafins (CE) e células D, que secretam um importante peptídeo regulador, a somatostatina (GOO; AKIBA; KAUNITZ, 2010; KAKEHASI, 2003; MOREIRA, 2011; RODRIGUES, 2007)

Como já mencionado, a secreção de ácido é uma função importante do estômago humano realizada pela célula parietal, a qual possui uma estrutura de forma piramidal, com citoplasma repleto de mitocôndrias, com abundantes lisossomos e uma organela especializada túbulo-vesicular. A membrana apical contém canalículos secretores; esses canais se projetam no interior da célula e se comunicam. Essas células têm dois estágios estruturais diferentes, os estados de repouso e secretório. No estado de repouso, os canalículos apicais são revestidos com microvilos; os microfilamentos de actina e as proteínas de ligação à actina os apóiam. A membrana apical da célula parietal em repouso tem uma área limitada, mas uma exposição luminal mais proeminente é alcançada pela invaginação dessa membrana no citoplasma, formando assim o canalículo secretório, em seu estado

colapsado. Em contraste, durante o seu estado de secreção, o compartimento túbulo-vesicular parece estar esgotado devido à fusão e transferência das membranas túbulo-vesiculares para a membrana apical. Essa atividade também resulta no alongamento dos microvilos intra-canaliculares. Constata-se que essas túbulo-vesículas desenvolvem interconexões durante a presença de um estímulo, e a bomba de ácido gástrico é transportada dessas túbulo-vesículas para a membrana apical, culminando no estado ácido-secretório (VARELA; SEGURA, 2019).

Nos seres humanos, apesar da variação da secreção, o ácido é continuamente secretado pela mucosa gástrica. Durante os períodos de jejum, a taxa de secreção de ácido é baixa, mas suficiente para manter um pH intragástrico abaixo de 2. A regulação da secreção de ácido gástrico é conseguida pela interação entre as duas principais células endócrinas gástricas: a célula G produtora de gastrina e a célula de D de somatostatina. Regulação destas células ocorre através de estímulo ou inibição parácrina, endócrina e neural (LIU et al., 2005).

Quando o alimento entra no estômago, o componente proteico estimula as células G situadas na região do antro do estômago para liberar o hormônio gastrina, que estimula as células ECL para liberar histamina e as células parietais a secretar ácido. Como a acidez do estômago e do duodeno aumenta, as vias de *feedback* de proteção são ativadas para inibir a secreção de ácido. Um importante controle inibitório mediado pelo ácido está relacionado com a liberação de somatostatina por células D, a qual exerce controle inibitório parácrino na liberação de gastrina pelas células G antrais (LIU et al., 2005).

A somatostatina, um polipéptido de 14 aminoácidos, é amplamente distribuída nas ilhotas pancreáticas, no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central. No estômago e nas ilhotas pancreáticas, a somatostatina está presente nas células D, enquanto no intestino e SNC está presente nos neurônios (KATAGIRI et al., 2005).

No trato gastrointestinal, a somatostatina é liberada através do estímulo de nutrientes (por exemplo, proteínas e aminoácidos) e gastrina. Geralmente, a somatostatina age como inibidor da liberação de outros hormônios como a insulina, gastrina, motilina e secretina (KATAGIRI et al., 2005).

No antro de um indivíduo normal, as células G representam 50% das células endócrinas e as células D 15%. Localizam-se nos dois terços superiores e no terço inferior da mucosa, respectivamente. As células D são encontradas também no corpo gástrico, onde representam cerca de 8% das células endócrinas (BARBUTO, 2008; LIU et al., 2005).

A razão entre a área e o número de células G e D tende a permanecer constante, sendo regulada pela estimulação e inibição de mecanismos parácrinos (histamina), endócrinos (gastrina e somatostatina) e nervosos (fibras vagais) (BARBUTO, 2008).

O aumento na razão células G/D indica um distúrbio funcional no trato gastrointestinal, e pode ser observado na gastrite, nas lesões ulceradas da mucosa e na infecção por HP, onde o número de células G é significativamente mais elevado que o número de células D (BARBUTO, 2008). Essas alterações correlacionam-se melhor com a gravidade da inflamação do que com a densidade do HP (BARBUTO, 2008).

A infecção por HP é uma das infecções mais comuns em todo o mundo e é a principal causa global de gastrite. No entanto, estudos recentes mostraram que sua prevalência está diminuindo no mundo desenvolvido. Nos países em desenvolvimento, por outro lado, ainda é uma infecção altamente prevalente, com a maioria dos casos não sendo diagnosticados. A infecção crônica pode levar à gastrite atrófica, caracterizada pela perda de glândulas gástricas e infiltrados inflamatórios crônicos, que, por sua vez, resultam em hipocloridria ou acloridria, fatores de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (VARELA; SEGURA, 2019).

A diminuição na densidade das células D observada na infecção por HP poderia explicar a hipergastrinemia observada nesses pacientes, já que a somatostatina é um inibidor das células G. Alterações na fisiologia gástrica, como aumento na secreção de gastrina e redução na secreção de somatostatina, são observadas em organismos infectados por HP (BARBUTO, 2008).

O mecanismo pelo qual as bactérias alteram a secreção dos hormônios gástricos não está bem esclarecido. Algumas explicações possíveis são a alcalinização do microambiente gástrico pela produção de amônia pela bactéria, presença de outros produtos tóxicos e inflamação do antro, que poderiam estimular as células G produtoras de gastrina e inibir as células D produtoras de somatostatina. Essas mudanças, somadas àquelas promovidas pelas alterações inflamatórias na mucosa gástrica podem modificar o complexo equilíbrio gástrico e afetar a secreção hormonal (BARBUTO, 2008; KIM et al., 1999).

Valores basais da somatostatina no plasma e no tecido do antro e do corpo foram menores em pacientes infectados do que nos controles negativos para HP.



Um aumento significativo ocorre após a terapia de erradicação bem-sucedida, em conjunto com um aumento do número de células D em ambas as regiões. As alterações na ultraestrutura das células D na mucosa antral e corpo depois de terapia de erradicação sugerem um aumento na síntese e secreção da somatostatina. A restauração estrutural e funcional das células D seguintes à terapêutica de erradicação indica possível recuperação da mucosa doente (MILUTINOVIC et al., 2003).

Em pacientes com gastrina sérica em níveis aumentados, na presença de hipocloridria (vagotomia seletiva proximal) e acloridria (anemia perniciosa), a razão células G/D aumenta acentuadamente como consequência de um aumento na célula G e uma diminuição na densidade célula D (ARNOLD et al., 1982).

A demonstração de uma razão linear entre o número de células antrais G e D nos pacientes controles, com úlcera duodenal e gastrinoma e as alterações marcantes da razão células G/D em estados de hipocloridria e acloridria estão de acordo com a afirmação de uma relação funcional entre células D e G e entre células D e as células parietais (ARNOLD et al., 1982).

Tendo em conta estas relações funcionais aparentes entre células G e D, seria difícil explicar as diferenças marcantes na proporção no antro de células G/D em pacientes com gastrinomas, anemia perniciosa, e após vagotomia proximal seletiva, porque, em todos esses casos, os níveis de gastrina no soro são elevados, enquanto a razão células G/D aumenta na anemia perniciosa e após vagotomia proximal seletiva, mas diminui em pacientes com gastrinoma. Um efeito direto inibidor do aumento dos níveis de gastrina no soro sobre a densidade das células D, dessa maneira, pode ser excluído. Por outro lado, a secreção gástrica é

marcadamente diferente nestes três grupos de hipergastrinemia. Parece que a hipocloridria ou acloridria é seguida por um aumento da razão células G/D, enquanto na hipercloridria é encontrada uma diminuição na razão células G/D, e que a razão células G/D é dependente do estado de secreção do ácido gástrico. Esta afirmação é suportada por experiências que indicam que a liberação da somatostatina pelas células D do estômago é aumentada na presença de um baixo pH intragástrico (ARNOLD et al., 1982).

Portanto, alterações no pH de pacientes em uso crônico de IBP são semelhantes às vistas na vagotomia eletiva proximal (ARNOLD; KOOP,1989), e podem ser seguidas de alterações na razão das células G e D.

Como ainda existem controvérsias na literatura, realizamos este estudo buscando avaliar as alterações nas células G, D e ECL em usuários crônicos de IBP com ou sem infecção por HP e correlacionar estas alterações com os níveis séricos de gastrina.

### **3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

Ainda existem controvérsias sobre o efeito do uso crônico de IBP sobre o número de células G, D e ECL e na razão entre as células G e D.

Os IBP são drogas de fácil acesso, muito usadas e frequentemente por um tempo prolongado, mesmo sem uma indicação precisa. A inibição ácida que acontece pelo uso crônico de IBP e o possível aumento da gastrina devem ser seguidos de alterações na regulação dos mecanismos da produção do ácido clorídrico. Consequentemente esperamos encontrar alterações na quantidade de células G, D e ECL e na razão entre as células G e D e que estas alterações serão diferentes em indivíduos com e sem infecção por HP.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a quantidade de células G, D e ECL e a razão entre as células G e D em pacientes usuários crônicos de IBP e comparar com os controles, com ou sem infecção por HP em biópsias de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o número de células G, D e ECL em biópsias gástricas do antro e corpo de usuários crônicos de IBP e comparar com controles não usuários de IBP através da imunohistoquímica (IHQ);
- b) Avaliar a razão entre as células G e D em biópsias gástricas do antro e corpo de usuários crônicos de IBP e comparar com controles;
- c) Avaliar a localização das G, D e ECL em biópsias gástricas do antro e corpo de pacientes usuários crônicos de IBP e comparar com controles através da imunohistoquímica;
- d) Comparar o número de células G, D e ECL em biópsias gástricas do antro e corpo de usuários crônicos de IBP e dos controles com e sem infecção por HP;
- e) Comparar o número de células G, D e ECL em biópsias gástricas do antro e corpo de usuários crônicos de IBP e dos controles com os níveis séricos de gastrina.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo retrospectivo realizado no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), hospital público terciário, no período de maio de 2012 a junho de 2013 (coleta das amostras), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (CAAE: 63812217.1.0000.5154) (ANEXO A), com assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes participantes (ANEXO B).

Não houve cálculo estatístico para definição do tamanho da amostra (amostra por acessibilidade). Inicialmente foram avaliados 105 pacientes, sendo 81 usuários crônicos de IBP (grupo IBP) e 24 não usuários (grupo controle). Entretanto, em alguns casos não foi possível realizar a avaliação IHQ dos três anticorpos.

Todos os pacientes tinham indicação para a realização de Endoscopia Digestiva Alta (EDA) e estas foram realizadas utilizando aparelho de videogastroscoópio Olympus® (GIF-Q150 e GIF-2T160) com processadora Exera®-CLV-160. Foram excluídos os pacientes que não responderam ao questionário (ANEXO C), que tinham alguma cirurgia prévia no aparelho digestivo ou anemia perniciosa. Consideramos uso crônico de IBP quando era feito por tempo superior a 6 meses e de modo contínuo. Desta forma, pacientes que fizeram uso de IBP por um período inferior a 6 meses foram excluídos

Antes da realização da EDA foram coletados 4 ml de sangue para dosagem de gastrina através da quimioluminescência, com resultado expresso em pg/ml (valor de referência normal entre 13 a 115 pg/ml). Os pacientes que apresentaram aumento dos níveis de gastrina superior a 500 pg/ml foram encaminhados para investigação de causas de hipergastrinemia (SANABRIA et al., 2007). Foram

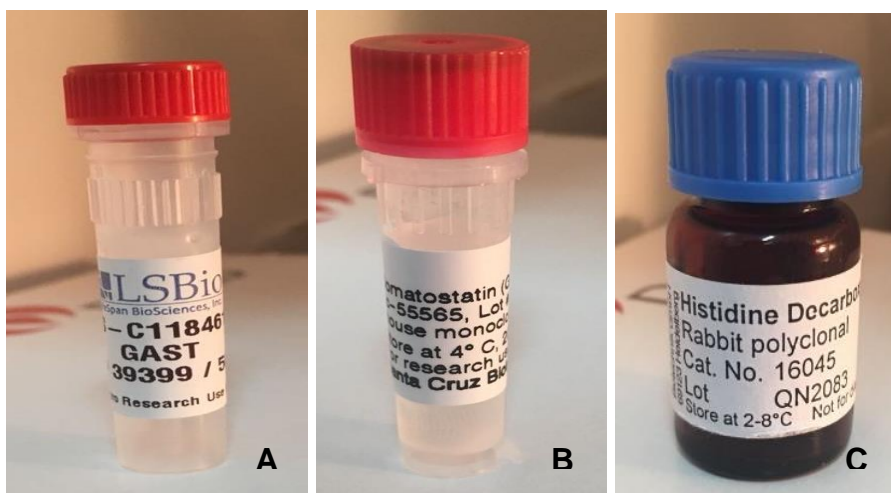
colhidos fragmentos das mucosas das regiões do antro e corpo gástrico dos pacientes. Os fragmentos foram imediatamente fixados em formol tamponado a 4% e encaminhados para processamento, inclusão em parafina, microtomia e obtenção de lâminas coradas segundo as técnicas de Hematoxilina-eosina (HE) para avaliação geral, de Warthin-Starry (WS) para a pesquisa de bactérias morfológicamente compatíveis com HP e para a realização do estudo IHQ.

Para avaliar a quantidade e das células G, D e ECL foi empregada a técnica IHQ de polímeros e os anticorpos anti-célula G (LSBIO®-USA) (Figura 3A), anti-célula D (SANTA CRUZ®-USA) (Figura 3B) e anti-enzima histidina descarboxilase (HDC-PROGEN®-USA) (Figura 3C), que é uma enzima específica para a produção de histamina (PRINZ; ZANNER; GRATZL, 2003; TSOLAKIS et al., 2015).

A avaliação da localização das células positivas e sua quantificação foram feitas no antro com os anticorpos para células G e D e no corpo gástrico para os anticorpos para células D e ECL, em microscópio de luz comum Nikon® ECLIPSE 80i. Como não havia grande variação na literatura, para a quantificação foram contadas todas as células positivas encontradas no campo de grande aumento (400 vezes) onde havia maior número de células positivas de cada anticorpo, assim como em 10 glândulas que também apresentavam maior número de células positivas. A quantificação das células foi feita por um único observador previamente treinado. Comparou-se ainda o número de células G, D e ECL com os níveis séricos de gastrina e a presença ou a ausência de infecção por HP.

Para a avaliação estatística, utilizamos banco de dados elaborado no Excel® 2010 e, para a análise estatística, o programa BIOSTAT®. Para a análise das idades utilizamos mediana, idade mínima e máxima e para a análise estatística o teste de

Fisher. Os testes foram considerados significativos quando a probabilidade de rejeição de hipótese de nulidade for menor que 5% ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Acervo da autora, 2020

Figura 3. A - Anticorpo anti-célula G (LSBIO®-USA); B - Anticorpo anti-célula D (SANTA CRUZ®-USA); C - Anticorpo anti-enzima histidina descarboxilase (HDC-PROGEN®-USA).

**CHRONIC USE OF PROTON PUMP INHIBITORS AND THE QUANTITY OF G, D,  
AND ECL CELLS IN THE STOMACH**

*Uso crônico de inibidores de bomba de prótons e a quantidade de células  
G, D e ECL no estômago*

Silvia Maria Perrone **CAMILO**<sup>1</sup>, Élia Cláudia de Souza **ALMEIDA**<sup>2</sup>,  
Jacqueline Batista **SOUSA**<sup>3</sup>, Luana Perrone **CAMILO**<sup>4</sup>,  
Renata Margarida **ETCHEBEHERE**<sup>5</sup>

1. MD, Post-Graduate Program in Health Sciences, Gastroenterology Service, Clinical Hospital, Triângulo Mineiro Federal University, Uberaba, Minas Gerais, Brazil, <https://orcid.org/0000-0001-9407-0285>.
2. PhD, Post-Graduate Program in Health Sciences, Triângulo Mineiro Federal University, Uberaba, Minas Gerais, Brazil, <https://orcid.org/0000-0003-0571-5622>.
3. Post-Graduate Program in Health Sciences, Triângulo Mineiro Federal University, Uberaba, Minas Gerais, Brazil, <https://orcid.org/0000-0002-7953-4501>.
4. Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein, São Paulo, São Paulo, Brasil, <https://orcid.org/0000-0002-2089-5986>.



5. PhD, Post-Graduate Program in Health Sciences, Surgical Pathology  
Subunity, Clinical Hospital, Triângulo Mineiro Federal University, Uberaba,  
Minas Gerais, Brazil, <https://orcid.org/0000-0002-2241-5966>.

**Correspondence:**

Renata Margarida Etchebehere

E-mail: [renataetch@hotmail.com](mailto:renataetch@hotmail.com)

Financing: None

Interest Conflict: None

**ABSTRACT - Background:** Acid inhibition due to the chronic use of proton pump inhibitors and the possible increase in gastrin may be followed by changes in the regulation of hydrochloric acid production. It is not yet defined whether chronic use alters the amount of G, D and ECL cells in the stomach or the G/D cells ratio. **Objective:** To evaluate the number of G cells - producing gastrin, D cells - producing somatostatin and ECL cells - producing histamine, in patients with chronic use of proton pump inhibitors, with or without *Helicobacter pylori* infection. **Method:** This is a retrospective study that evaluated 105 patients, 81 chronic users of proton pump inhibitors and 24 controls, through biopsies with G, D and ECL cells count by immunohistochemical study, in a quantitative way where there was a greater number of cells positive by microscopic field of high magnification and in 10 glands. **Results:** There was no statistical difference when comparing the number of G, D and ECL cells between the IBP group and the control group. The G/D cells ratio was higher in patients using chronic proton pump inhibitors. **Conclusion:** The chronic use of proton inhibitors does not seem to interfere with G, D and ECL cells count; however, it interferes in the G/D cells ratio.

**HEADINGS:** Omeprazole. Gastrin. Somatostatin. Enterochromaffin-like cells. *Helicobacter pylori*.

**RESUMO – Racional:** A inibição ácida pelo uso crônico de inibidores de bomba de prótons e o possível aumento da gastrina podem ser seguidos de alterações na regulação da produção do ácido clorídrico. Ainda não está definido se o uso crônico altera a quantidade de células G, D e ECL no estômago ou a razão células G/D.

**Objetivo:** Avaliar o número de células G - produtoras de gastrina, células D - produtoras de somatostatina e células ECL - produtoras de histamina, em pacientes com uso crônico de inibidores de bomba de prótons, com ou sem infecção pelo *Helicobacter pylori*.

**Método:** Trata-se de um estudo retrospectivo que se avaliou 105 pacientes, 81 usadores crônico de inibidores de bomba de prótons e 24 controles, através de biópsias com contagem das células G, D e ECL por estudo imunohistoquímico, de forma quantitativa onde havia maior número de células positivas por campo microscópico de grande aumento e em 10 glândulas.

**Resultados:** Não houve diferença estatística comparando-se o número de células G, D e ECL entre o grupo IBP e grupo controle. A razão células G/D foi maior nos pacientes usadores crônicos de inibidores de bomba de prótons.

**Conclusão:** O uso crônico de inibidores de prótons parece não interferir na contagem das células G, D e ECL; porém, interfere na razão células G/D.

**DESCRITORES:** Omeprazol. Gastrina. Somatostatina. Células enterocromafim. *Helicobacter pylori*.

## INTRODUCTION

Acid secretion plays an important role in regulating gastric functions. It protects against pathogenic gastrointestinal agents, facilitates digestion and the absorption of some nutrients, and modulates eating behavior<sup>17,22</sup>.

Hydrochloric acid (HCl) is produced in two main areas in the stomach: the oxyntic mucosa and the antral mucosa. Parietal cells, which make up some 80% of the acid-secreting gastric mucosa, are located in the oxyntic mucosa. They are found proximally in the gastric body and fundus, intermingled with histamine-secreting enterochromaffin-like cells (ECL) and the main pepsinogen-secreting cells. The distal mucosa, which makes up about 20% of the gastric mucosa, contains antral pyloric glands with G cells, which secrete gastrin. Both areas include surface mucosa cells, colon mucosa cells, and enterochromaffin cells, as well as D cells, which secrete somatostatin<sup>11,14,19,24</sup>.

Regulation of gastric acid secretion is achieved through an interaction between the two main gastric endocrine cells, the G cells and the D cells. When food enters the stomach, the protein component stimulates G cells to release gastrin, which stimulates ECL cells and parietal cells to release histamine and HCl, respectively. As the acidity of the stomach and duodenum increases, protective feedback mechanisms are activated to inhibit further secretion of HCl. An important inhibitory control mediated by HCl involves the release of somatostatin by D cells<sup>17</sup>.

The acid inhibition that occurs with the chronic use of proton pump inhibitors (PPIs) and possible associated increases in gastrin levels may lead to changes in the mechanisms regulating HCl production. However, it is unclear whether their chronic PPI use changes the quantities of G, D, and ECL cells, or the ratio between G cells

and D cells, in these patients. It is also unclear whether *Helicobacter pylori* (HP) infection has an influence on these changes.

So, the aim of this research was to analyze the number of gastrin-producing cells, somatostatin-producing cells, and histamine-producing cells in patients who were chronic users of proton pump inhibitor, with or without related *Helicobacter pylori* infection.

## METHODS

We performed a retrospective study at a public tertiary hospital that was approved by the institution's Research Ethics Committee (CAAE: 63812217.1.0000.5154). The participants signed informed consent forms.

Initially, a total of 105 patients were evaluated, including 81 chronic PPI users (PPI group) and 24 non-users (control group). Chronic PPI use was defined as six months of continuous use. However, in some cases, it was not possible to perform the immunohistochemical evaluation of all three antibodies. The inclusion criteria were: willingness to participate in the study and completion of an intake questionnaire. The exclusion criteria were any prior surgery on the digestive tract or pernicious anemia.

All patient participants underwent a medically indicated upper digestive tract endoscopy conducted with an Olympus® (GIF-Q150 and GIF-2T160) video gastroscope linked to an Exera®-CLV-160 processor. Before conducting each endoscopic examination, 4 ml of blood was collected for gastrin level determination. Gastrin was measured through chemiluminescence, with the results expressed in pg/ml (normal reference range, 13-115 pg/ml). Patients gastrin levels greater than 500 pg/ml were referred for investigation into the causes of their hypergastrinemia<sup>25</sup>.

Samples of mucosa from the antral and gastric body areas were collected as medically indicated during the endoscopic procedure.

The samples were fixed immediately in 4% buffered formaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned into 3 µm-thick sections on a microtome. The sections were mounted on slides, which were subjected to H&E staining for general histology, Warthin-Starry staining for identifying bacteria with an *H. pylori*-consistent morphology, or immunohistochemistry (IHC) to quantitate G cells, D cells, and ECL cells. For the IHC, we used a polymer-based detection technique with antibodies targeting G cells (LSBIO®-USA), D cells (SANTA CRUZ®-USA), and histidine decarboxylase (HDC; PROGEN®-USA), a specific histamine-producing enzyme<sup>23,29</sup>.

Immunolabeled cells were located and quantified in the antrum (anti-G cell and anti-D cell immunopositivity) and in the gastric body (anti-D cell and anti-HDC immunopositivity) with a Nikon® ECLIPSE 80i regular optical microscope. We counted all immunopositive cells within a 400× high magnification field, where immunopositivity for each antibody was abundant, as well as in a sample of 10 glands showing large numbers of immunopositive cells. We analyzed G cell, D cell, and ECL cell (i.e. HDC-immunopositive) counts, serum levels of gastrin, and the presence vs. absence of HP infection.

### **Statistical analyses**

Were performed in BIOSTAT® on a database developed in Excel® 2010. The tests were considered significant when the probability of rejecting the null hypothesis was below 5% ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

The general characteristics of the sample are shown in Table 1. There were no significant demographic differences between the PPI and control groups. A majority of the 81 patients (53, 65.4%) used omeprazole at a daily dose of 20 mg, whereas 23 (28.4%) took 40 mg/day of omeprazole and three (3.7%) took 60 mg/day of omeprazole. The remaining two patients used 40 mg/day of pantoprazole. With respect to length of use, most of the 81 PPI group patients (72, 88.9%) had been using a PPI for >12 months, the remaining patients (9, 11.1%) had been using a PPI for 6-12 months.

**TABLE 1** - Age, gender, race, and serum level of gastrin in patients who were chronic PPI users and non-user controls

<b>Variable</b>	<b>Control (n=24)</b>	<b>PPI (n=81)</b>
Age, years	48.5 (17-72)	57 (23-79)
Gender, women/men	70.8% / 29.2%	84% / 16%
White	66.6%	76.5%
Non-white	33.3%	23.5%
Increased gastrin*	16.7%	34.6%

\*Serum gastrin= >115 pg/ml; all p >.05 control vs. PPI.

We examined gastric antrum samples from 15 control group participants, the majority of whom (9, 60%) were HP negative. We examined gastric body samples from 21 control group participants, the majority of whom (14, 66.6%) were also HP

negative. We examined gastric antrum samples from 54 PPI group patients, including 34 HP negative (63%) and 20 HP positive (37%) patients. We examined gastric body samples from 70 PPI group patients, including 42 HP-negative (60%) and 28 HP-positive (40%). The G cell, D cell, and ECL cell counts obtained in the antrum and the gastric body for the PPI and control groups are reported in Table 2.

**TABLE 2** - G cell, D cell, and ECL cell counts\* in the gastric antrum and gastric body of chronic PPI users and non-user controls, with and without HP infection

Cell type	PPI group		Control group	
	HP positive	HP negative	HP positive	HP negative
Gastric antrum	n=20	n=34	n=6	n=9
G 10 glands	47.5 (14-74)	46 (24-108)	35.5 (28-43)	42 (23-75)
G field	73 (14-166)	80 (20-296)	57 (34-72)	59 (20-100)
D 10 glands	22.5 (15-32)	24.5 (12-35)	40 (33-56)	42 (21-57)
D field	28.5 (14-59)	34 (13-79)	59 (43-81)	57 (45-112)
Gastric body	n=28	n=42	n=7	n=14
ECL field	5 (1-11)	4 (1-12)	4 (1-12)	5 (1-14)
D 10 glands	16.5 (9-30)	17 (10-28)	15 (13-25)	17.5 (13-26)
D field	16.5 (9-55)	19.5 (9-47)	19 (8-32)	19.5 (10-36)

\*Fisher's exact tests showed all of the above PPI vs. control comparisons were not significant,  $p > .05$

Participants with HP infection and participants without it had similar G cell, D cell, and ECL cell counts as well as similar serum gastrin levels. We therefore



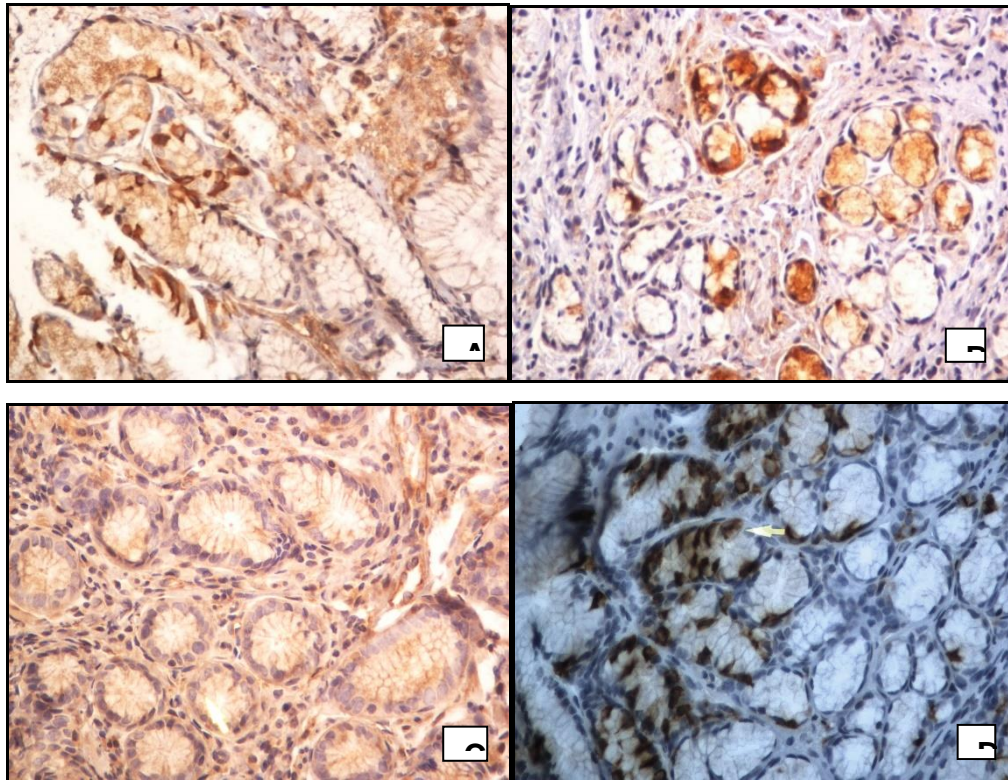
analyzed all PPI group participants and all control participants together as unified groups (Table 3).

**TABLE 3** - G cell, D cell, and ECL cell counts in the gastric antrum and gastric body by group, as determined by two sampling methods

Cell type	Gastric Antrum				Gastric Body			
	Control n=15		PPI n=54		Control n=22		PPI n=69	
	10 glands	Field	10 glands	Field	10 glands	Field	10 glands	Field
G	38	59	94	79	-	-	-	-
D	42	57	24	31	18	20	17	18.5
ECL	-	-	-	-	-	5	-	4

\*G cell, D cell, and ECL cell counts were similar in PPI and control groups in both areas (Fisher's exact tests all  $p > .05$ )

IHC identifying G, D, and ECL cells are shown in Figure 1. We observed a G cell to D cell ratio in the antrum of 3.9 (94:24) for the PPI group based on counts in 10 sampled glands and a G cell to D cell ratio of 2.5 (79:31) for the PPI group based on counts in a high-magnification field. In the control group, the G cell to D cell ratios found were 0.9 (38/42) for the 10 sampled glands and of 1 (59/57) for the high-magnification field.



**FIGURE 1** – A) Gastric antral mucosa from a control patient, anti-G cell immunopositivity in brown; B) Gastric antral mucosa from a control patient, anti-D cell immunopositivity in brown; C) Gastric oxyntic mucosa, anti-ECL cell immunopositivity in brown; D) Gastric antral mucosa of a control patient, anti-G cell immunopositivity in brown (arrow).

## DISCUSSION

PPIs are a very widely used class of medications, but they are often used for indications and treatment durations that are not well tested or approved, and they can be acquired without prescription in some countries<sup>31</sup>. It is estimated that up to 10% of the population worldwide uses some type of PPI<sup>30</sup>. They are the strongest suppressors of gastric acid secretion that are independent of other stimulatory

factors. At commonly used dosages, PPIs reduce daily HCl production (basal and stimulated) by 80-95%<sup>11</sup>.

PPI therapy can lead to an increase in serum levels of gastrin<sup>2,7,16</sup>. Hypergastrinemia occurs through a negative feedback mechanism between the intragastric pH and antral G cell activity<sup>16</sup>. In some patients, hypergastrinemia is thought to be responsible for the HCL rebound hypersecretion that occurs after PPI withdrawal<sup>30</sup>. However, gastrin levels generally return to normal after discontinuing of PPI use<sup>26</sup>.

According to Arnold and Koop<sup>2</sup>, although serum gastrin increases over the short- and long-term with PPI treatment, it is rare that gastrin levels exceed those observed after a proximal selective vagotomy and occurs when the inhibition of the stimulus to acid secretion exceeds 80%. These authors point out that in studies of patients receiving omeprazole at doses of 40-60 mg/day for a period of 1-2 years, moderate gastrin increases are observed with inter-individual variation. Cheung and Leung<sup>6</sup> indicated that gastrin levels are increased in patients who have used PPIs for more than three years. The lack of a significant inter-group gastrin difference in our study may be explained by the use of a relatively lower PPI dose (i.e. 20 mg/day) by the majority of participants and by a period of generally <3 years.

Hypergastrinemia could not be attributed to gastrinoma, autoimmune gastritis, pyloric obstruction, renal insufficiency, surgery (vagotomy or retained gastric antrum following Billroth II gastrectomy)<sup>4, 21</sup>, or chronic atrophic gastritis<sup>5</sup> in any of our patients. However, four patients with altered gastrin in our PPI group were seropositive for Chagas disease, which has been shown to cause hypergastrinemia<sup>20,28</sup>.

A study performed in rats showed that omeprazole use led to a significant increase in G-cell density combined with a reduction in D-cell density and, consequently, a marked increase in the G/D cell ratio<sup>16</sup>. These observations suggested that the G/D cell ratio in the antrum may be governed by intragastric pH. However, changes in this magnitude have not been observed in humans<sup>16</sup>. As with our study, Arnold and Koop<sup>2</sup> did not find differences in G cell or D cell counts, nor in ECL cell density, in patients with severe reflux esophagitis treated with 40 mg/day of omeprazole for up to nine months; they did not indicate the HP infection status of their patients. Patients infected with strains of HP that express CagA, a cytotoxin encoded by the A gene that acts as a virulence factor strongly associated with severe gastritis have been found to have a reduced D-cell density in the antrum with no changes in the number of G cells<sup>15</sup>.

We observed a higher G/D cell ratio in the antrum of patients in the PPI group than in the control group, despite a lack of difference in cell counts when we compared them separately. An increase in the G/D cell ratio indicates a functional disturbance in the gastrointestinal tract and can be observed in patients with gastritis, ulcerated mucosal lesions, or HP infection<sup>3</sup>. D cell density is significantly lower in patients infected by HP than in those who are not infected and in normal individuals, while the G cell density is significantly increased. An association with the severity of inflammation caused by the release of cytokines might explain these changes by way of an influence on gastrin/somatostatin homeostasis and might be related to the virulence of infecting HP strain<sup>17</sup>.

Liu *et al*<sup>17</sup> found a G/D cell ratio of 3 in people who did not use a PPI. Likewise, Frick *et al*<sup>10</sup> found a G/D cell ratio of 3 in normal rat stomachs. These values are similar to those found in our study. On the other hand, Lamberts *et al*<sup>16</sup>

described a G/D ratio of 5.5 in the antral mucosa before and after treatment with omeprazole at doses in the range of 40-60 mg/day for 1-2 years. However, their patients were using relatively high PPI doses and they employed a cell counting method different from that used here.

Because gastrin stimulation of histamine release from ECL cells is the main trigger of gastric acid secretion, with ECL cells being the main receiver of the gastrin signal rather than the HCl-secreting parietal cells themselves<sup>30</sup>, we were interested to determine if ECL cell counts may be increased in patients who were chronic PPI users. Gastrin is characterized by its trophic capacity<sup>8,18</sup>. Reports of ECL cell hyperplasia and gastric carcinoids in 45% of rats treated for two years with 140 pg/kg omeprazole raised doubts about the safety of omeprazole in humans. However, the dosage used in the animals was approximately 500 times the dose currently used in humans, and the rats were treated throughout their lives<sup>1,16</sup>.

Changes in gastric cell counts and a possible relationship between neuroendocrine tumors and chronic PPI use have been examined with respect to the period of use required for these changes to occur and what factors might aggravate or accelerate this process<sup>16</sup>. The higher incidence of carcinoid tumors in patients with pernicious anemia<sup>16</sup> suggests that achlorhydria is followed by high levels of gastrin in these patients. It has been a challenge to define whether patients treated for a long period of time with omeprazole can be compared to those with pernicious anemia<sup>16</sup>.

Liu *et al*<sup>17</sup> reported that ECL cells in the gastric body mucosa constitute an important proportion of endocrine cells. However, the exact percentage of these cells have yet to be defined. We found small ECL cell populations in the oxyntic mucosa in both groups, without a statistically significant difference between their quantities. Lamberts *et al*<sup>16</sup> described two studies with differing results in terms of increases in

the number of argyrophil cells after one year of omeprazole treatment. Creutzfeldt *et al*<sup>7</sup> found that the number of argyrophil cells in the oxyntic mucosa had increased in a sample of 10 patients after taking omeprazole for up to two years, relative to their pre-treatment levels. This increase occurred soon after one year and was attributed to argyrophil cell hyperplasia. No further increases were seen after two years. However, no such increase was found in a larger group of 18 patients studied before and after one year of omeprazole treatment<sup>7</sup>. The authors attributed this difference to different pretreatment values and possible errors caused by the small sample of gastric biopsies examined<sup>7</sup>. Traditional histochemical techniques (argyrophilia) have much lower specificity than IHC<sup>23,29</sup>. IHC techniques with specific antibodies against products secreted by endocrine cells have thus replaced older histochemical techniques<sup>27</sup>.

Liu *et al*<sup>17</sup> have noted a lack of studies reporting exact percentages of ECL cells in the gastric body. Using antibodies for gastrin, somatostatin, and chromogranin, they found higher proportions of ECL cells in the gastric body than elsewhere in the stomach. Arnold and Koop<sup>2</sup> noted that ECL cells are almost exclusively restricted to the fundic mucosa and account for 40-60% of the endocrine cells in this part of the stomach. The number of ECL cells found in the gastric body in our study using anti-HDC IHC was lower than the numbers of D cells found in the control group and in the PPI group, with or without HP infection. The HDC enzyme converts histidine into histamine<sup>9,12,13</sup>. HDC is also expressed in mastocytes and basophils, wherein histamine is stored in granules<sup>12</sup>, these are cells with different morphological characteristics than ECL cells.

Another marker of endocrine cells is chromogranin A. Chromogranin A, an acid protein located in ECL cells, is a biosynthetic precursor of several bioactive

peptides<sup>9</sup>. Chromogranin A expression is used for ECL cell quantitation by subtracting somatostatin and serotonin-producing cells from the total number of labelled cells to obtain an ECL cell count<sup>14</sup>. Kakehasi<sup>14</sup> reported that ECL cells appear to constitute 30-40% of the cells in the oxyntic mucosa when identified using chromogranin A. Thus, the lower number of ECL cells found in our study likely stems from our use of a marker that was more specific to these cells, namely HDC.

Our ability to compare our findings with published results is hindered by the different methods of cell counting that have been used and the associated lack of methodological standardization. Variance among reports may also stem from differences in sample collection. According to Öberg<sup>27</sup> and Liu *et al*<sup>17</sup>, because ECL cells are located mainly in the middle- and lower-third of the mucosal bed, they may not be visible in superficial biopsies. To minimize this bias, we counted cells in 10 glands in the deepest portion of the mucosa.

Longer-term studies, especially including patients who have used proton pump inhibitor for >3 years, are needed to define the period of use that may lead to significant shift in stomach mucosal cell populations.

## **CONCLUSION**

We did not observe alterations in G cell, D cell, or ECL cell counts in patients who were chronic PPI users, relative to non-user controls, after 12 months of use. However, these patients did show altered G/D cell ratios. Notwithstanding, studies with patients who have been using PPIs for more than three years are needed to determine whether longer periods of PPI use might disrupt the numbers of these cells

or the ratios between them. It also remains to be determined whether these cell amounts are sensitive to infection with highly virulent strains of HP or inflammation of severe intensity.

## REFERENCES

1. Arroyo Villarino MT, Lanás Arbeloa A, Esteva Díaz F, Ortego Fernández de Retana J, Sainz Samitier R. Effects of long-term treatment with lansoprazole and omeprazole on serum gastrin and the fundic mucosa. *Rev Esp Enf Digest.* 1997;89(5):352-6.
2. Arnold R, Koop H. Omeprazole: long-term safety. *Digestion.* 1989;44 Supl 1:S77-86.
3. Barbuto RC. Gastrinemia e densidade das células G e D no estômago de gerbis infectados com *helicobacter pylori* submetidos a vagotomia com piloroplastia. Doctoral thesis. Belo Horizonte MG, Universidade Federal de Minas Gerais; 2008. Available from: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ECJS-7YXFTE/rafael\\_calv\\_o\\_barbuto.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ECJS-7YXFTE/rafael_calv_o_barbuto.pdf?sequence=1).
4. Braghetto I, Csendes A. Failure after fundoplication: re-fundoplication? Is there a room for gastrectomy? In which clinical scenarios? *Arq. Bras. Cir. Dig.* 2019. [access Aug 15 2019];32(2):[e1440]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6713057/>
5. Burkitt MD, Varro A, Pritchard DM. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors. *World J Gastroenterol*, 2009. [access Jan 24



2018];15(1):1-1.

Available

from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2653300/pdf/WJG-15-1.pdf>.

6. Cheung KS, Leung WK. Long-term use of proton-pump inhibitors and risk of gastric cancer: a review of the current evidence. *Therap Adv Gastroenterol*, 2019. [access Apr 12 2019]; 12 [1756284819834511]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6415482/>
7. Creutzfeldt W, Lamberts R, Stöckmann F, Brunner G. Quantitative studies of gastric endocrine cells in patients receiving long-term treatment with omeprazole. *Scand J Gastroenterol*. 1989;24 Suppl 166:S122-8.
8. Delle Fave G, Marignani M, Moretti A, D'ambra G, Martino G, Annibale B. Hypergastrinemia and Enterochromaffin-like Cell Hyperplasia. *Yale J Biol Med*. 1998;71(3-4):291-301.
9. Dimaline R, Baxendale AJ. Control of histidine decarboxylase gene expression in enterochromaffin-like cells. *Yale J Biol Med*, 1998. [access Jan 24 2018];71(3-4):195-205. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2578993/pdf/yjbm00023-0049.pdf>.
10. Frick C, Martin HL, Bruder J, Lang K, Breer H. Topographic distribution pattern of morphologically different G cells in the murine antral mucosa. *Eur J Histochem*. 2017. [access Oct 21 2018];61(3). Doi: 10.4081/ ejh.2017.2810. PubMed PMID [29046055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29046055/); PubMed Central PMCID: PMC5658698.
11. Goo T, Akiba Y, Kaunitz JD. Mechanisms of intragastric pH sensing. *Cur Gastroenterol Rep*, 2010. [access Jan 3 2018];12(6):465-70. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11894-010-0147-7>.

12. Hirasawa N. Expression of histidine decarboxylase and its roles in inflammation. *Int J Mol Sci*, 2019. [access Mar 10 2018];20(2):376. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6359378/>
13. Huang H, Li Y, Liang J, Finkelman FD. Molecular regulation of histamine synthesis. *Front Immunol*, 2018 [access Oct 13 2018];9:1392. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6019440/>
14. Kakehasi AM. Densidade de células parietais e endócrinas da mucosa gástrica do corpo (oxíntica) de mulheres com e sem osteoporose primária Dissertation. Belo Horizonte MG: Universidade Federal de Minas Gerais;2003. Available from: <http://hdl.handle.net/1843/ECJS-7EZNC>
15. Kim JH, Park HJ, Cho JS, Lee KS, Lee SI, Park IS et al. Relationship of CagA to Serum Gastrin Concentrations and Antral G, D Cell Densities in *Helicobacter pylori* Infection. *Yonsei Med J*. 1999;40(4):301-6.
16. Lamberts R, Creutzfeldt W, Stöckmann F, Jacobaschke U, Mass S, Brunner G. Long-term omeprazole treatment in man: effects on gastric endocrine cell populations. *Digestion*. 1988;39(2):126-35.
17. Liu Y, Vosmaer GD, Tytgat GN, Siao Sd, Ten Kate FJ. Gastrin (G) cells and somatostatin (D) cells in patients with dyspeptic symptoms: *Helicobacter pylori* associated and non-associated gastritis. *J Clin Pathol*, 2005. [access Oct 13 2018];58(9):927-31. Available from: <http://jcp.bmj.com/content/58/9/927.full.pdf+html>.
18. Lundell L, Havu N, Miettinen P, Myrvold HE, Walin L, Julkunen R, et al. Changes of gastric mucosal architecture during long-term omeprazole therapy: results of a randomized clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(5): 639-47.

19. Moreira LF. Estudo das células imunorreativas à ghrelina e prepro-ghrelina na hiperplasia endócrina associada à gastrite atrófica do corpo e em tumores neuroendócrinos tipo I do estômago. Doctoral thesis. Belo Horizonte MG: Universidade Federal de Minas Gerais; 2011. Available in: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-8SENY/1/tese\\_completa\\_pdf.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-8SENY/1/tese_completa_pdf.pdf)
20. Mott CB, Guarita DR, Sipahi AM, Betarello A. Hormônios Gastro-entéropancreáticos em portadores de Doença de Chagas crônica. *Rev Hosp Clín Fac Med Univ São Paulo*. 1989;44(2):63-72.
21. Norero E et al. Risk factors for severe postoperative complications after gastrectomy for gastric and esophagogastric junction cancers. *Arq Bras Cir Dig*, 2019. [access Feb 03 2019];32(4): e1473. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6918748/>
22. Pohl D, Fox M, Fried M, Göke B, Prinz C, Mönnikes H, et al. Do we need gastric acid? *Digestion*, 2008. [access Oct 12 2018];77(3-4):184-97. Available from: <http://www.karger.com/Article/Pdf/142726>.
23. Prinz C, Zanner R, Gratzl M. Physiology of Gastric Enterochromaffin-Like Cells. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:1, 371-382.
24. Rodrigues CB. Gastrite atrófica do corpo: estudo das alterações histopatológicas da mucosa gástrica e relação com auto-imunidade e níveis séricos de gastrina. Dissertation. Belo Horizonte MG: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007. Available from: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/ECJS-76RGMX>
25. Sanabria C, Pérez-Ferre N, Lecumberri E, Miguel P. Gastrinoma. *Endocrinol Nutr*. 2007;54(Suppl 1):S21-30.

26. Smith JP, Nadella S, Osborne N. Gastrin and Gastric Cancer. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. [access Oct 12 2018]; 4(1):75-83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5439238/>
27. Öberg, K. Gastric Neuroendocrine Cells and Secretory Products. Yale J Biol Med. 1998;71(3-4):149-54.
28. Troncon LE, Barbosa AJ, Romanello LM, Topa NH. Antral gastrin cell population in patients with chagasic megaesophagus and megacolon. Braz J Med Biol Res. 1994;27(3):645-53.
29. Tsolakis AV, Grimelius L, Granerus G, Stridsberg M, Falkmer SE, Janson, ET. Histidine decarboxylase and urinary methylimidazoleacetic acid in gastric neuroendocrine cells and tumours. World J Gastroenterol, 2015. [access Oct 12 2018];21(47):13240-49. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4679755/>
30. Waldum HL, Sordal OF, Mjones PG. A célula do tipo ECC (Enterochromaffin-like) [ECL] - central em fisiologia e patologia gástrica. Int. J. Mol. Sci, 2019. [access Dec 14 2019];20(10): 2444. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6567877/>
31. Xie Y, Bowe B, Li T, Xian H, Yan Y, Al-Aly Z. Risk of death among users of Proton Pump Inhibitors: a longitudinal observational cohort study of United States veterans. BMJ Open, 2017. [access Dec 14 2018];7(6): e015735. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5642790/>

## 7 CONCLUSÕES

### 7.1 CONCLUSÕES GERAIS

O uso crônico de IBP parece não interferir na contagem das células G, D e ECL pelo menos nos primeiros doze meses, porém interfere na razão entre as células G e D. Entretanto, mais estudos com pacientes que utilizam IBP por tempo superior a 3 anos são necessários para definir se o tempo de uso mais prolongado poderia interferir no número destas células e a sua razão, bem como a infecção por cepas de HP com maior virulência do HP e a intensidade da inflamação. Um achado interessante foi a identificação de células ECL no antro gástrico, descritas na literatura apenas no corpo gástrico.

### 7.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- a) Não houve diferença estatística significativa no número de células G, D e ECL, quando comparados os pacientes usadores crônicos de IBP com os controles;
- b) A razão células G/D no antro nos pacientes usadores de IBP foi maior que do grupo controle;
- c) Identificamos células G no antro, células D no antro e corpo e células ECL no antro e corpo dos pacientes usadores crônicos de IBP e nos controles;

- d) Quando comparamos o número das células G, D e ECL com a presença de infecção por HP, não houve diferença estatística significativa nos 2 grupos;
- e) Quando comparamos os valores de gastrina com o número das células G, D e ECL, não houve diferença estatística significativa nos 2 grupos.

## REFERÊNCIAS

ARNOLD, R. *et al.* Antral gastrin-producing G-cells and somatostatin-producing D-cells in different states of gastric acid secretion. **Gut**, London, v. 23, n. 4, p. 285-291, apr. 1982. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1419730/pdf/gut00413-0043.pdf>.

Acesso em: 28 mar. 2016.

ARNOLD, R.; KOOP, H. Omeprazole: long-term safety. **Digestion**, Basel, v. 44, suppl. 1, p. 77-86, 1989.

ARROYO VILLARINO, M. T. *et al.* Effects of long-term treatment with lansoprazole and omeprazole on serum gastrin and the fundic mucosa. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, Madrid, v. 89, n. 5, p. 347-356, may 1997.

BARBUTO, R. C. **Gastrinemia e densidade das células G e D no estômago de gerbis infectados com *helicobacter pylori* submetidos a vagotomia com piloroplastia.** 2008. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, (MG), 2008.

BEASLEY, D. E. *et al.* The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 7, p. 1-12, jul. 2015.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4519257/pdf/pone.0134116.pdf>.

Acesso em: 21 out. 2019.

CHEUNG, K. S.; LEUNG, W. K. Long-term use of proton-pump inhibitors and risk of gastric cancer: a review of the current evidence. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, London, v. 2, p. 1-12, mar. 2019. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6415482/pdf/10.1177\\_1756284819834511.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6415482/pdf/10.1177_1756284819834511.pdf). Acesso em: 29 jan. 2019.

CREUTZFELDT, W. *et al.* Quantitative studies of gastric endocrine cells in patients of gastric endocrine cells in patients receiving long-term treatment with omeprazole. **Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement**, Oslo, v. 166, p. 122-128, 1989.

DELLE FAVE, G. *et al.* Hypergastrinemia and Enterchromaffin-like Cell Hyperplasia. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 71, n. 3-4, p. 291-301, may/aug. 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2578981/pdf/yjbm00023-0141.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2019.

GOO, T.; AKIBA, Y.; KAUNITZ, J. D. Mechanisms of Intragastic pH sensing. **Current Gastroenterology Reports**, Philadelphia, v. 12, n. 6, p. 465-470, dec. 2010. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2974196/pdf/11894\\_2010\\_Article\\_147.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2974196/pdf/11894_2010_Article_147.pdf). Acesso em: 10 abr. 2019.



KAKEHASI, A. M. **Densidade de células parietais e endócrinas da mucosa gástrica do corpo (oxíntica) de mulheres com e sem osteoporose primária.** 2003. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2003.

KASAJIMA, A. *et al.* G-cell hyperplasia of the stomach induces ECL-cell proliferation in the pyloric glands in a paracrine manner. **Pathology International**, Carlton, v. 65, n. 5, p. 259-263, may 2015.

KATAGIRI, F. *et al.* Omeprazole raises somatostatin and motilin in human plasma. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 2, p. 370-373, feb. 2005. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/28/2/28\\_2\\_370/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/28/2/28_2_370/_pdf). Acesso em: 05 mar. 2019.

KIM, J. H. *et al.* Relationship of CagA to serum gastrin concentrations and antral G, D cell densities in helicobacter pylori infection. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 40, n. 4, p.301-306, aug. 1999.

KIM, T. H.; SHIVDASANI, R. A. Stomach development, stem cells and disease. **Development**, Cambridge, v. 143, n. 4, p. 554-565, feb. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4760317/>. Acesso em: 28 set. 2019.

LAMBERTS, R. *et al.* Long-term omeprazole therapy in peptic ulcer

disease: gastrin, endocrine cell growth, and gastritis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 104, n. 5, p. 1356-1370, may 1993.

LAMBERTS, R. *et al.* Long-term omeprazole treatment in man: effects on gastric endocrine cell populations. **Digestion**, Basel, v. 39, n. 2, p. 126-135, 1988.

LIU, Y. *et al.* Gastrin (G) cells and somatostatin (D) cells in patients with dyspeptic symptoms: Helicobacter pylori associated and non-associated gastritis. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 58, n. 9, p. 927-931, sep. 2005.

Disponível

em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1770830/pdf/jcp05800927.pdf>.

Acesso em: 26 abr. 2019.

MILUTINOVIC, A. S. *et al.* Somatostatin and D cells in patients with gastritis in the course of Helicobacter pylori eradication: a six-month, follow-up study. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 15, n. 7, p. 755-766, jul. 2003.

MOREIRA, L. F. **Estudo das células imunorreativas à ghrelina e prepro-ghrelina na hiperplasia endócrina associada à gastrite atrófica do corpo e em tumores Neuroendócrinos tipo I do estômago.** 2011. Tese (Doutorado em Patologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2011. Disponível em: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-8SENY/1/tese\\_completa\\_pdf.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-8SENY/1/tese_completa_pdf.pdf).

Acesso em: 29 mar. 2019.

POHL, D. *et al.* Do we need gastric acid? **Digestion**, Basel, v. 77, n. 3-4, p.184-197, 2008. Disponível em: <http://www.karger.com/Article/Pdf/142726>. Acesso em: 15 mar. 2016.

PRINZ, C.; ZANNER, R.; GRATZL, M. Physiology of Gastric Enterochromaffin-Like Cells. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 65, p. 371-382, mar. 2003. Disponível em: . Acesso em: 15 out. 2019.

RODRIGUES, C. B. **Gastrite atrófica do corpo: estudo das alterações histopatológicas da mucosa gástrica e relação com autoimunidade e níveis séricos de gastrina**. 2007. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2007. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp034219.pdf>. Acesso em: 16 set. 2019.

SANABRIA, C. *et al.* Gastrinoma. **Endocrinología y Nutrición**, La Rioja, v. 54, suppl. 1, p. S21-30, 2007.

SMITH, J. P.; NADELLA, S.; OSBORNE, N. Gastrin and gastric cancer. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, Philadelphia, v. 4, n. 1, p. 75-83, jul. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5439238/pdf/main.pdf>. Acesso em: 15 set. 2019.

TSOLAKIS, A. V. *et al.* Histidine decarboxylase and urinary

methylimidazoleacetic acid in gastric neuroendocrine cells and tumours.

**World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 21, n. 47, p. 13240-13249, dec. 2015. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4679755/pdf/WJG-21-13240.pdf>.

Acesso em: 18 set. 2019.

VARELA, C. D.; SEGURA, N. Histology, Parietal Cells. *In*: STATPEARLS. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing, 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547758/>. Acesso em: 20 dez. 2019.

WALDUM, H. L.; SORDAL, O. F.; MJONES, P. G. The Enterochromaffin-like [ECL] Cell-Central in Gastric Physiology and Pathology. **International Journal Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 10, p. 2444, may. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/10/2444>. Acesso em: 25 ago. 2019.

WALLACE, J. L.; SHARKEY, K. A. Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico. *In*: BRUNTON, L. *et al.* (org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. cap. 45, p. 1309-1322.

XIE, Y. *et al.* Risk of death among users of Proton Pump Inhibitors: a longitudinal observational cohort study of United States veterans. **BMJ Open**, London, v. 7, n. 6, mar. 2017. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5642790/pdf/bmjopen-2016-015735.pdf>. Acesso em: 19 set. 2019.

## ANEXOS

### ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba (MG)**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP**  
Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar – Bairro Nossa Senhora de Abadia  
38025-180 - Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854  
E-mail: [cep@pessqg.uftm.edu.br](mailto:cep@pessqg.uftm.edu.br)

#### IDENTIFICAÇÃO

**TÍTULO DO PROJETO:** ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS GÁSTRICAS EM PACIENTES USADORES CRÔNICOS DE INIBIDORES DE BOMBA PROTÔNICA  
**PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL:** RENATA MARGARIDA ETCHEBEHÉRE  
**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM  
**DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM:** 16/11/2011  
**PROTOCOLO CEP/UFTM:** 2182

#### PARECER

De acordo com as disposições da Resolução CNS 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM considera o protocolo de pesquisa **aprovado**, na forma (redação e metodologia) como foi apresentado ao Comitê.

Conforme a Resolução 196/96, o pesquisador responsável pelo protocolo deverá manter sob sua guarda, pelo prazo de no mínimo cinco anos, toda a documentação referente ao protocolo (formulário do CEP, anexos, relatórios e/ou Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos – TCLE assinados, quando for o caso) para atendimento ao CEP e/ou à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Toda e qualquer alteração a ser realizada no protocolo deverá ser encaminhada ao CEP, para análise e aprovação.

O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início da realização do projeto.

Uberaba, 21 de março de 2012.

Prof.<sup>a</sup> Ana Palmira Soares dos Santos  
Coordenadora do CEP/UFTM

## ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UBERABA-MG**

**Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **SUJEITOS MAIORES DE IDADE**

**(Versão de junho de 2011)**

#### **TÍTULO DO PROJETO:**

Alterações macroscópicas e microscópicas gástricas em pacientes usadores crônicos de Inibidores de Bomba Protônica.

#### **TERMO DE ESCLARECIMENTO**

Você está sendo convidado a participar do estudo Alterações macroscópicas e microscópicas gástricas em pacientes usadores crônicos de Inibidores de Bomba Protônica, por fazer uso diário de medicamentos do grupo de inibidores de bomba protônica. Os avanços na área ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é conhecer os efeitos do uso destes medicamentos a longo prazo e caso você concorde em participar, permitirá o aproveitamento das biópsias gástricas que eventualmente venham a ser colhidas.

Você poderá ainda permitir a coleta de pequena dosagem de sangue para dosagem de gastrina e responder a um questionário. O desconforto o qual você será submetido será o da picada de agulha para colher o sangue do seu braço.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento.

Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, você será identificado com um número.



**MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UBERABA-MG**  
**Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO**

TÍTULO DO PROJETO:

Alterações macroscópicas e microscópicas gástricas em pacientes usuários crônicos de Inibidores de Bomba Protônica.

Eu, \_\_\_\_\_, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendo para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar a minha decisão e que isto não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba,...../ ...../.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

\_\_\_\_\_  
Documento de identidade



---

Assinatura do pesquisador responsável

---

Assinatura do pesquisador assistente

Telefone de contato dos pesquisadores:

Renata Margarida Etechebere – 3318-8142

Sílvia Maria Perrone Camilo – 3318-5591



**MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UBERABA-MG**

**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**

Em caso de dúvida em relação a este documento, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854

ANEXO C - QUESTIONÁRIO



**MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UBERABA-MG**  
**Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**  
**QUESTIONÁRIO**

1. Nome:
2. Registro geral da UFTM:
3. Idade:
4. Cor:
5. Sexo:
6. Uso de medicamentos ( ) sim ( ) não
7. Nomes dos medicamentos:
8. Dose:
9. Tempo de uso:
10. Uso: regular ( ) irregular ( )
11. Fez uso do IBP nos últimos 7 dias (Exemplo: Omeprazol):  
( ) sim ( ) não
12. Motivo da realização da EDA:

## ANEXO D – ACEITE DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Revista ABCD

Sex, 31/01/2020 15:23

Aos autores:

Seu trabalho, anexado, foi aceito para publicação no processo de peer-review e algumas adaptações de diagramação e linguística já foram adicionadas na intenção de adaptá-lo às regras técnicas de redação científica do ABCD. O texto que segue pode ser modificado. Se alguma modificação for necessária, desde que seja pequena para que seu trabalho não retorne a novo processo de peer-review, deve vir demarcada em vermelho. As recomendações dos revisores, que devem ser atendidas para seu artigo ser publicado, foram:

Quanto à forma:

- 1) Em relação às referências: a) inclusão daquelas mencionando o ABCD publicadas em 2019 e descritas ao final do capítulo das referências com as letras A e B; b) citá-las no manuscrito onde estão já sugeridas em letras maiúsculas vermelhas sobrescritas; c) manter todas em **formato Vancouver e em ordem alfabética**, e alterar sua numeração no texto com a inclusão das novas referências; d) retirar todas que se referem a livros e teses que não estejam disponíveis na web e, se sim, mantê-las citando seu endereço eletrônico de acesso (ref 13, 18 e 28 em vermelho; e) referenciar as citações somente com o número delas sobrescrito junto à palavra sem nenhum outro artifício gráfico.
- 2) No reenvio há necessidade do manuscrito vir traduzido ao português/inglês (o ABCD é bilíngue na web) sem modificações no texto e no formato em relação ao agora enviado. O ABCD pode intermediar a versão inglesa ao custo de R\$ 800,00. Traduções/versões que não estejam adequadas ao idioma original (exemplo simplesmente usar Translate Google e enviar sem revisão detalhada da linguística pátria da língua) serão sumariamente recusados. Também serão recusados trabalhos que não sejam idênticos na forma gráfica nas duas línguas, conforme o modelo enviado para revisão.
- 3) Também no reenvio há a necessidade de que todas as modificações solicitadas estejam efetuadas nos dois textos, em português e inglês, mudanças essas demarcadas em vermelho nos dois manuscritos, **manuscritos estes que devem ser idênticos inclusive nos detalhes** e as figuras venham em JPG.
- 4) Demarcações em azul são próprias do ABCD e as em vermelho, enviadas no texto devem ser melhoradas, como também em vermelho as que representem as modificações feitas pelos autores.
- 5) Devido à desformatação no processo de submissão (ver o PDF na submissão eletrônica GN1) o processo de revisão técnica do ABCD colocou o texto na sequência que deveria ter. Os autores devem reler e confirmar que todo o texto do manuscrito corresponde ao que fizeram.
- 6) É OBRIGATORIO ENVIAR OS NÚMEROS DO ORCID DE TODOS OS AUTORES AO RE-ENVIAREM O TRABALHO PARA PUBLICAÇÃO. Caso

alguém não tenha ainda esse número identificador de pesquisador científico (corresponde ao CPF da pessoa física, neste caso identificando autores) acesse e faça gratuitamente, e sem custos de manutenção, sua inscrição pelo site: [orcid.org](http://orcid.org).

7) Devido ao recém enaltecido aspecto de inclusão da mídia nas avaliações bibliométricas, as revistas no sentido de que seus artigos tenham repercussão na mídia social, a partir de 2020 o ABCD e as mais importantes revistas médicas internacionais estão adicionando nas publicações pequenos textos nominados como “Mensagem Central”, “Perspectivas” e “Highlights”, ou outros termos, que serão divulgados pelo Twitter, Facebook e mídias assemelhadas. As palavras destes textos devem ser simples para que o público leigo consiga entender o avanço da ciência que o artigo propõe. A Mensagem Central não é um breve resumo dos resultados, mas a síntese deles de forma simples; é semelhante às conclusões e preferencialmente deve incluir uma ilustração contida no texto, a critério do autor. Na Perspectiva a mensagem deve indicar a significância dos achados e como os autores antecipam que seus resultados deverão auxiliar na prática clínica. Seguem exemplos para que os autores identifiquem o formato desejado. A revista fará a divulgação na mídia social:

**EXEMPLO:**

Titulo do trabalho: “Safety and feasibility of near-infrared image-guided lymphatic mapping of regional lymph nodes in esophageal cancer” ([https://www.itcvs.org/article/S0022-5223\(16\)30083-6/pdf](https://www.itcvs.org/article/S0022-5223(16)30083-6/pdf))

**Mensagem Central** (O limite é de 280 caracteres, incluindo espaços): Near-infrared lymphatic mapping is safe and feasible for in situ identification of regional lymph nodes in esophageal cancer.

**Perspectiva** (O limite é de 500 caracteres, incluindo espaços): This “first in human” trial demonstrates preliminary safety and feasibility of intraoperative minimally invasive near-infrared lymphatic mapping for identification of regional lymph nodes in esophageal cancer. NIR imaging may have potential as a staging tool in the future to better select patients for neoadjuvant therapy and endomucosal resection.

Quanto ao mérito:  
Nada digno de nota

OBS: Devido à adequação em curso do site, solicito que a resposta atendendo às solicitações dos pareceristas seja feita por esta via ([revistaabcd@gmail.com](mailto:revistaabcd@gmail.com))

O ABCD agradece a submissão

Prof. Dr. Osvaldo Malafaia  
Editor-Chefe ABCD