

**Letícia Figueiredo Moreira**

**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.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA**

**BELO HORIZONTE  
2011**

**Letícia Figueiredo Moreira**

**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.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Patologia da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo José Afonso  
Barbosa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA**

**BELO HORIZONTE  
2011**

**Letícia Figueiredo Moreira**

**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.**

**Banca Examinadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria da Consolação Vieira Moreira  
UFMG                      Departamento de Clínica Médica

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral  
UFMG                      Departamento Anatomia Patológica e Medicina Legal

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marlene Isabel Vargas Vilorio  
UFV                        Departamento de Veterinária

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sheila Adad  
UFTM                      Departamento de Patologia Especial

Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Maria Kakehasi  
UFMG                      Departamento Locomotor

Prof Cláudio César Fonseca  
UFV                        Departamento de Veterinária

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**REITOR** Prof. Dr. Ronaldo Tadêu Pena

**VICE-REITORA** Prof. Dra. Heloísa Murgel Starling

**PRÓ-REITORIA DA PÓS-GRADUAÇÃO**

**PRÓ-REITOR** Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

**FACULDADE DE MEDICINA**

**DIRETOR** Prof. Dr. Francisco José Penna

**VICE-DIRETOR** Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

**CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**COORDENADOR** Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA GERAL**

COLEGIADO:

Prof. Dr. Wagner Luis Tafuri - Coordenador

Prof Dr. Geovanni Dantas Cassali - Subcoordenador

Prof<sup>a</sup> Dra. Rosa Maria Esteves Arantes

Prof<sup>a</sup> Dra. Silvana Maria Elói Santos

Prof<sup>a</sup> Dra. Helenice Gobbi

Prof Dr. Marcelo Vidigal Caliari

REPRESENTANTE DISCENTE

Izabela Ferreira Amorim

Quero ter mais sono, quando for dormir  
Menos fome, quando for comer  
Mais dinheiro, quando for gastar.

Quero ter menos tempo, quando for chorar  
Mais calma, quando tiver que esperar  
E mais pressa, quando quiser chegar.

Quero colo, quando quiser descansar  
E mais furor quando quiser amar

Quero mais vinho, quando quiser me embriagar  
Mais inspiração quando quiser convencer  
E menos motivos quando quiser brigar

Quero uma vida boa enquanto viver  
E morte serena quando morrer  
Quero ser perdoada pelo que pequei  
E abençoada pelo que serei

**(Abençoada, poema de Lygia)**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela luz e perseverança

Para meus grandes amores e razão do meu viver: Larissa e Célia  
Milton e Sônia que sempre acreditaram em mim e me amam infinitamente

Aos irmãos Leo e Carol por serem estas graças em nossas vidas

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos profissionais e amigos que generosamente colaboraram de maneira expressiva na realização deste trabalho. A todos os professores do Departamento de Patologia Geral, aos colegas e amigos que sempre representaram, para mim, a imagem da persistência e resistência da tradição do ensino e do trabalho feitos com qualidade e dedicação.

Ao Prof. Alfredo José Afonso Barbosa, meu orientador, agradeço sua participação decisiva e insistente na minha formação. Foram muitas oposições, mas, chegamos ao fim.

Ao Prof. e amigo Dr. Geovanni Dantas Cassali pelos inúmeros consolos, sugestões e solução retrieval. Ao Prof. Dr. Wagner Luis Tafuri pela compreensão nos momentos mais difíceis.

Meu maior agradecimento, ao Prof. Dr. Eugênio Goullart, pelas análises estatísticas feitas e refeitas nos corredores do hospital e nas férias.

À Profa. Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral e à Profa. Dra. Adriana Maria Kakehasi pelas idéias e força. À profa. Rosa Arantes pelas idéias no delineamento do estudo.

À técnica Laudilene pela dedicação incessante e sorrisos sem fim. À técnica do Instituto Alfa, Luciene, pelas inúmeras conversas e ajuda com separação de material e coloração e a Lurdinha pela água destilada.

Aos melhores amigos de laboratório: Dras. Fernanda Vieira, Christiane Cartelle e Débora Yumi que estiveram em diversas imunos, pôsters, artigos, almoços, bate-papos e tricôs; aos melhores amigos cabeças: Roger, Enio, e Patrícia, que escutaram todas as reclamações, beberam todas as cervejas e estiveram sempre ao meu lado; aos melhores amigos que não foram na faculdade de medicina: Luis e Cláudia. Amo vocês todos os dias!

À Profa. Dra. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira, minha mestre desencarnada, por ter acreditado no meu potencial e iluminado o meu caminho. Minha admiração e respeito por sua competência. Rezo por sua serenidade. Descanse em paz.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Células D	Células produtoras de somatostatina
Células EC	Células enterocromafins
Células ECL	Células <i>enterochromaffin-like</i>
Células G	Células produtoras de gastrina
CgA	Chromogranina-A
COEP	Comitê de ética em pesquisa
dp	desvio padrão
ECL	<i>Enterochromaffin-like</i>
<i>et al.</i>	e outros
GAC	Gastrite atrófica do corpo
GH	Hormônio do crescimento
GHR	Ghrelina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HE	Hematoxilina-eosina
ihq	imuno-histoquímica
MEN-1	Neoplasia endócrina múltipla 1
MI	metaplasia intestinal
MPA	metaplasia pseudoantral
mRNA	Ácido ribonucléico (RNA) – mensageiro
p	valor p – significância estatística de um teste
PAS	Ácido Periódico de <i>Schiff</i>
PRE	Prepro-ghrelina
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
sABC	streptavidina biotina peroxidase
TNE	Tumor neuroendócrino
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
ZE	Zollinger-Ellison
µm	micrômetro

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Células imunorreativas à chromogranina-A em paciente com gastrite atrófica do corpo em nódulo hiperplásico com mais de 50% das células imunomarcadas e na hiperplasia difusa (ihq, aumento 400x)
- FIGURA 2:** Células imunorreativas à ghrelina em paciente com gastrite atrófica do corpo em nódulos hiperplásicos com mais de 50% das células imunomarcadas e na hiperplasia difusa (ihq, aumento 400x)
- FIGURA 3:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em paciente com gastrite atrófica do corpo em nódulos hiperplásicos com mais de 50% das células imunomarcadas e na hiperplasia difusa (ihq, aumento 400x)
- FIGURA 4:** Células imunorreativas à ghrelina em paciente com gastrite atrófica do corpo em metaplasia pseudoantral (ihq, aumento 400x)
- FIGURA 5:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em paciente com gastrite atrófica do corpo em metaplasia pseudoantral (ihq, aumento 400x)
- FIGURA 6:** Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando células uniformes sem atipia (HE, aumento de 400x)
- FIGURA 7:** Células imunorreativas à ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando menos de 10% das células imunomarcadas (ihq, aumento 40x)
- FIGURA 8:** Células imunorreativas à ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando menos de 10% das células imunomarcadas (ihq, aumento 400x)
- FIGURA 9:** Células imunorreativas à ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando mais de 50% das células imunomarcadas (ihq, aumento 400x)
- FIGURA 10:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando menos de 10% das células imunomarcadas (ihq, aumento 40x)
- FIGURA 11:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando menos de 10% das células imunomarcadas (ihq, aumento 400x)

**FIGURA 12:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando mais de 50% das células imunomarcadas (ihq, aumento 400x)

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

- QUADRO 1:** Anticorpos utilizados no estudo, diluição de trabalho e procedência
- TABELA 1:** Frequencia das características histológicas da gastrite crônica atrófica em relação à localização.
- TABELA 2:** Presença/ausência de imunomarcção à chromogranina-A, ghrelina ou prepró-ghrelina na mucosa antral de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo
- TABELA 3:** Frequência de imunorreatividade à chromogranina-A, ghrelina e prepró-ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo.
- TABELA 4:** Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de chromogranina-A e ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo.
- TABELA 5:** Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de chromogranina-A e prepró-ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo.
- TABELA 6:** Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de ghrelina e prepró-ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo.
- TABELA 7:** Presença da expressão de ghrelina e prepró-ghrelina em glândulas com metaplasias intestinal e pseudoantral no corpo de 54 pacientes com hiperplasia endócrina na gastrite atrófica do corpo
- TABELA 8:** Número de nódulos com mais de 50% das células coradas em imuno-histoquímica de chromogranina-A e ghrelina no corpo de 54 pacientes com hiperplasia endócrina na gastrite atrófica do corpo.
- TABELA 9:** Número de nódulos com mais de 50% das células coradas em imuno-histoquímica de chromogranina-A e prepró-ghrelina no

corpo de 54 pacientes com hiperplasia endócrina na gastrite atrofica do corpo

**QUADRO 2:** Características dos 15 pacientes com tumor neuroendócrino do estômago em relação ao sexo e idade.

**TABELA 10:** Positividade/ausência de imunorreatividade à chromogranina-A, sinaptofisina, ghrelina e prépro-ghrelina em 15 pacientes com tumores neuroendócrinos do estômago, considerando a quantidade de células marcadas.

**TABELA 11:** Frequência da intensidade de imunorreatividade à chromogranina-A, sinaptofisina, ghrelina e prépro-ghrelina em 15 pacientes com tumores neuroendócrinos do estômago.

**TABELA 12:** Frequência de imunorreatividade à chromogranina-A, sinaptofisina, ghrelina e prépro-ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina da mucosa oxintica adjacente ao tumor neuroendócrino de 15 pacientes.

**TABELA 13:** Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de Chromogranina A e Ghrelina em 15 pacientes com tumor neuroendócrino.

**TABELA 14:** Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de chromogranina-A e prépro-ghrelina em 15 pacientes com tumor neuroendócrino.

**TABELA 15:** Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de prépro-ghrelina e ghrelina em 15 pacientes com tumor neuroendócrino.

**TABELA 16:** Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de ghrelina em 15 pacientes com tumores neuroendócrinos e em nódulos hiperplásicos da mucosa adjacente a este tumor.

**TABELA 17:** Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de prépro-ghrelina em 15 pacientes com tumores neuroendócrinos e em nódulos hiperplásicos da mucosa adjacente a este tumor.

## RESUMO

**Introdução e objetivos:** Ghrelina (GHR) é um peptídeo de 28 aminoácidos, reconhecido como um liberador endógeno do hormônio do crescimento sendo secretado principalmente por células endócrinas da mucosa gástrica. A expressão imuno-histoquímica da GHR tem sido descrita na hiperplasia endócrina da mucosa gástrica de pacientes com gastrite atrófica do corpo (GAC) e em tumores neuroendócrinos (TNE). Acredita-se que a GHR possa ter ação moduladora relacionada ao crescimento celular. O presente trabalho objetiva estudar a presença de células endócrinas imunorreativas à GHR e sua molécula precursora prepro-ghrelina (PRE) na mucosa atrófica de pacientes em estágios avançados de GAC e em TNE tipo I. **Material e Métodos:** Biópsias endoscópicas de 54 pacientes com GAC e amostras de biópsias endoscópicas e mucosectomia de 15 pacientes portadores de TNE da mucosa gástrica, associados à GAC foram processadas para imuno-histoquímica e anticorpos específicos contra GHR, PRE e chromogranina-A (CgA) foram utilizados. As células imunorreativas foram examinadas na hiperplasia endócrina presente na mucosa atrófica, nas áreas de metaplasia intestinal (MI) e pseudoantral (MPA) e nos TNE. Para finalidade deste trabalho considerou-se dois tipos de hiperplasia endócrina associada à GAC, que são: hiperplasia endócrina difusa e a hiperplasia endócrina nodular, a primeira constituída por células na parede glandular e a segunda por grupos de células na intimidade da lâmina própria. **Resultados:** A expressão de GHR e PRE foi observada em número variável de células endócrinas hiperplásicas em todos os pacientes estudados. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) foi encontrada ao se aplicar o teste *t* pareado entre os dois grupos de nódulos hiperplásicos com mais de 50% de células imunomarcadas para CgA e GHR ou CgA e PRE. As áreas de MI e MPA estavam presentes nos cortes histológicos de 42 (77,8%) e de 51 (94,4%) pacientes, respectivamente. A presença da expressão de GHR e PRE foi incomum em glândulas exibindo MI, respectivamente em 4 (7,4%) e em 9 (16,7%) casos e foram relativamente freqüentes nas glândulas exibindo MPA, em respectivamente 37 (68,5%) e 26 (48,1%) casos. Em relação aos TNE a CgA foi positiva em 14 (93,3%) tumores dos 15 estudados. Células imunorreativas à GHR foram detectadas em 12 (80%) tumores e de PRE em 13 (87%), ocorrendo excelente concordância entre os resultados imuno-histoquímicos dos dois antígenos. A expressão de GHR e de PRE foi detectada em nódulos hiperplásicos presentes na mucosa adjacente ao tumor em 7 (47%) e 8 (53%) casos respectivamente, não ocorrendo concordância entre esta expressão com a quantidade de células neoplásicas. **Conclusão:** Células imunorreativas a GHR e PRE estão presentes com freqüência na hiperplasia endócrina nodular em pacientes nos estágios avançados de GAC e nos TNE tipo I associados à GAC. Estas células ocorrem com relativa freqüência nas glândulas com MPA e são incomuns em glândulas com MI. Entretanto, até que ponto este hormônio estaria atuando como modulador do crescimento e evolução da hiperplasia endócrina na GAC e dos TNE é matéria para novos estudos.

## ABSTRACT

**Introduction and objective:** Ghrelin (GHR) is a 28 amino acid peptide that releases growth hormone endogenously and is mainly secreted by endocrine cells of the gastric mucosa. Immunohistochemical expression of ghrelin has been reported to occur in endocrine hyperplasia of the gastric mucosa of patients with atrophic body gastritis (ABG) and in neuroendocrine tumors (NE). GHR is believed to have a modulating action related to cell growth. The objective of the present investigation was to determine the presence of endocrine cells immunoreactive to ghrelin and to its precursor molecule preproghrelin (PRE) in the atrophic mucosa of patients in advanced stages of ABG and with type I neuroendocrine tumors. **Material and Methods:** Endoscopic biopsies were obtained from 54 patients with ABG and samples of endoscopic biopsies and of mucosectomy were obtained from 15 patients with NE of the gastric mucosa associated with ABG. All samples were processed for immunohistochemistry and specific antibodies against GHR, PRE and chromogranin-A (CgA) were used. The immunoreactive cells were examined in the endocrine hyperplasia present in the atrophic mucosa, in the areas of intestinal and pseudoantral metaplasia, and in the NE. For the objectives of the present study, two types of endocrine hyperplasia associated with ABG were considered, i.e., diffuse endocrine hyperplasia and nodular endocrine hyperplasia, the former consisting of cells in the glandular wall and the latter consisting of groups of cells inside the lamina propria. **Results:** GHR expression was observed in a variable number of hyperplastic endocrine cells in all patients studied. Statistically significant difference ( $p < 0,05$ ) was found when applying the paired *t* test between two groups of hyperplastic nodules with more than 50% positive cells, immunostained for CgA and GHR or CgA and PRE. The areas of intestinal and pseudoantral metaplasia were present in the histological sections of 42 (77.8%) and 51 (94.4%) patients, respectively. The presence of GHR and PRE was uncommon in glands showing intestinal metaplasia, being detected in 4 (7.4%) and 9 (16.7%) cases, respectively, and was relatively frequent in glands exhibiting pseudoantral metaplasia, being detected in 37 (68.5%) and 26 (48.1%) cases, respectively. CgA was positive in 14 (93,3%) of 15 NE studied. GHR-immunoreactive cells were detected in 12 (80%) tumors and PRE-immunoreactive cells were detected in 13 (87%), with excellent agreement between the immunohistochemical results of the two antigens. GHR and PRE expression was detected in hyperplastic nodules present in the mucosa adjacent to the tumor in 7 (47%) and 8 (53%) cases, respectively, with no agreement between these results and the amount of neoplastic cells. **Conclusion:** GHR- and PRE immunoreactive cells are frequently present in nodular endocrine hyperplasia of patients in advanced ABG stages and in the type I NE associated with it. These cells occur in a relatively frequent manner in glands with pseudoantral metaplasia and are uncommon in glands with intestinal metaplasia. However, further studies are needed to determine to what extent this hormone acts as modulator of the growth and evolution of endocrine hyperplasia in ABG and of NE.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas e Siglas.....</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Quadros e Tabelas.....</b>	<b>x</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Sumário.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. Introdução: revisão de literatura.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Células endócrinas da mucosa gástrica.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Gastrite atrófica do corpo .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Tumores neuroendócrinos gástricos.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Células endócrinas produtoras de Ghrelina.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Ghrelina e carcinóides.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Coleta e processamento do material .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Estudo imuno-histoquímico .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Análise histológica e imuno-histoquímica das hiperplasias .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Análise histológica e imuno-histoquímica dos tumores neuroendócrinos e das mucosas adjacentes a eles.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Análise Estatística... ..</b>	<b>24</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>25</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>59</b>
<b>7.Referências Bibliográficas .....</b>	<b>60</b>
<b>8.Anexos.....</b>	<b>65</b>
<b>8.1 Artigo Científico publicado no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial no ano de 2010.....</b>	<b>65</b>
<b>8.2 Artigo Científico publicado no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial no ano de 2011.....</b>	<b>72</b>
<b>8.3 Cópia da ata de defesa e declaração de aprovação da tese.....</b>	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO: REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 CÉLULAS ENDÓCRINAS DA MUCOSA GÁSTRICA

A histologia da mucosa gástrica humana apresenta três compartimentos bem definidos: a mucosa da cárdia, mucosa oxíntica (fúndica ou do corpo) e mucosa antral (ou pilórica). Em todas se observa células endócrinas dispersas entre as células epiteliais de função exócrina. Na mucosa antral são encontradas as células G, D e EC. As células G são produtoras de gastrina, compõem cerca de 60% das células endócrinas do antro, localizam-se no terço superficial da mucosa antral, próximas a luz glandular, de onde podem receber estímulos. As células D produzem somatostatina e localizam-se na metade basal da mucosa. As células EC antrais são menos numerosas e apresentam conteúdo serotoninérgico, com fisiologia desconhecida na mucosa gástrica. As células endócrinas da mucosa da cárdia têm sido pouco estudadas e as células da mucosa oxíntica são numerosas e é cada vez maior o interesse por seu estudo.

O elemento endócrino predominante na mucosa oxíntica, aproximadamente 35% das células endócrinas na espécie humana, é a célula ECL (*Enterochromaffin-like*), sem contato com a luz glandular. Produzem e armazenam histamina e estimulam a secreção de ácido pelas células parietais. Estas células foram denominadas ECL porque coram com cromato de potássio. Dentro dos grânulos de secreção da maioria de células endócrinas encontramos Chromogranina-A (CgA). Por esta razão, é amplamente usada como marcador geral de células endócrinas (PORTELA-GOMES *et al.*, 2001). A CgA é liberada juntamente com hormônios e, por isto, também é marcador bioquímico para o diagnóstico de desordens de células neuroendócrinas. Mais recentemente, a dosagem sérica da CgA vem sendo utilizada com boa sensibilidade como marcador de tumores gastro-entero-pancreáticos neuroendócrinos, sendo sua principal origem a proliferação de células endócrinas da mucosa gástrica fúndica (BORCH *et al.*, 1997, PERACCHI *et al.*, 2005).

Outro marcador também utilizado para reconhecimento de células endócrinas na mucosa gástrica é a sinaptofisina. É uma glicoproteína de membrana celular, identificada nas vesículas pré-sinápticas de neurônios e em células neuroendócrinas. É considerada marcador diagnóstico dos tumores neuroendócrinos (ERICKSON & LLOYD, 2004, MIETTINEN, 1987).

## 1.2 GASTRITE ATRÓFICA DO CORPO

Gastrite crônica é definida como a presença de alterações inflamatórias crônicas na mucosa gástrica, eventualmente levando à atrofia e metaplasia intestinal (COTRAN *et al.*, 1999; CORREA, 1994).

As gastrites são classificadas em agudas ou crônicas e entre as últimas, do ponto de vista morfológico, em atróficas, não-atróficas e especiais, segundo o Sistema de Sydney (DIXON *et al.*, 1996). As gastrites atróficas se classificam de acordo com a provável etiologia em: (a) auto-imunes (gastrite atrófica difusa do corpo ou tipo A), (b) multifocais (pangastrite ou gastrite tipo AB) cuja atrofia acomete antro e corpo gástricos e cujo agente etiológico principal é o *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). As gastrites não-atróficas consistem em amplo espectro de alterações histológicas do antro gástrico (gastrite tipo B), a maioria delas também associadas à infecção pelo *H. pylori*. Formas especiais de gastrite podem ser exemplificadas como aquelas provocadas por radiações, associadas a doenças granulomatosas, infecções virais, fúngicas, ou parasitárias. As alterações da mucosa gástrica de etiologia medicamentosa, refluxo biliar e outras, antes denominadas “gastrite”, são rotuladas hoje como gastropatias.

A atrofia da mucosa gástrica é caracterizada pelo adelgaçamento da camada mucosa do estômago devido à diminuição do componente glandular. Quando ocorre na mucosa do corpo pode resultar em hipocloridria ou acloridria, além de redução ou ausência da secreção do fator intrínseco e de pepsinogênio. A gastrite atrófica difusa do corpo, com preservação da integridade da mucosa antral, possui intervenção de fatores genéticos e mecanismos auto-imunes. Esta atrofia tem como principal consequência, em sua evolução, o desenvolvimento de

anemia macrocítica, por deficiência de absorção de vitamina B12, devido a falta de secreção gástrica de fator intrínseco (MONGIN, 1993).

Algumas alterações histopatológicas vêm sendo descritas como precursoras da gastrite atrófica do corpo (GAC) antecedendo a perda das glândulas da mucosa oxíntica: 1) presença de infiltrado de mononucleares na lâmina própria, mais frequentemente localizados profundamente nas porções glandulares da mucosa; 2) infiltração de linfócitos com frequentes focos de destruição das glândulas oxínticas nestas regiões; 3) presença de metaplasia intestinal (MI); 4) pseudo-hipertrofia das células parietais remanescentes; finalmente, como desfecho desse processo, o que ocorre em um terço dos casos, há hiperplasia das células endócrinas (TORBENSON, 2002).

A MI, alteração do fenótipo de células gástricas para outro espectro de células com características intestinais, pode ser consequência da gastrite crônica, principalmente induzida pela bactéria *H. pylori*. É um achado comum na mucosa gástrica de pacientes com gastrite atrófica de origem auto-imune (PETERSSON, 2002). A presença de MI tem sido correlacionada com o aumento do risco de câncer gástrico e muitas questões ainda precisam ser elucidadas. Pacientes com gastrite auto-imune têm chance três a quatro vezes maior que a população geral de desenvolver carcinoma gástrico porém, Petersson *et al.* (2002) encontraram a mesma prevalência de metaplasia entre pacientes com gastrite atrófica auto-imune e a população geral, sugerindo que outros fatores estão envolvidos na patogênese do câncer nestes pacientes.

### **1.3 TUMORES NEUROENDÓCRINOS GÁSTRICOS**

As células ECL podem sofrer hiperplasia e/ou neoplasia. Atualmente são conhecidos três tipos de tumores neuroendócrinos (TNE) gástricos, ou carcinóides, associados à proliferação das células ECL e estes são denominados como tipos I, II e III. A hipergastrinemia é a causa patofisiológica do desenvolvimento do tumor tipo I e II. O desenvolvimento dos tumores ocorre

através da seguinte sequência: a hiperplasia é seguida de displasia e neoplasia (JANSON *et al.*, 2008).

Os TNEs do tipo I são normalmente múltiplos e estão associados à hiperplasia de células ECL que ocorrem na GAC. Os pacientes apresentam quase sempre acloridria e anemia perniciosa. Os TNEs tipo II se desenvolve em pacientes com hipergastrinemia resultante de gastrinoma frequentemente associado à Síndrome de Zollinger-Ellison (ZE), com ou sem neoplasia endócrina múltipla 1 (MEN-1). Os TNEs tipo III são tumores esporádicos, geralmente solitários, muitas vezes grandes, e não associados a hipergastrinemia ou hiperplasia das células ECL. Tumores do tipo I são de baixa malignidade, tipo III são potencialmente mais malignos, e tipo II são intermediários. Tumores tipo III muitas vezes apresentam metástase no momento do diagnóstico. (JANSON *et al.*, 2008).

#### **1.4 CÉLULAS ENDÓCRINAS PRODUTORAS DE GHRELINA**

A ghrelina (GHR) é um hormônio orexígeno, ligante endógeno para o receptor do hormônio do crescimento (GH). Admite-se ser um dos fatores responsáveis pelo estímulo do apetite, através da ativação de neurônios hipotalâmicos, enquanto que a leptina teria um efeito oposto (KORBONITS *et al.*, 2004; VAN DER LELY *et al.*, 2004). É produzido e secretado, principalmente, por células das glândulas oxínticas do estômago (ABIKO *et al.*, 2005). É um peptídeo de 28 aminoácidos descrito pela primeira vez por Kojima *et al.* em 1999. As células produtoras de GHR já foram identificadas na mucosa gástrica humana normal, atrófica, hipertrófica e em tumores endócrinos gástricos, pancreáticos e pulmonares (LEONTIOU *et al.*, 2007). Na mucosa gástrica estas células perfazem cerca de 20% da população de células endócrinas das glândulas oxínticas no homem (ZHAO *et al.*, 2008). Este peptídeo é um novo membro da família de peptídeos cérebro-intestinais, e está envolvido no controle do apetite aparentemente independente da liberação de GH (KORBONITS *et al.*, 2004; VAN DER LELY *et al.*, 2004).

Tanto a GHR quanto seu mRNA estão presentes no núcleo arqueado do hipotálamo e na glândula pituitária (KOJIMA *et al.*, 1999; GNANAPAVAN *et al.*, 2002). A GHR tem uma distribuição ampla e foi encontrado no rim, placenta, pulmão, ovário, testículos, entre outros, mas o seu papel fisiológico nestes locais não está elucidado (GNANAPAVAN *et al.*, 2002). Quantidades consideráveis desse hormônio estão presentes no sangue e ele está implicado na regulação do GH (KORBONITS *et al.*, 2004; VAN DER LELY *et al.*, 2004). É capaz de aumentar a liberação de GH tanto em animais quanto em humanos e também induz a secreção de prolactina, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), cortisol e aldosterona *in vivo* (KOJIMA *et al.*, 1999; ARVAT *et al.*, 2000; TAKAYA *et al.*, 2000; ARVAT *et al.*, 2001).

GHR provoca um ligeiro aumento nos níveis de glicose e uma redução de insulina circulante (ARVAT *et al.*, 2001). O peptídeo precursor da GHR é a preproghrelina (PRE). Este, quando clivado, pode gerar, também, obestatina.

## 1.5 GHRELINA E CARCINÓIDES

Em 2001, Papotti *et al.* estudaram hiperplasias endócrinas gastrointestinais e lesões neoplásicas por imuno-histoquímica (ihq), RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) e hibridação *in situ*. Neste estudo, os autores encontraram GHR na maioria dos tumores carcinóides (75%) e somente em 27% de adenocarcinomas intestinais (PAPOTTI *et al.*, 2001). A presença de GHR foi confirmada pelo achado de RNAm. Estes autores sugerem que os níveis de GHR circulante possam ser úteis no diagnóstico de gastrite atrófica associados com crescimento de células neuroendócrinas, assim como em outros tumores gastrointestinais de natureza neuroendócrina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Objetivou-se avaliar a expressão de ghrelina e prepró-ghrelina na mucosa gástrica de pacientes com gastrite atrófica do corpo e em tumores neuroendócrinos tipo I do estômago.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar, através de métodos histológicos e imuno-histoquímicos, a presença de células imunorreativas a chromogranina-A, ghrelina e prepró-ghrelina em: (a) tumores neuroendócrinos do estômago associados à gastrite atrófica do corpo; (b) diferentes tipos de hiperplasia endócrina presentes na mucosa gástrica adjacente a estes tumores e seu grau de reatividade aos antígenos acima descritos; (c) mucosa antral e oxíntica de pacientes com hiperplasia endócrina associada à gastrite atrófica do corpo e (d) analisar comparativamente os resultados obtidos das imunomarcações nas metaplasias intestinal e pseudoantral, duas alterações histopatológicas frequentemente encontradas na gastrite atrófica do corpo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi realizado em material de biópsias endoscópicas e peças cirúrgicas previamente colhidas do Instituto Alfa de Gastroenterologia- Hospital das Clínicas da UFMG e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFMG sob o protocolo de número COEP n°479/04 de 9 de setembro de 2009.

#### **3.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL**

Em todos os casos, a Endoscopia Digestiva Alta havia seguido as normas de rotina dos serviços. As biópsias ou peças utilizadas haviam sido fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina e cortes histológicos de 4µm foram corados pela hematoxilina-eosina (HE). Somente foram utilizados casos de biópsias endoscópicas consecutivas do corpo e do antro de pacientes com diagnóstico de GAC que permitissem adequada análise histológica e cortes extras para as colorações especiais e imuno-histoquímica. Amostras de TNEs foram obtidas de biópsias endoscópicas e peças de mucosectomia.

#### **3.2 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO**

Foram analisados tecidos provenientes de biópsias do antro e do corpo de 54 pacientes com hiperplasia de células endócrina associada à GAC geralmente de etiologia auto-imune e 15 biópsias e/ou peças cirúrgicas de pacientes com carcinóides gástricos.

Realizou-se, em cortes histológicos de 4µm de espessura, a técnica ihq pelo método da estreptavidina-biotina (sABC) de acordo com procedimentos publicados (HSU S-M *et al.*, 1981). Os cortes histológicos foram colocados em lâminas de vidro previamente silanizadas 4% (Sigma Diagnostics, EUA). Detalhes sobre os anticorpos que foram utilizados no estudo estão discriminados no quadro 1.

Para a identificação dos elementos endócrinos utilizou-se o anticorpo anti-chromogranina-A ou anti-sinaptofisina (este último apenas para confirmação diagnóstica de TNE).

Foram feitos pré-tratamentos para recuperação antigênica com solução de recuperação (Dako) e, para a amplificação da marcação dos anticorpos GHR e PRE, utilizou-se polímero (Novocastra). A coloração de fundo foi feita com hematoxilina de Harris. Controles negativos consistiram na substituição dos anti-soros primários por imunoglobulinas de coelho ou cabra da mesma classe e concentração dos anticorpos primários.

### QUADRO 1.

Anticorpos utilizados no estudo, diluição de trabalho e procedência

ANTI-SORO	DILUIÇÃO DE USO	PROCEDÊNCIA
Ghrelina	1:1500	Phoenix Pharmaceuticals, Inc.
Prepro-ghrelina	1:4000	Phoenix Pharmaceuticals, Inc.
Chromogranina-A	1:150	Novocastra
Sinaptofisina	1:50	Dakocytomation

### 3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS HIPERPLASIAS

Primeiramente, as lâminas de antro e corpo, coradas em HE, foram analisadas quanto aos graus de atividade, atrofia glandular e inflamação. Esses foram classificados como discreto, moderado, acentuado ou ausente. Foram analisadas áreas de MI e a metaplasia pseudoantral (MPA), sendo que esta última estaria somente na mucosa oxíntica, e classificou-se em: presente ou ausente; e focal (se estavam apenas em uma cripta) ou multifocal (mais de uma cripta). Para a determinação do tipo de metaplasia, se MI ou MPA, foram realizadas as técnicas histológicas: PAS Alcian Blue. Com esta técnica, o glicogênio e polissacarídeos

neutros coram-se em vermelho e os polissacarídeos ácidos em azul (vê-se apenas MI). A cor violeta representa associação de ambos (SPICER, 1965).

A análise da expressão imuno-histoquímica foi feita por meio de contagem de células marcadas, utilizando-se microscópio óptico em objetiva de 40x. A contagem foi feita em campos microscópicos abrangendo apenas glândulas, iniciando-se numa das extremidades do corte. Foi padronizado o número de campos a serem contados (8 campos na objetiva 40x). O número de células marcadas pelo anticorpo CgA, no antro, foi classificado como distribuição normal quando apresentava distribuição regular e uniforme ao longo dos colos glandulares e como hiperplasia quando, subjetivamente, notou-se densidade comparativamente muito aumentada destas células (com confirmação pelo Prof. orientador do presente trabalho). Em relação à mucosa oxíntica analisou-se o padrão de hiperplasia: difusa; difusa e linear; difusa e nodular; difusa, linear e nodular. Considerou-se como nódulo, a presença de pelo menos 5 células imunorreativas, imersas na lâmina própria. Para cada paciente avaliou-se 8 campos consecutivos com aumento de 400x. Os nódulos foram subdivididos em: 1) nódulos com mais de 50% das células imunomarcadas ou 2) menos de 50% das células imunomarcadas.

Ao analisar a expressão ihq de GHR e PRE, no antro, apenas verificou-se se estava presente ou não. Na mucosa oxíntica foi realizada a análise do padrão de hiperplasia existente e quantificou-se o número de nódulos.

### **3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS TUMORES NEUROENDÓCRINOS E DAS MUCOSAS ADJACENTES A ELES.**

Todas as lâminas de casos de TNEs foram coradas em HE, CgA, sinaptofisina, GHR, PRE.

A análise da expressão ihq do tumor foi semi-quantitativa em: < 10% das células, de 10 a 50%, > 50%, ou se não havia marcação das células de todo o tumor, ou seja, a área do tumor foi quantificada pelo observador. Foi analisada subjetivamente a intensidade da marcação em fraca, moderada e intensa.

A mucosa adjacente ao tumor foi corada por ihq e a análise foi semelhante a feita aos casos de pacientes com hiperplasia associada à gastrite atrófica do corpo.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Dada a natureza das variáveis em estudo, que são ordinais e semi-quantitativas, com algumas variáveis qualitativas, os dados obtidos foram analisados pelos métodos do coeficiente de Kappa, considerando-se os seguintes pontos de corte: kappa < 40% concordância fraca, kappa  $\geq$  40% a < 75 % concordância razoável e boa, kappa  $\geq$  75 % concordância excelente.

Para comparação de médias usou-se o teste t de Student e considerou-se como significativo quando o valor de p fosse menor que 0,05.

#### 4. RESULTADOS

Estudaram-se 54 pacientes com hiperplasia endócrina associado à GAC, 12 (22,2%) homens e 42 (77,8%) mulheres, com média de idade geral de  $54 \pm 15$  anos, das mulheres  $53 \pm 14$  anos e dos homens de  $58 \pm 19$  anos.

A avaliação prévia da mucosa gástrica pelo exame endoscópico dos pacientes com diagnóstico histológico confirmado de GAC foi, principalmente, com os seguintes diagnósticos: (a) pacientes com pangastrite ou pangastrite enantematosa, 45 casos (83,3%); (b) pacientes com gastrite atrófica ou gastrite atrófica difusa, 7 casos (13%); (c) pacientes com lesão elevada ou pólipos ou pólipos hiperplásicos, 2 casos (3,7%). Portanto o exame histológico foi fundamental para o estabelecimento do diagnóstico final de GAC e de TNE.

Os achados histológicos da mucosa gástrica atrófica do corpo, verificada em 54 pacientes deste estudo, estão expressos na tabela 1, quais sejam: inflamação, atividade, atrofia e metaplasia intestinal em relação à localização (antro e corpo). A GAC caracteriza-se por lesão difusa da mucosa do corpo e do fundo, com mucosa antral relativamente bem preservada. Há presença de infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria de intensidade variável. A presença de maior ou menor atividade inflamatória é dada pelo número de polimorfonucleares: neutrófilos e/ou eosinófilos. Agregados linfóides, folículos linfóides com centros germinativos podem ser observados.

**TABELA 1.**

Frequencia das características histológicas da gastrite crônica atrófica em relação à localização.

<b>Parâmetros de Gastrite</b>	<b>Antro- N (%)</b>	<b>Corpo- N (%)</b>
<b>Inflamação</b>		
<b>Ausente</b>	8 (14,8)	0
<b>Discreta</b>	43 (79,6)	16 (29,6)
<b>Moderada</b>	3 (5,6)	35 (64,8)
<b>Acentuada</b>	0	3 (5,6)
<b>Atividade</b>		
<b>Ausente</b>	44 (81,5)	0
<b>Discreta</b>	8 (14,8)	35 (64,8)
<b>Moderada</b>	2 (3,7)	19 (35,2)
<b>Acentuada</b>	0	0
<b>Atrofia</b>		
<b>Ausente</b>	46 (85,2)	0
<b>Discreta</b>	6 (11,1)	1 (1,9)
<b>Moderada</b>	2 (3,7)	3 (5,6)
<b>Acentuada</b>	0	50 (92,6)
<b>Metaplasia intestinal</b>		
<b>Ausente</b>	49 (90,7)	12 (22,2)
<b>Discreta</b>	4 (7,4)	36 (66,7)
<b>Moderada</b>	1 (1,9)	4 (7,4)
<b>Acentuada</b>	0	2 (3,7)

Entre os pacientes estudados 51 (94,4%) apresentaram MPA enquanto apenas 3 (5,6%) não apresentaram esta alteração. Entre os 51 pacientes com MPA 39 (%) são do sexo feminino e 12 (%) do sexo masculino.

Dos 42 pacientes que apresentaram MI, 34 são mulheres e 8 homens e dos 12 sem este tipo de metaplasia 8 são do sexo feminino e 4 masculino.

**TABELA 2.**

Presença/ausência de imunomarcção à chromogranina-A, ghrelina ou prépro-ghrelina na mucosa antral de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo.

<b>Marcação</b>	<b>CgA*- N (%)</b>	<b>GHR**- N (%)</b>	<b>PRE***- N (%)</b>
<b>Ausente</b>	4 (7,4)	52 (96,3)	50 (92,6)
<b>Presente</b>	50 (82,6)	2 (3,7)	4 (7,4)

\*CgA=chromogranina-A; \*\*GHR=ghrelina; \*\*\*PRE=prepro-ghrelina

Ao considerarmos a imunomarcção da mucosa antral para CgA, nos 54 pacientes com hiperplasia endócrina com GAC, obteve-se 4 (7,4%) pacientes negativos, sem a presença da expressão do marcador. Cortes inapropriados são esperados em histologia: cortes oblíquos, que não atravessam a área glandular, biópsias pequenas do antro, ou bloco desgastado (material usado em outro estudo). Dos 54 pacientes, 50 (82,6%) expressam CgA.

Verifica-se, na tabela 2, que GHR e PRE são negativas na maioria dos cortes de antro: 52 (96,3%) e 50 (92,6%) pacientes respectivamente. Quando estão positivas, 2 (3,7%) e 4 (7,4%), a expressão mostra-se isolada, difusa e escassa.

**TABELA 3.**

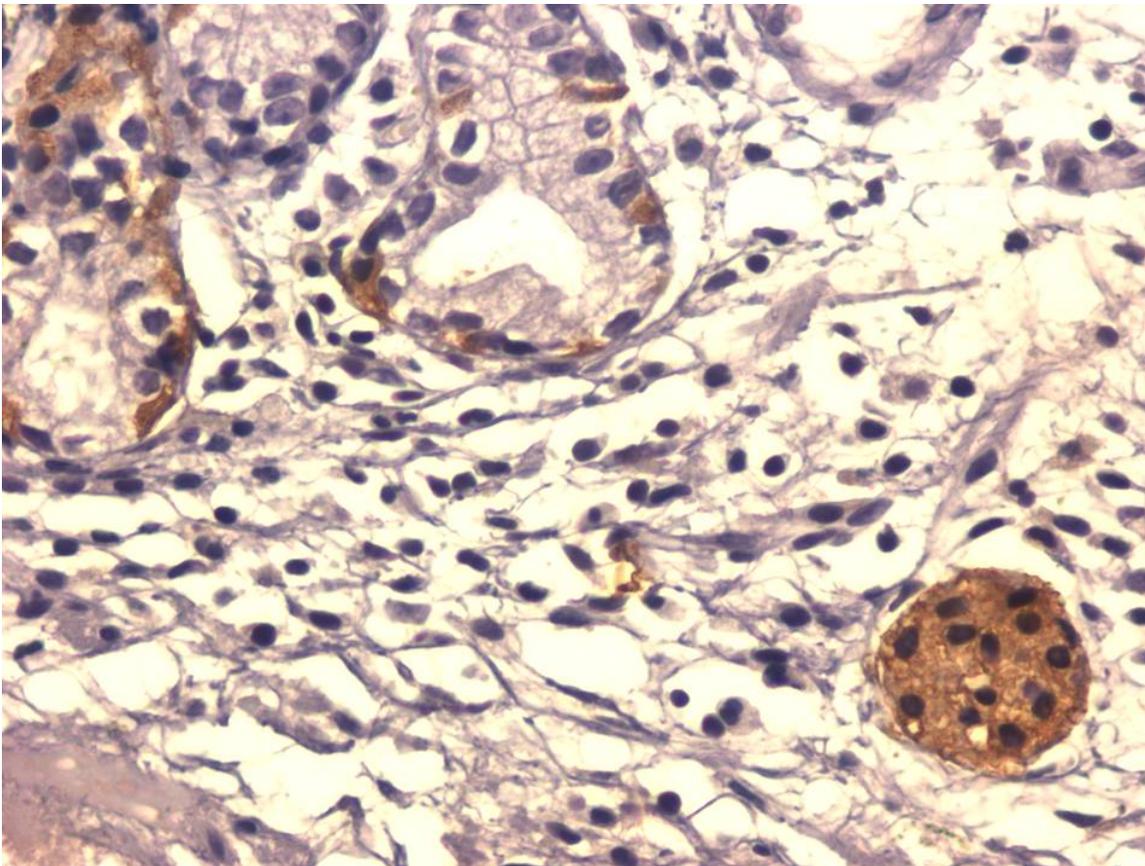
Frequência de imunorreatividade à chromogranina-A, ghrelina e prépro-ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo.

<b>Padrão</b>	<b>CgA* - N (%)</b>	<b>GHR** - N(%)</b>	<b>PRE*** - N(%)</b>
<b>Somente Difusa</b>	3 (5,6)	7 (13)	5 (9,3)
<b>Difusa+linear+nodular</b>	51 (94,4)	47 (87)	49 (90,7)

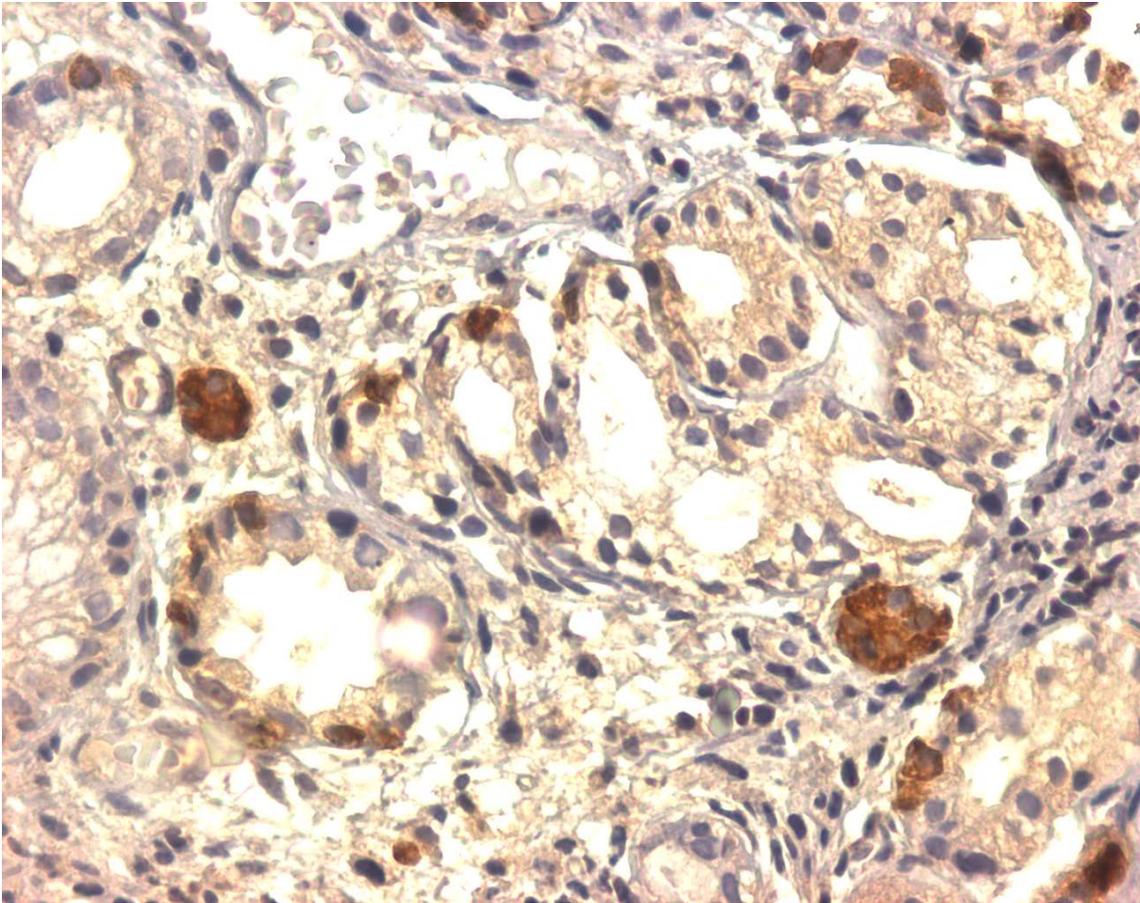
\*CgA=chromogranina-A; \*\*GHR=ghrelina; \*\*\*PRE=prepro-ghrelina

Ao considerarmos os tipos de hiperplasia endócrina que podem ocorrer na mucosa oxíntica de pacientes com GAC, verificam-se três padrões distintos: hiperplasia difusa, hiperplasia linear e hiperplasia nodular. Ao analisar os resultados, nenhum paciente foi incluído no grupo de “hiperplasia difusa+linear” e, por isto, para que não houvesse um erro de análise, agregaram-se os grupos em apenas dois padrões: hiperplasia difusa ou todos os tipos de hiperplasia.

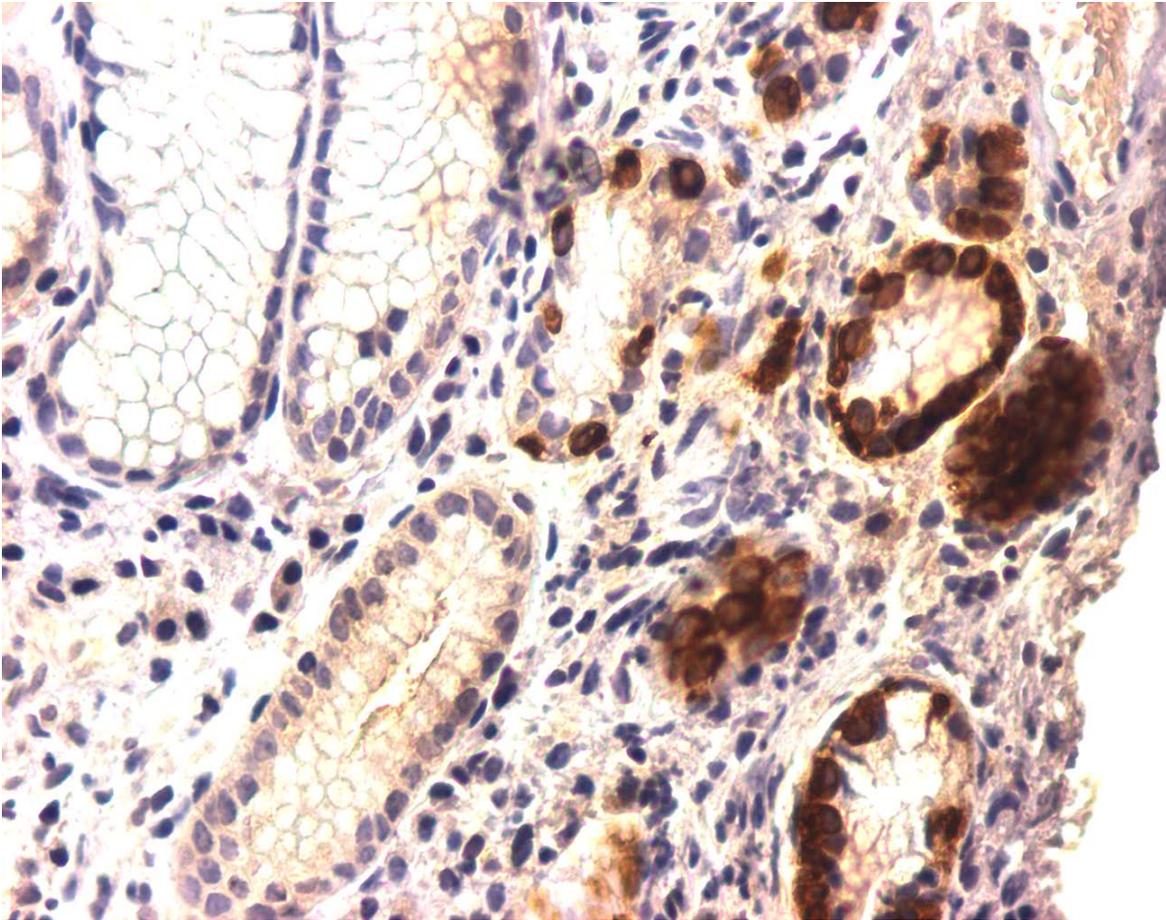
Como visto na tabela 3, o padrão difuso, linear e nodular predomina para todos os imunomarcadores: CgA, GHR e PRE com 51 (94,4%), 47 (87%) e 49 (90,7%) respectivamente, para o estudo de 54 pacientes com hiperplasia endócrina do corpo na GAC. Em todos estes pacientes são observados pelo menos um nódulo. Na hiperplasia difusa, as células apresentam-se isoladas e este padrão de hiperplasia não predomina nos pacientes do estudo em questão. Pode-se visualizar o padrão de hiperplasia difusa e nodular para os imunomarcadores CgA, GHR e PRE nas figuras 1, 2 e 3.



**FIGURA 1:** Células imunorreativas à chromogranina-A em paciente com gastrite atrófica do corpo em nódulo hiperplásico com mais de 50% das células imunomarcadas e na hiperplasia difusa (ihq, aumento 400x)



**FIGURA 2:** Células imunorreativas à ghrelina em paciente com gastrite atrófica do corpo em nódulos hiperplásicos com mais de 50% das células imunomarcadas e na hiperplasia difusa (ihq, aumento 400x)



**FIGURA 3:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em paciente com gastrite atrófica do corpo em nódulos hiperplásicos com mais de 50% das células imunomarcadas e na hiperplasia difusa (ihq, aumento 400x)

**TABELA 4.**

Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de chromogranina-A e ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo.

<b>CgA**</b>	<b>GHR***</b>		<b>Total</b>
	<b>Somente difusa</b>	<b>Todos*</b>	
<b>Somente Difusa</b>	2	1	3
<b>Todos*</b>	5	46	51
<b>Total</b>	7	47	54

Kappa= 35%;

\*Todos= difusa+linear+nodular; \*\*CgA=chromogranina-A; \*\*\*GHR=ghrelina;

Para a concordância entre a expressão ihq de CgA em relação à expressão ihq de GHR nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com GAC usamos o mesmo critério de aglutinação de grupos: pacientes que possuem somente hiperplasia difusa e pacientes com todos os tipos de hiperplasia (difusa, linear e nodular). Observa-se que a concordância é fraca entre os marcadores (CgA e GHR).

**TABELA 5.**

Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de chromogranina-A e prepró-ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo.

<b>CgA**</b>	<b>PRE***</b>		<b>Total</b>
	<b>Somente difuso</b>	<b>Todos*</b>	
<b>Somente Difuso</b>	2	1	3
<b>Todos*</b>	3	48	51
<b>Total</b>	5	49	54

Kappa= 46%;

\*Todos= difuso+linear+nodular; \*\*CgA=chromogranina-A; \*\*\*PRE=prepró-ghrelina;

A concordância entre a expressão ihq de CgA e PRE nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com GAC é razoável. Apesar da alta concordância entre casos com todos os tipos de hiperplasia (n=48), há poucos casos concordantes de hiperplasia difusa (n=2) comparados aos discordantes (n=4).

**TABELA 6.**

Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de ghrelina e prepró-ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com gastrite atrófica do corpo.

GHR**	PRE***		Total
	Somente difuso	Todos*	
<b>Somente Difuso</b>	3	4	7
<b>Todos*</b>	2	45	47
<b>Total</b>	5	49	54

Kappa= 44%;

\*Todos= difuso+linear+nodular; \*\*GHR=ghrelina; \*\*\*PRE=prepró-ghrelina;

A concordância entre a expressão ihq de GHR e PRE nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina do corpo de 54 pacientes com GAC é razoável, visto que 45 pacientes possuem marcação para GHR e PRE, ao mesmo tempo, para todos os tipos de hiperplasia e 3 pacientes são concordantes para hiperplasia difusa. Os casos discordantes, n=6, fazem com que o resultado não seja ótimo.

**TABELA 7.**

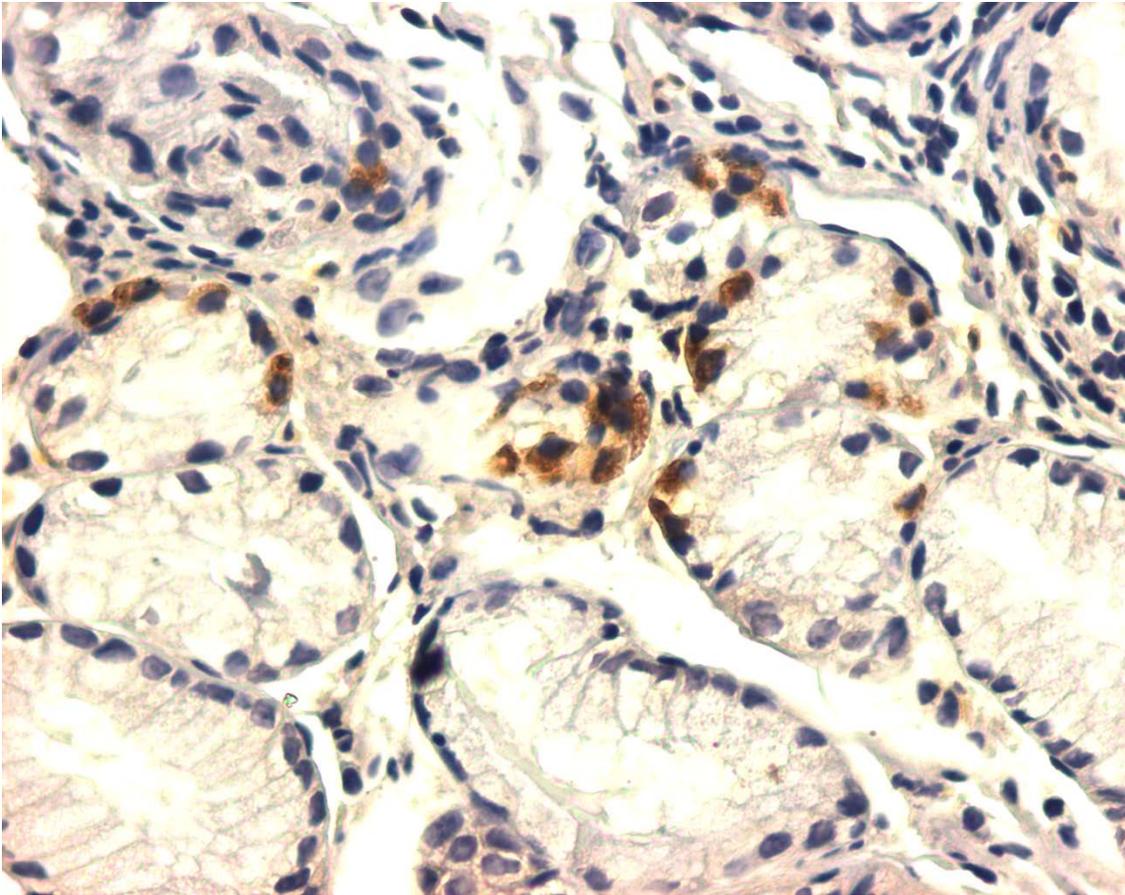
Presença da expressão de ghrelina e prepró-ghrelina em glândulas com metaplasias intestinal e pseudoantral no corpo de 54 pacientes com hiperplasia endócrina na gastrite atrófica do corpo.

<b>Tipo de Metaplasia</b>	<b>Presença de metaplasia N (%)</b>	<b>Presença de GHR*** N (%)</b>	<b>Presença de PRE**** N (%)</b>
<b>MI*</b>	42 (77,8%)	4 (9,5%)	9 (21,4%)
<b>MPA**</b>	51 (94,4%)	37 (72,5%)	26 (50,9%)

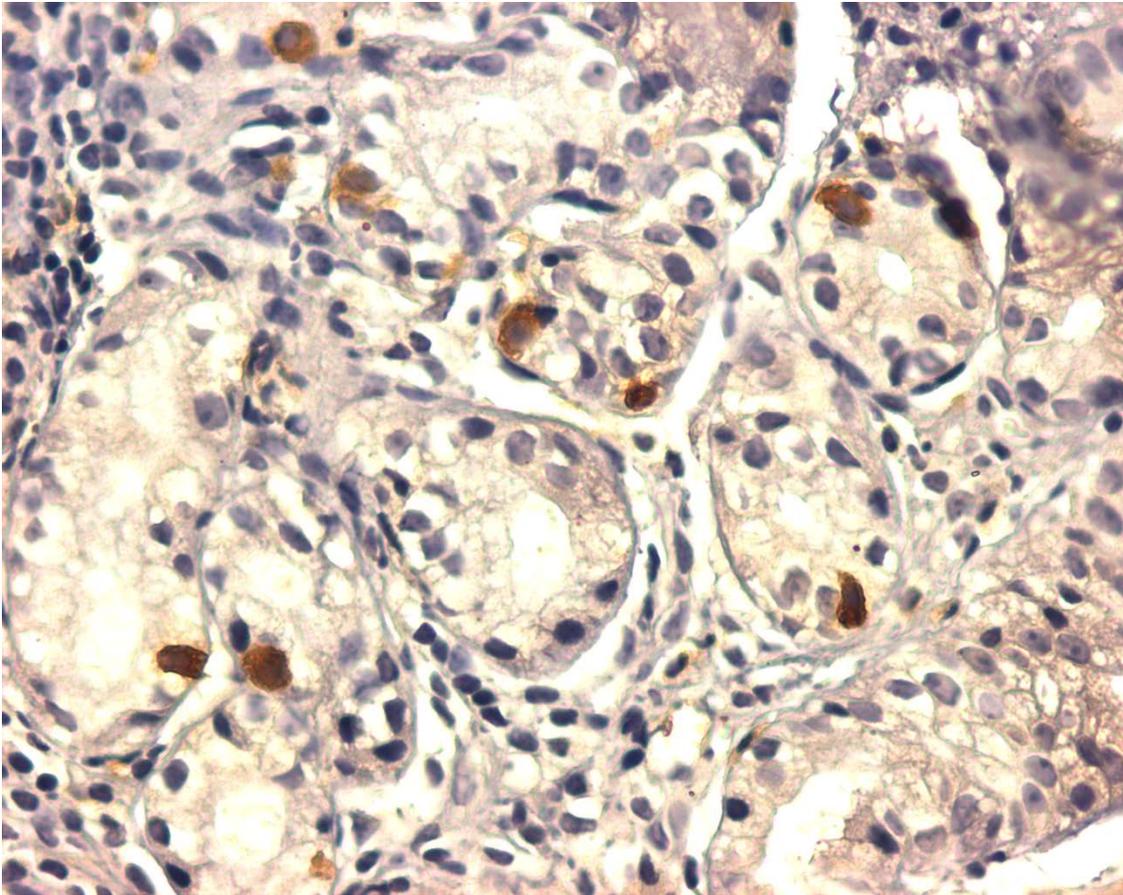
\*MI=metaplasia intestinal; \*\*MPA= metaplasia pseudoantral;

\*\*\*GHR=ghrelina; \*\*\*\*PRE=prepró-ghrelina

Dos 42 pacientes que apresentaram MI, apenas 4 (9,5%) expressam GHR e 9 (21,4%) PRE e dos 51 pacientes com MPA, 37 (72,5%) apresentaram GHR na mesma cripta e 36 (50,9%) PRE. Pode-se visualizar esta imunopressão nas figuras 4 e 5.



**FIGURA 4:** Células imunorreativas à ghrelina em paciente com gastrite atrófica do corpo em metaplasia pseudoantral (ihq, aumento 400x)



**FIGURA 5:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em paciente com gastrite atrófica do corpo em metaplasia pseudoantral (ihq, aumento 400x)

**TABELA 8.**

Número de nódulos com mais de 50% das células imunorreativas à chromogranina-A e ghrelina dos pacientes com hiperplasia endócrina na gastrite atrófica do corpo.

<b>Marcadores</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Diferença média ± dp</b>	<b>t pareado</b>	<b>P</b>
<b>CgA* (&gt;50%)</b>	8,6 ± 10,1			
		3,5 ± 8,6	3,01	0,004
<b>GHR** (&gt;50%)</b>	5,1 ± 6,4			

p significativo; \*CgA=chromogranina-A; \*\*GHR=ghrelina;

Uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) foi encontrada ao comparar os grupos de nódulos imunomarcados com mais de 50% das células positivas para CgA e nódulos imunomarcados com mais de 50% das células positivas para GHR no corpo de 54 pacientes com hiperplasia endócrina na GAC.

**TABELA 9.**

Número de nódulos com mais de 50% das células coradas em imuno-histoquímica de chromogranina-A e prepró-ghrelina no corpo de 54 pacientes com hiperplasia endócrina na gastrite atrófica do corpo.

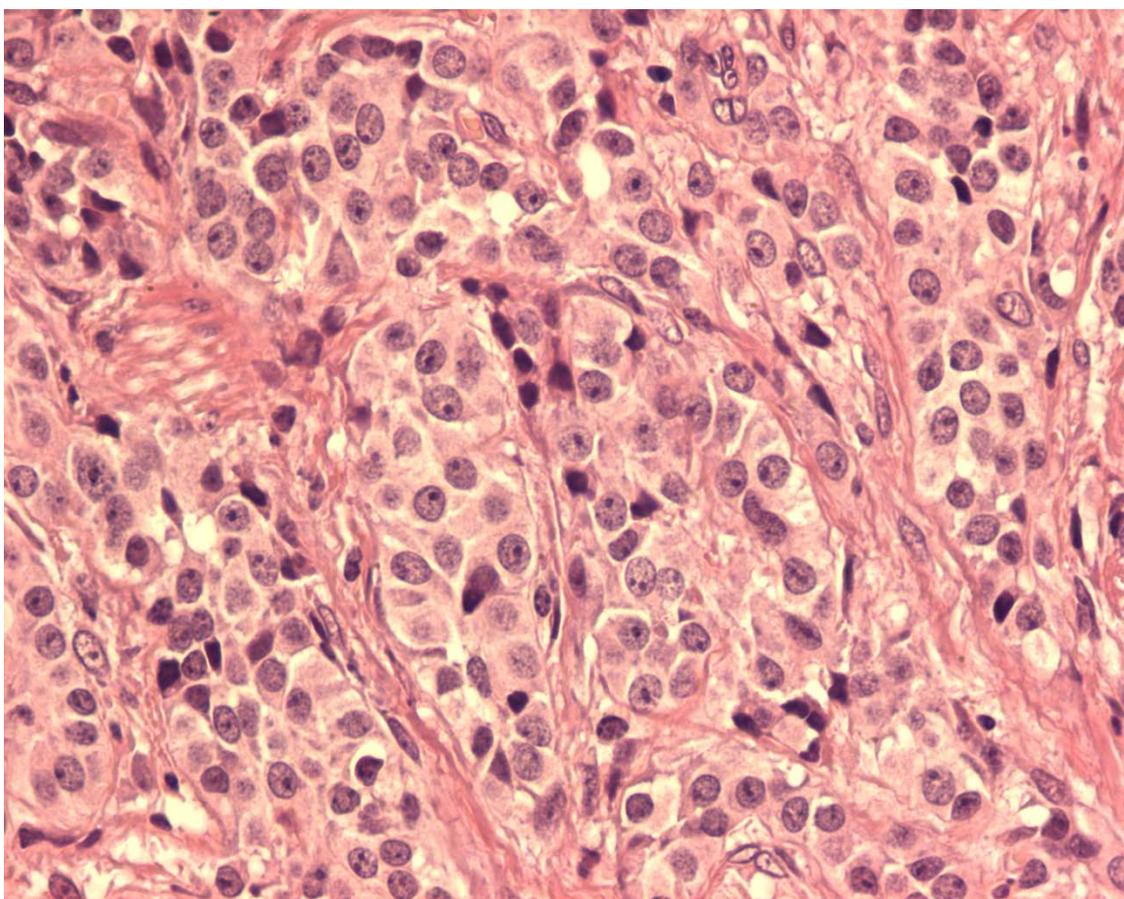
<b>Marcadores</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Diferença média ± dp</b>	<b>t pareado</b>	<b>P</b>
<b>CgA* (&gt;50%)</b>	8,6 ± 10,1			
		3,0 ± 9,0	2,42	0,0189
<b>PRE** (&gt;50%)</b>	5,6 ± 6,7			

p significativo; \*CgA=chromogranina-A; \*\*PRE=prepró-ghrelina

O resultado encontrado nesta tabela é significativo ( $p < 0,05$ ), semelhante ao resultado da tabela anterior. PRE expressa menos número de nódulos hiperplásicos com mais de 50% de células imunomarcadas do que CgA.

Ao realizar o teste t pareado em nódulos hiperplásicos com menos de 50% das células imunomarcadas em 54 pacientes com hiperplasia endócrina na GAC, obtém-se que não há diferença estatística entre os imunomarcadores CgA e GHR ou CgA e PRE (dados não mostrados).

Nesta segunda parte dos resultados, serão descritos os resultados dos 15 pacientes com tumores neuroendócrinos tipo I, caracterizados descritivamente por sexo e idade no quadro 2 e que pode ser visualizado morfológicamente na figura 6.



**FIGURA 6:** Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando células uniformes sem atipia (HE, aumento de 400x)

**QUADRO 2.**

Características dos 15 pacientes com tumor neuroendócrino do estômago em relação ao sexo e idade.

<b>Paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>
1	M	63
2	F	73
3	M	43
4	M	42
5	F	67
6	M	56
7	F	75
8	F	55
9	F	44
10	F	83
11	M	57
12	F	49
13	F	71
14	M	39
15	F	55

Dos 15 casos de TNE apresentados neste estudo, 6 (40,0%) homens e 9 (60,0%) mulheres, com média de idade geral de  $58 \pm 13$  anos.

**TABELA 10**

Positividade/ausência de imunorreatividade à chromogranina-A, sinaptofisina, ghrelina e prepró-ghrelina em 15 pacientes com tumores neuroendócrinos do estômago, considerando a quantidade de células marcadas.

<b>Quantidade de células marcadas</b>	<b>CgA* - N (%)</b>	<b>Sinaptofisina – N (%)</b>	<b>GHR** - N(%)</b>	<b>PRE*** - N(%)</b>
<b>Sem marcação</b>	1	0	3	2
<b>&lt; 10%</b>	1	0	6	7
<b>10 a 50%</b>	1	0	2	2
<b>&gt;50%</b>	12	15	4	4

\*CgA=chromogranina-A; \*\*GHR=ghrelina; \*\*\*PRE=prepró-ghrelina

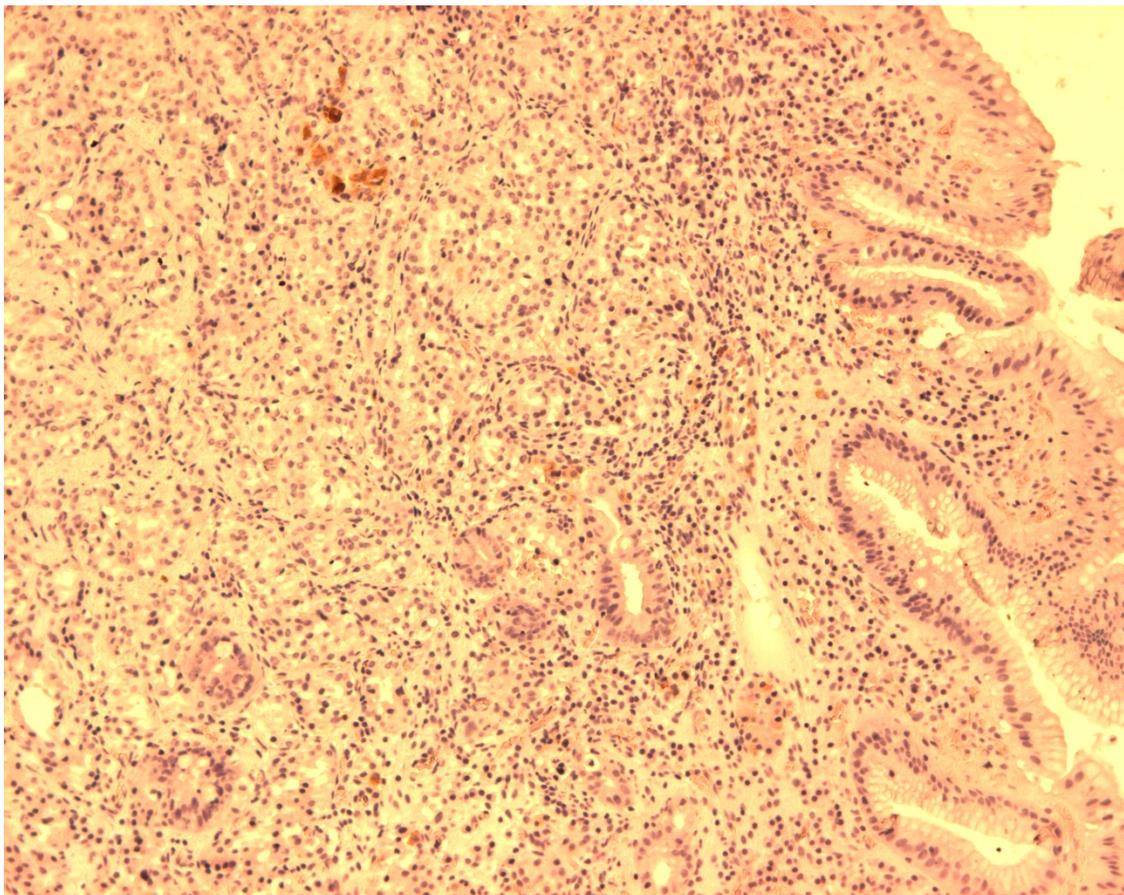
Dos 15 pacientes, 14 (93,3%) apresentaram marcação positiva para CgA. Este resultado negativo (paciente de número 10), foi repetido e confirmado.

Verifica-se que há 1 caso em que menos de 10% das células do tumor são coradas por CgA e 1 caso em que 10 a 50% das células foram marcadas. A imunomarcação por CgA apresentou-se fraca em alguns casos (dados não mostrados). Com isto, esses casos com menos de 50% das células coradas podem não expressar CgA devido a baixa eficácia do método. Para a padronização deste não foi utilizado polímero para amplificação do sinal da marcação e, além disto, diluiu-se o anticorpo em 1:150, enquanto o fabricante recomenda 1:50. Então, não se deve concluir que CgA não é um bom marcador de tumor neuroendócrino.

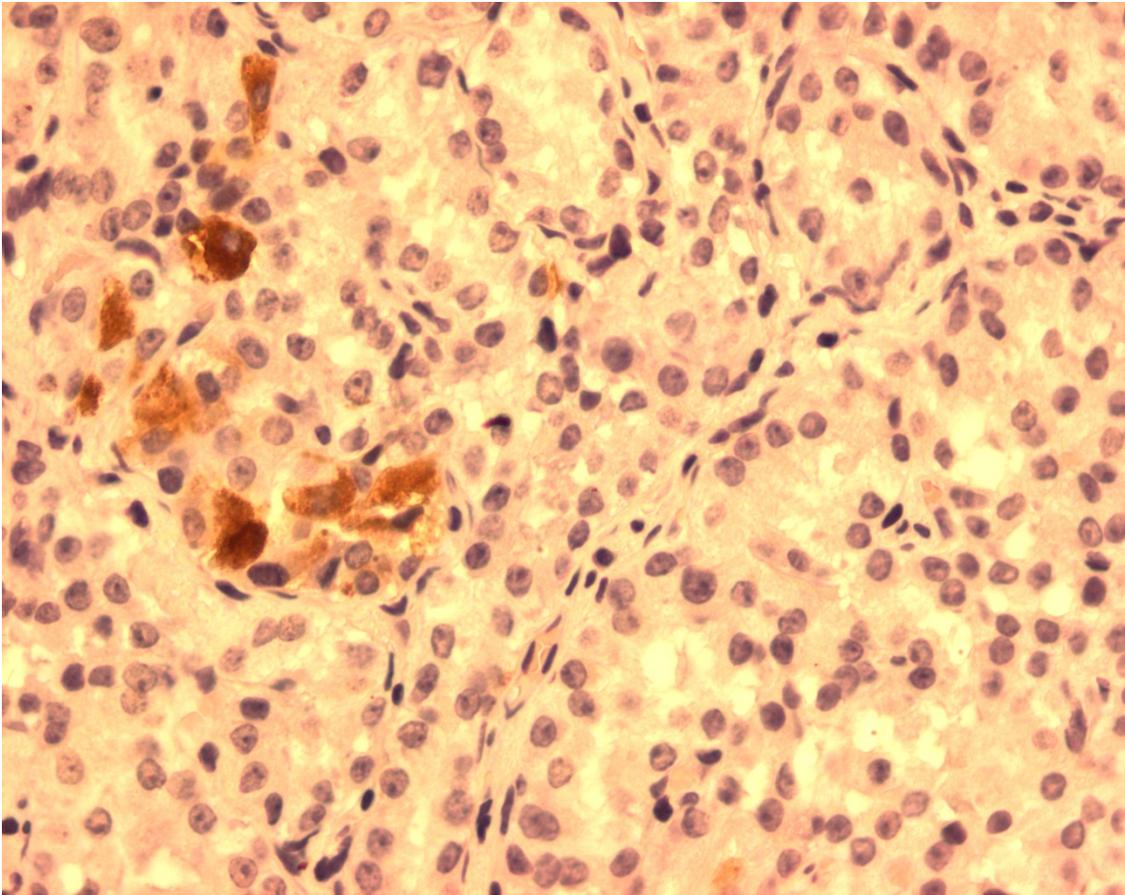
O imunomarcador sinaptofisina foi positivo nos 15 (100%) casos de tumores e em mais de 50% das células, o que confirma que este é um ótimo marcador para TNE. Padronizou-se a diluição deste marcador em 1:50, e sem utilização de polímero para amplificação do sinal.

A GHR foi positiva em 12 (80%) dos 15 TNE e a PRE em 13 (86,7%) dos 15. A quantidade de células marcadas no tumor pode variar porém verificamos que há uma concordância alta entre os dois marcadores. GHR expressa em 10%

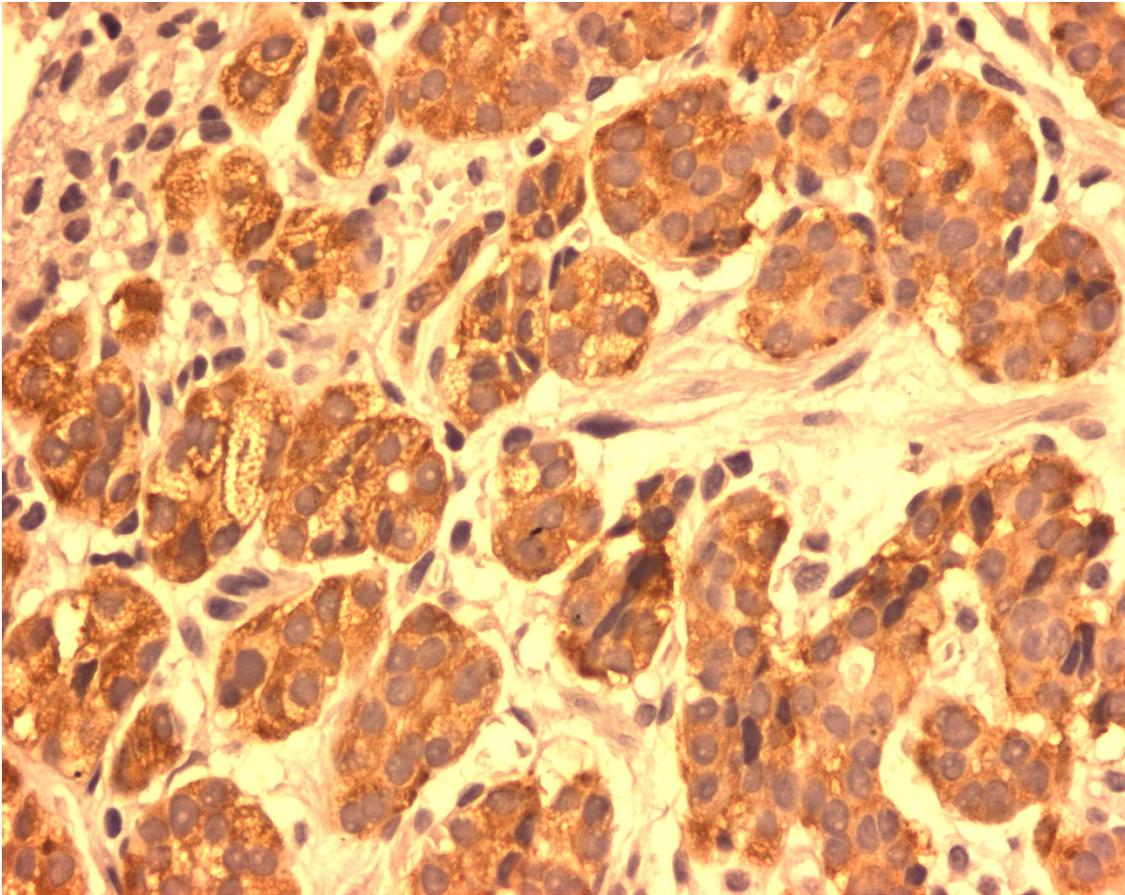
das células em 6 (40,0)% dos casos e PRE em 7 (46,7%) e ambos marcadores expressam em 4 (26,7%) dos pacientes. Podem ser visualizadas as imunomarcações de GHR e PRE, e suas respectivas variações nas quantidades de expressões dos números de células, nas figuras 7 a 12 do presente estudo.



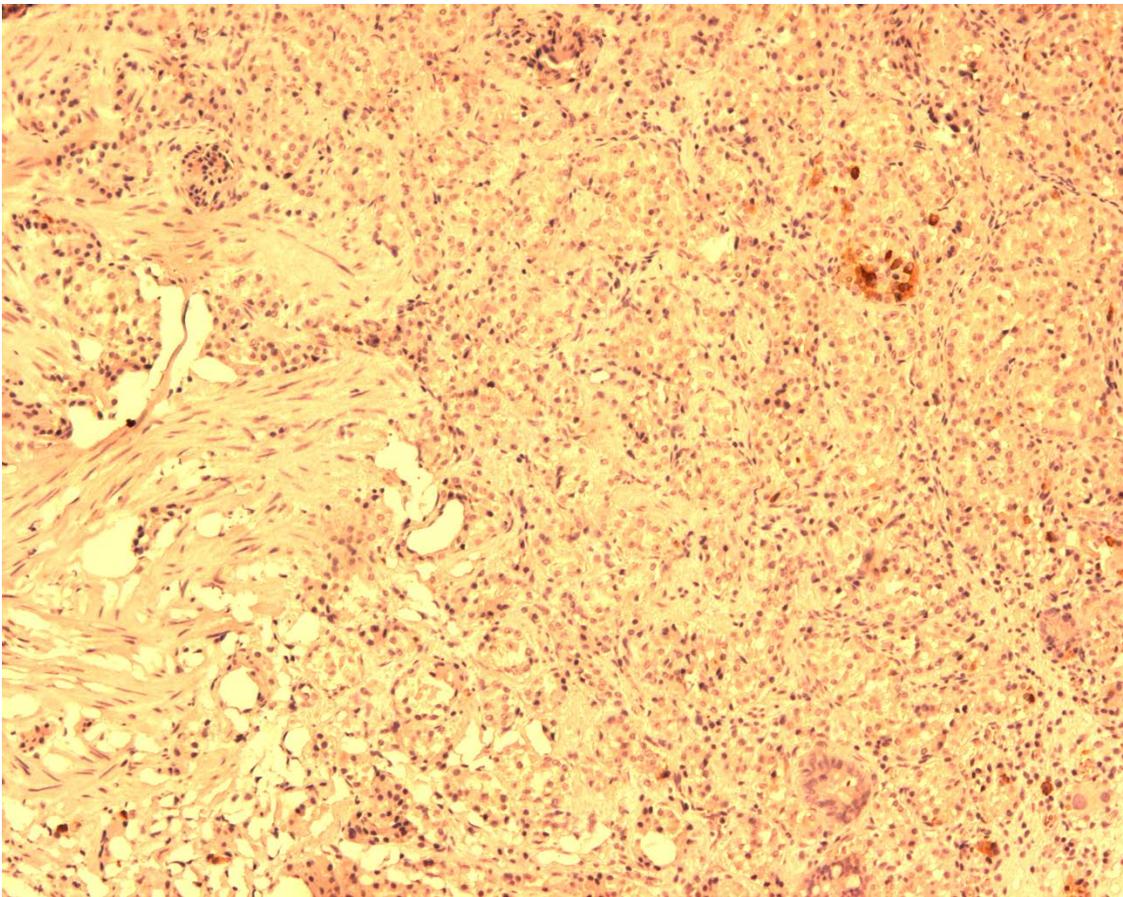
**FIGURA 7:** Células imunorreativas à ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando menos de 10% das células imunomarcadas (ihq, aumento 40x)



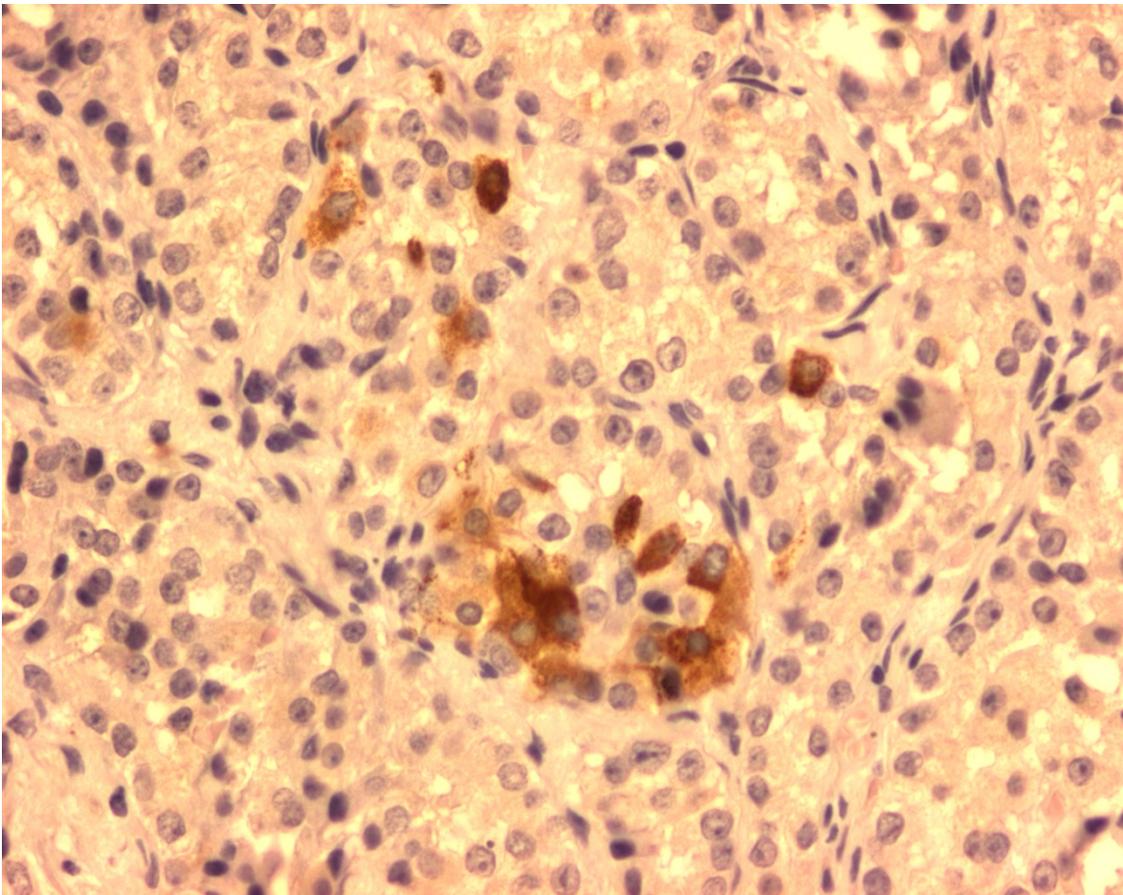
**FIGURA 8:** Células imunorreativas à ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando menos de 10% das células imunomarcadas (ihq, aumento 400x)



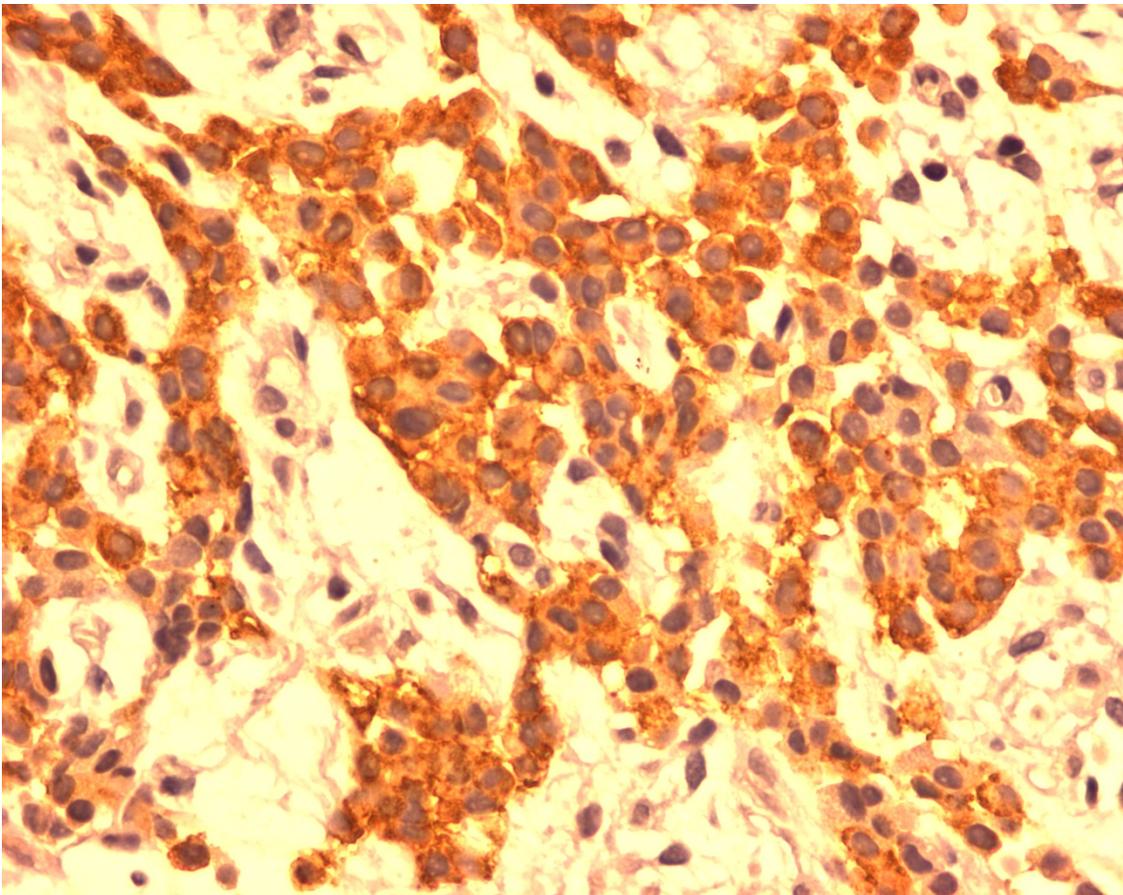
**FIGURA 9:** Células imunorreativas à ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando mais de 50% das células imunomarcadas (ihq, aumento 400x)



**FIGURA 10:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando menos de 10% das células imunomarcadas (ihq, aumento 40x)



**FIGURA 11:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando menos de 10% das células imunomarcadas (ihq, aumento 400x)



**FIGURA 12:** Células imunorreativas à prepro-ghrelina em Tumor neuroendócrino tipo I gástrico mostrando mais de 50% das células imunomarcadas (ihq, aumento 400x)

**TABELA 11.**

Frequência da intensidade de imunorreatividade à chromogranina-A, sinaptofisina, ghrelina e prepró-ghrelina em 15 pacientes com tumores neuroendócrinos do estômago.

<b>Intensidade da reação</b>	<b>CgA*- N (%)</b>	<b>Sinaptofisina - N (%)</b>	<b>GHR**- N(%)</b>	<b>PRE***- N(%)</b>
<b>Sem marcação</b>	1	0	3	2
<b>Muito fraca</b>	5	1	0	1
<b>Fraca</b>	6	1	0	0
<b>Moderada</b>	2	4	0	1
<b>Forte</b>	1	9	12	11

\*CgA=chromogranina-A; \*\*GHR=ghrelina; \*\*\*PRE=prepró-ghrelina

O anticorpo sinaptofisina, neste trabalho, foi de mais valia para imunomarcção de tumores neuroendócrinos do que a CgA. Sinaptofisina foi positivo em 15 (100%) casos de tumores e esta imunomarcção apresenta-se moderada a forte em 13 (86,7%) pacientes enquanto que a CgA mostra-se de muito fraca a fraca na maioria (73,3%) dos casos.

GHR e PRE têm imunomarcção intensa e bem definida em 12 (80%) e 11 (73,3%) dos pacientes respectivamente. Verifica-se ausência de sinal em 3 (20%) casos para GHR e 2 (13,3%) para PRE pois nestes pacientes o tumor não expressa estes marcadores.

**TABELA 12.**

Frequência de imunorreatividade à chromogranina-A, sinaptofisina, ghrelina e prepró-ghrelina nos diferentes tipos de hiperplasia endócrina da mucosa oxíntica adjacente ao tumor neuroendócrino de 15 pacientes.

<b>Padrão</b>	<b>CgA*- N (%)</b>	<b>Sinaptofisina - N (%)</b>	<b>GHR**- N(%)</b>	<b>PRE***- N(%)</b>
<b>Sem hiperplasia</b>	1	2	-	-
<b>Somente Difusa</b>	2	3	6	4
<b>Difusa + linear</b>	1	1	1	2
<b>Difusa + nodular</b>	2	1	-	1
<b>Difusa+linear+nodular</b>	9	8	8	8

\*CgA=chromogranina-A; \*\*GHR=ghrelina; \*\*\*PRE=prepró-ghrelina

Os marcadores imuno-histoquímicos Sinaptofisina e CgA comportam de forma semelhante na marcação de hiperplasias endócrinas no tecido adjacente ao tumor neuroendócrino. Neste estudo, 9 (60%) pacientes estão imunomarcados por CgA em todos os tipos de hiperplasia (nodular, linear e difusa) e 8 (53,3%) por Sinaptofisina. Em apenas 2 pacientes (13,3%) há expressão de CgA na hiperplasia difusa e em 3 (20%) para Sinaptofisina. Há 2 pacientes (13,3%) positivos para CgA com hiperplasia difusa e nodular ao mesmo tempo e 1 (6,7%) paciente para o mesmo padrão de hiperplasia quando consideramos o marcador Sinaptofisina. Em 1 paciente (6,7%) há o padrão de hiperplasia difusa e linear para CgA e sinaptofisina e não há expressão de CgA em 1 (6,7%) paciente e em 2 (13,3%) pacientes para sinaptofisina.

Ao verificar os imunomarcadores GHR e PRE verifica-se que estes se comportam de forma semelhante pois: em 8 (53,3%) pacientes há marcação de todos os tipos de hiperplasia (linear, nodular e difusa). GHR expressa em padrão difuso em 6 (40%) pacientes enquanto que PRE expressa em 4 (26,7%). Tem-se somente hiperplasia nodular e difusa imunomarcada por PRE em 1 (6,7%) e o

padrão de hiperplasia difusa e linear apresenta-se em GHR em 1 (6,7%) paciente e em PRE em 2 (13,3%) casos.

**TABELA 13.**

Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de chromogranina A e ghrelina em 15 pacientes com tumor neuroendócrino.

CgA* em TNE**	GHR*** em TNE				Total
	-	+	++	+++	
-	0	1	0	0	1
+	0	0	0	0	0
++	0	1	0	0	1
+++	4	4	1	4	13
Total	4	6	1	4	15

Kappa=2%;

Percentual da imunomarcção: + = < 10%; ++ = 10 - 50%; +++ = > 50%;

\*CgA=chromogranina-A; \*\*TNE=tumor neuroendócrino; \*\*\*GHR=ghrelina;

Ao analisar a concordância entre a expressão ihq de CgA e GHR em 15 pacientes com TNE, considerando a quantidade de células marcadas do tumor, conclui-se que a concordância é fraca entre os dois marcadores pois o coeficiente kappa é de 2%. Há marcação positiva para CgA em 13 dos 15 TNE (em mais de 50% das células) mas isto só acontece em 4 casos para GHR, ou seja, quando uma célula expressa CgA num TNE não podemos esperar que ela expresse GHR.

**TABELA 14.**

Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de chromogranina-A e prepró-ghrelina em 15 pacientes com tumor neuroendócrino.

CgA* em TNE**	PRE*** em TNE				Total
	-	+	++	+++	
-	0	1	0	0	1
+	0	0	0	0	0
++	0	1	0	0	1
+++	2	5	2	4	13
<b>Total</b>	2	7	2	4	15

Kappa=2%;

Percentual da imunomarcção: + = < 10%; ++ = 10 - 50%; +++ = > 50%;

\*CgA=chromogranina-A; \*\*TNE=tumor neuroendócrino; \*\*\*PRE=prepró-ghrelina;

Como já comentado anteriormente, a PRE e GHR possuem expressão bastante semelhantes e, com isto, PRE se comporta como a GHR quando avalia-se a concordância dessa com relação à CgA em 15 pacientes com TNE. A concordância entre CgA e PRE foi fraca nos pacientes com TNE e conclui-se que quando uma célula tumoral neuroendócrina expressar CgA, ela nem sempre positivará para o marcador PRE.

**TABELA 15.**

Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de prepró-ghrelina e ghrelina em 15 pacientes com tumor neuroendócrino.

<b>GHR* em TNE**</b>	<b>PRE*** em TNE</b>				<b>Total</b>
	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	
<b>-</b>	2	1	1	0	4
<b>+</b>	0	6	0	0	6
<b>++</b>	0	0	1	0	1
<b>+++</b>	0	0	0	4	4
<b>Total</b>	2	7	2	4	15

Kappa=81%;

Percentual da imunomarcção: + = < 10%; ++ = 10 - 50%; +++ = > 50%;

\*GHR=ghrelina; \*\*TNE=tumor neuroendócrino; \*\*\*PRE=prepró-ghrelina;

O resultado encontrado na tabela acima demonstra que, como para hiperplasia endócrina, há concordância excelente entre a expressão de GHR e sua molécula precursora, PRE, em TNE, resultado ainda não descrito na literatura. Ou seja, quando uma célula marcar GHR, provavelmente irá expressar PRE. Em 6 pacientes (40%) encontrou-se menos de 10% de células positivas para GHR e PRE e em 4 (26,6%) há mais de 50%. A expressão de GHR e PRE não predomina em TNE.

**TABELA 16.**

Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de ghrelina em 15 pacientes com tumores neuroendócrinos e em nódulos hiperplásicos da mucosa adjacente a este tumor.

GHR* em nódulos hiperplásicos	GHR em TNE**				Total
	-	+	++	+++	
<b>Negativo</b>	3	4	0	1	8
<b>Positivo</b>	1	2	1	3	7
<b>Total</b>	4	6	1	4	15

Kappa=22%;

Percentual da imunomarcção: + = < 10%; ++ = 10 - 50%; +++ = > 50%;

\*GHR=ghrelina; \*\*TNE=tumor neuroendócrino;

A concordância é fraca quando se compara a imunomarcção de GHR em 15 pacientes com TNE e nódulos hiperplásicos da sua mucosa adjacente pois a expressão é baixa no tumor e alta nos nódulos. Há 4 TNE negativos para GHR enquanto sua mucosa adjacente apresenta positividade para estes nódulos hiperplásicos. A presença de células produtoras de GHR na região adjacente ao tumor não está correlacionada com a expressão deste hormônio no tumor e estudos poderiam ser direcionados no sentido de elucidar se a perda da expressão de GHR é um indício de transformação maligna, ou seja, desenvolvimento do TNE.

**TABELA 17.**

Concordância entre a expressão imuno-histoquímica de prepró-ghrelina em 15 pacientes com tumores neuroendócrinos e em nódulos hiperplásicos da mucosa adjacente a este tumor.

		<b>PRE em TNE**</b>				
<b>PRE* em nódulos hiperplásicos</b>		<b>-</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>Total</b>
<b>Negativo</b>		2	4	0	1	7
<b>Positivo</b>		2	2	1	3	8
<b>Total</b>		4	6	1	4	15

Kappa=4%;

Percentual da imunomarcção: + = < 10%; ++ = 10 - 50%; +++ = > 50%;

\*PRE=prepró-ghrelina; \*\*TNE=tumor neuroendócrino;

No estudo da concordância entre a expressão ihq de PRE em 15 pacientes com TNE e em nódulos hiperplásicos da mucosa adjacente, o resultado esperado era semelhante ao encontrado para GHR já que ambos marcadores que têm se comportado de forma semelhante, ou seja, a concordância é fraca. Há muitos nódulos hiperplásicos na mucosa adjacente ao tumor expressando PRE e, ao mesmo tempo, PRE não está necessariamente expressando no tumor.

## 5. DISCUSSÃO

A atrofia de glândulas especializadas da mucosa gástrica associada a processo inflamatório crônico é condição patológica comum na espécie humana. Em geral, os casos mais acentuados de atrofia da mucosa gástrica são de reconhecimento diagnóstico relativamente fácil por dois métodos frequentemente utilizados: exame endoscópico e exame histopatológico. A importância atual do reconhecimento da atrofia da mucosa gástrica reside na frequência com que a mesma se associa à evolução de lesões consideradas pré-neoplásicas, ou seja, a MI e displasia do epitélio gástrico, que podem originar neoplasias gástricas, sequência conhecida como “cascata de Correa” (CORREA, 1984).

As duas condições patológicas que mais frequentemente se associam ao desenvolvimento da atrofia gástrica são a gastrite crônica multifocal, associada etiologicamente à bactéria *H. pylori* e a gastrite atrófica do corpo, na maioria das vezes de etiologia auto-imune. A gastrite auto-imune limita-se à mucosa oxíntica e evolui para a perda progressiva das células parietais e células principais resultando em acloridria, hipergastrinemia, anemia e suas consequências (SOLCIA *et al.*, 1992; STOLTE *et al.*, 1992).

Diagnosticar GAC de origem auto-imune pode ser fácil quando se tem uma perda total da mucosa oxíntica e substituição por epitélio metaplásico. Entretanto, Torbenson *et al.* (2002) descrevem que estágios precoces da gastrite auto-imune podem ser reconhecidos por um padrão de injúria no qual tem-se algumas características histológicas peculiares: inflamação crônica moderada, agregado linfóide (foliculo), pseudo-hipertrofia de células parietais e metaplasia de células intestinais e pseudo-antrais. Os autores citados encontram inflamação crônica de grau moderado na maioria dos casos: em pacientes com ou sem anticorpos contra células parietais e em pacientes indeterminados. No presente estudo, em resultados previamente publicados, os mesmos resultados são observados na mucosa oxíntica: inflamação moderada em 35 pacientes (64,8%); atividade discreta em 34 pacientes (63%) e moderada em 19 (35,2%); MI discreta em 36 casos (66,7%) e MPA em 51 (94,4%) (MOREIRA *et al.*, 2011). Como Torbenson *et*

*al.* (2002), neste estudo não foi encontrado nenhum paciente com gastrite atrófica do corpo com provável etiologia auto-imune sem metaplasia, seja esta MI e/ou MPA. Não se encontra, também, ausência de inflamação e infiltrado inflamatório na mucosa do corpo gástrico, assim como os autores em questão. Deve-se ressaltar que as células imunorreativas à GHR e PRE apresentaram aproximadamente a mesma frequência nas áreas de MI bem como nas áreas de MPA, ou seja, foram relativamente incomuns na MI, respectivamente em 7,4% e 16,7% dos casos e relativamente frequentes na MPA, respectivamente 68,5% e 48,0% dos casos. Sabe-se que as células produtoras de GHR estão presentes em diferentes tecidos do organismo, entre eles a mucosa intestinal, entretanto de forma escassa e inconstante. Ao contrário, na mucosa gástrica do corpo, essas células atingem sua maior densidade e seriam as responsáveis principais pelos níveis séricos deste hormônio (KOJIMA *et al.*, 1999; KOJIMA *et al.*, 2001). Portanto, em relação à diferenciação de elementos endócrinos, pode-se admitir que as áreas de MI e de MPA, presentes na mucosa gástrica de pacientes com gastrite auto-imune, ainda conservam grande parte das características genéticas dos tecidos de origem, uma vez que as células produtoras de GHR são incomuns na mucosa intestinal e muito frequentes na mucosa gástrica.

A mucosa gástrica do corpo e do fundo é rica em células endócrinas que ocorrem nas criptas entre células parietais, principais e mucosecretoras. Interessante observar que as células endócrinas localizadas na mucosa oxíntica, sob o estímulo constante da hipersecreção de gastrina pelas células G da mucosa antral, tornam-se hiperplásicas, ao contrário do que ocorre com as células de secreção exócrina, parietais e principais, que praticamente deixam de existir nos estágios mais avançados da doença. A hiperplasia de células endócrinas ocorre tanto na parede das criptas quanto formando nódulos hiperplásicos na lâmina própria (SOLCIA *et al.*, 1988). Considera-se que este último tipo de hiperplasia seja um primeiro passo para o desenvolvimento de tumor carcinóide tipo I, o mais freqüente do estômago. Não se conhecem os fatores responsáveis pela progressão dos nódulos hiperplásicos à neoplásicos, portanto, estudos que abordem as características morfofuncionais e bioquímicas destas lesões

hiperplásicas ampliam os conhecimentos sobre a patogênese dos tumores neuroendócrinos e outras consequências fisiopatológicas associadas à gastrite atrófica do corpo. Muitos estímulos locais ou sistêmicos, além da gastrina, podem estar envolvidos, como outras células endócrinas, participando dessas condições patológicas em questão (BORDI, 1997). No presente estudo, usou-se o seguinte delineamento para os padrões de hiperplasias associadas à GAC: pacientes que possuíam somente hiperplasia difusa; pacientes com hiperplasia difusa e linear; aqueles com hiperplasia difusa e nodular; e os que possuíam todos os padrões de hiperplasia (difusa, linear e nodular). Nenhum paciente expressou hiperplasia difusa e linear e, por isto, resolveu-se unir o grupo: 1- hiperplasia difusa e nodular ao grupo 2- pacientes com todos os padrões de hiperplasia para não ocasionar um erro de análise. Pacientes com hiperplasia linear poderiam existir neste estudo, porém, os cortes de tecidos eram oblíquos, sobre um agregado de células que se apresentavam como linha (linear) e, neste caso, só seria possível classificá-lo como hiperplasia linear se o corte fosse feito de forma longitudinal.

Nos resultados do presente estudo, observa-se ausência de nódulos hiperplásicos em apenas 3 (5,6%) pacientes quando utiliza-se o método ihq para CgA, em 7 (13%) pacientes na coloração por GHR e 5 (9,3%) para PRE. O número de nódulos hiperplásicos do presente estudo é maior do que os obtidos por Torbenson *et al.* (2002) pois, neste estudo, a maioria dos pacientes possuem atrofia acentuada da mucosa gástrica enquanto os autores em questão selecionaram pacientes em estágio precoce da gastrite auto-imune. Torbenson *et al.* (2002) obtiveram imunomarcagem por CgA em 11 dos 13 casos (84,6%) de gastrite auto-imune com hiperplasia e delinearão o estudo subdividindo as hiperplasias em normal, simples, linear ou nodular (esquema de classificação modificado por Solcia *et al.* em 1995). Dos 13 pacientes com auto-anticorpos anti-células parietais, todos possuíam, ao menos, hiperplasia linear. Em contraste, no grupo com sorologia negativa para os auto-anticorpos, somente 1 (16,7%) paciente mostrou células ECL hiperplásicas. Os pacientes classificados como indeterminados possuíam hiperplasia (linear ou nodular) em 72,2% (13 dos 18) casos. Em conclusão, admite-se que células endócrinas produtoras de GHR e de

sua moléculas precursora PRE encontram-se frequentemente nos diversos tipos de hiperplasia endócrina da mucosa gástrica da grande maioria dos pacientes que apresentam GAC em estágios avançados. Entre os diferentes tipos de hiperplasia, essas células aparecem com mais freqüência e regularidade na hiperplasia nodular presente na lâmina própria e menos regularmente na hiperplasia difusa e linear constituídas por células ainda localizadas na parede das criptas glandulares.

Uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) foi encontrada ao comparar os grupos de nódulos imunomarcados com mais de 50% das células positivas para CgA e nódulos imunomarcados com mais de 50% das células positivas para GHR e/ou PRE no corpo de 54 pacientes com hiperplasia endócrina na GAC. Com isto, conclui-se que o anticorpo GHR e/ou não pode substituir o anticorpo CgA para o diagnóstico de hiperplasias e ihq para células endócrinas em geral. Então, CgA continua sendo o anticorpo “padrão ouro” para o diagnóstico de hiperplasias e marcação de células endócrinas, apesar de GHR e PRE serem de alta sensibilidade.

Não se sabe exatamente quais os fatores responsáveis pela progressão de nódulos hiperplásicos às condições pré cancerosas, além do hormônio gastrina, que modula o crescimento do tumor. No presente estudo, adotamos como indicativo de neoplasia a presença de nódulos com mais de 500 $\mu$ m de diâmetro e destruição das criptas gástricas, invasão da muscular da mucosa e submucosa. Em resultados previamente publicados (MOREIRA *et al.*, 2010), obteve-se ausência de marcação por CgA apenas em 1 (6,7%) caso de TNE e sua mucosa adjacente. Para a confirmação da origem endócrina destas células, utilizamos o marcador sinaptofisina e, com isto, obtivemos resultado positivo. Portela-Gomes *et al.* (2001) usaram anticorpos para seis regiões específicas da molécula de CgA para estudar sua imunorreatividade em tumores neuroendócrinos humanos: pancreáticos, duodenais, bronquiais, ileais, do apêndice, carcinoma medular da tireóide, adenoma da paratireóide e feocromocitomas. Os resultados mostraram que os diferentes tipos de tumores neuroendócrinos expressam diversos fragmentos distintos de CgA. Estes achados sugerem que regiões específicas dos

anticorpos contra fragmentos de CgA podem ser usadas para o diagnóstico e caracterização de tumores neuroendócrinos benignos e malignos.

Células imunorreativas à GHR parece ser um achado comum em TNE do estômago e outros órgãos como a hipófise, pâncreas e tireóide (IWAKURA, 1996; LEONTIOU, 2007). Neste estudo, em dados previamente publicados (MOREIRA *et al.*, 2010), obteve-se imunomarcção positiva para GHR em 12 (80%) dos 15 casos de TNE e positividade para PRE em 13 (86,7%) dos 15 pacientes. A quantidade de células expressas nestes tumores é variável: em 6 casos (55%) observa-se imunoreatividade positiva para GHR em até 10% das células, em 1 caso (6,7%) há positividade em 10 a 50% de todas as células do tumor e em 4 casos (36%) verifica-se imunomarcção em mais de 50% das células. Estes resultados são parecidos com os observados por Papotti *et al.* (2001) que obtiveram 75% de positividade para GHR em todos os casos de carcinóides gástricos. Esses resultados se assemelham aos de Rindi *et al.* (2002b) que encontram GHR em 25 (76%) dos 33 tumores neuroendócrinos bem diferenciados do estômago. Neste estudo, apenas 21 (64%) dos tumores eram carcinóides gástricos do tipo I e os outros foram tipos II e III (RINDI, 2002a; RINDI, 2002b).

Tendo em vista as múltiplas funções propostas para a GHR, entre elas a possível participação no controle da proliferação celular, resolveu-se verificar a presença deste peptídeo, bem como de sua molécula precursora, PRE, nos diferentes tipos de hiperplasia das células endócrinas associados à GAC e na mucosa adjacente ao TNE. Ao concordar a presença/ausência de nódulos hiperplásicos imunomarcados por GHR e PRE na mucosa adjacente ao tumor e a quantidade de células imunomarcadas no TNE verifica-se uma baixa concordância, ou seja, não se pode dizer que o aumento do número de nódulos concorda com o alto número de células expressas no tumor (MOREIRA *et al.*, 2010).

## 6. CONCLUSÃO

Tendo em vista os principais resultados do presente trabalho, podemos tirar as seguintes conclusões:

- (1) Na GAC ocorre com frequência células produtoras de GHR e PRE associadas à hiperplasia endócrina;
- (2) A presença destas células hiperplásicas produtoras de GHR e PRE independe do tipo morfológico de hiperplasia.
- (3) Nas áreas de MI e de MPA, frequentemente são observadas, na GAC, que ocorre número diferenciado de células endócrinas secretoras de GHR e PRE, sendo relativamente raras no primeiro tipo e relativamente frequentes no segundo tipo.
- (4) Os anticorpos GHR e PRE não devem ser utilizados com imunomarcadores da hiperplasia endócrina, tendo em vista que sua sensibilidade foi inferior à marcação de nódulos hiperplásicos pela chromogranina-A, classicamente utilizada para este fim.
- (5) GHR e PRE são frequentemente produzidos por células endócrinas integrantes do tecido neoplásico, provavelmente da maioria dos tumores neuroendócrinos tipo I do estômago, bem como nas lesões endócrinas hiperplásicas a eles associadas. Entretanto, ainda não são claros até que ponto este hormônio poderia estar relacionado com a evolução dos nódulos hiperplásicos à neoplasia endócrina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIKO, Y. *et al.* Enhanced plasma ghrelin levels in *Helicobacter pylori*-colonized, interleukin-1-receptor type 1-homozygous knockout (IL-1R1<sup>-/-</sup>) mice. *World J Gastroenterol*, v. 11, n. 27, p. 4148-53, 2005.

ARVAT, E. *et al.* Preliminary evidence that ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest*, v. 23, p. 493-5, 2000.

ARVAT, E. *et al.* Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, p. 1169-74, 2001.

BORCH, K. *et al.* Basal chromogranin A and gastrin concentrations in circulation correlate to endocrine cell proliferation in type A gastritis. *Scand J Gastroenterol*, v. 32, p. 198-202, 1997.

CORREA, P. Chronic Gastritis as a cancer precursor. *Scand J Gastroenterol*, v. 104, Suppl., p. 131-6, 1994.

COTRAN, R. S. *et al.* *Pathologic Basis of Diseases*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 6<sup>th</sup> ed., p. 787-802, 1999.

DIXON, M. F. *et al.* Classification and grading of gastritis – The updated Sydney System. *Am J Surg Pathol*, v. 20, n. 10, p. 1161-81, 1996.

ERICKSON, L. A., LLOYD, R. D., Practical markers used in diagnosis of endocrine tumors. *Adv Anat Pathol*, v. 11, n. 4, p. 175-89, 2004.

GNANAPAVAN S. *et al.* The tissue distribution of the mRNA of Ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, p. 2988, 2002.

HSU S-M. *et al.* Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, v. 29, p. 577-80, 1981.

IWAKURA, H. *et al.* Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, p. 4885-8, 2002.

JASON, T. *et al.* Ghrelin immunoreactive cells in gastric endocrine tumors and their relation to plasma Ghrelin concentration. *J. Clin Gastroenterol*, v. 42, n. 4, p. 381-8, 2008.

KOJIMA, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, v. 402, p. 656–60, 1999.

KOJIMA, M. *et al.* Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the GH (growth hormone) secretagogue receptor. *Horm Res*, v. 56, Suppl, p. 93-7, 2001.

KORBONITS, M. *et al.* Ghrelin -a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*, v. 25, p. 27-68, 2004.

LEONTIOU, C.A. *et al.* Ghrelin in neuroendocrine organs and tumours. *Pituitary*, v. 10, n. 3, p. 213-25, 2007.

MIETTINEN, M. Synaptophysin and neurofilament proteins as markers for neuroendocrine tumors. *Arch Pathol Lab Med*, v. 111, n. 10, p. 813-8, 1987.

MONGIN, M. *et al.* Place de l'hypergastrinémie dans le diagnostic de la maladie de Biermer de l'adulte. *Annales de Gastroentérologie et d'Hépatologie*, v. 29, N. 1, p. 42-5, 1993.

MOREIRA, L.F. *et al.* Ghrelin- and preproghrelin- immunoreactive cells in atrophic body gastritis. *J Bras Patol Med lab*, v. 47, n. 5, p. 549–54, 2011.

MOREIRA, L.F. *et al.* Ghrelin- and preproghrelin- immunoreactive cells in gastric neuroendocrine tumors associated with atrophic body gastritis. *J Bras Patol Med lab*, v. 46, n. 4, p. 329–34, 2010.

PAPOTTI, M. *et al.* Ghrelin- producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 10, p. 5052-9, 2001.

PERACCHI, M. *et al.* Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *Eur J Endocrinol*, v. 152, n. 3, p. 443-8, 2005.

PETERSSON, F. *et al.* Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in the general population and in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis. *Scand J Gastroenterol*, v. 37, n. 3, p. 262-6, 2002.

PORTELA-GOMES G.M. *et al.* Chromogranin A in Human Neuroendocrine Tumors - An Immunohistochemical Study With Region-Specific Antibodies. *Am J Surg Pathol*, v. 25, n. 10, p. 1261–7, 2001.

RINDI, G. *et al.* Characterization of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol*, v. 117, p. 511-9, 2002a.

RINDI, G. *et al.* Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochem Cell Biol*, v. 117, n. 6, p. 521-5, 2002b.

SOLCIA, E. *et al.* Histopathological classification of nonantral gastric endocrine growths in man. *Digestion*, v. 41, p. 185-200, 1988.

SOLCIA, E. *et al.* Hyperplastic, dysplastic, and neoplastic enterochromaffin-like-cell proliferations of the gastric mucosa. Classification and histogenesis. *Am J Surg Pathol*, v. 19, p. 1-7, 1995.

SOLCIA, E. *et al.* Distinct patterns of chronic gastritis associated with carcinoid and cancer and their role in tumorigenesis. *Yale J Biol Med*, v. 65, n. 6, p. 793-804, 1992.

STOLTE, M. *et al.* Active autoimmune gastritis without total atrophy of the glands. *Z Gastroenterol*, v. 30, n. 10, p. 729-35, 1992.

SPICER, S.S. Diamine Methods for Differentiating Mucosubstances Histochemically. *J Histochem Cytochem*, v. 13, p. 211-234, 1965.

TAKAYA, K. *et al.* Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 85, p. 4908-11, 2000.

TORBENSON, M. *et al.* Autoimmune gastritis: distinct histological and immunohistochemical findings before complete loss of oxyntic glands. *Mod Pathol*, v. 15, n. 2, p. 102-9, 2002.

VAN DER LELY A.J. *et al.* Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of Ghrelin. *Endocr Rev*, v. 25, p. 426-57, 2004.

ZHAO, C-M. *et al.* Characterizations of obestatin- and Ghrelin- producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res*, v. 331, p. 575-87, 2008.

## **8. ANEXOS**

**8.1 ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO NO JORNAL BRASILEIRO DE  
PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL NO ANO DE 2010.**

# Ghrelin and pre-proghrelin immunoreactive cells in gastric neuroendocrine tumors associated with atrophic body gastritis

Primeira submissão em 26/03/10  
Última submissão em 04/05/10  
Aceito para publicação em 04/05/10  
Publicado em 20/08/10

*Grelina e pré-progrelina em tumores neuroendócrinos do estômago associados à gastrite atrófica do corpo*

Letícia Figueiredo Moreira<sup>1</sup>; Maria Risoleta Nascimento Vieira Carvalho<sup>2</sup>; Alfredo José Afonso Barbosa<sup>3</sup>

key words	abstract
Neuroendocrine tumor	<p><b>Introduction:</b> Ghrelin is a 28 amino acid peptide secreted mainly by endocrine cells present in the gastric mucosa and acknowledged as an endogenous releaser of growth hormone. The immunohistochemical expression of ghrelin has been described in neuroendocrine tumors, and it is believed that may exert modulating action related to the growth of these tumors. <b>Objective:</b> To study the presence of ghrelin and preproghrelin immunoreactive cells in gastric neuroendocrine tumors associated with atrophic body gastritis. <b>Methods:</b> Endoscopic biopsies from 15 patients with neuroendocrine tumor of the gastric mucosa associated with atrophic body gastritis were performed for immunohistochemistry, and specific chromogranin, ghrelin and preproghrelin antibodies were applied. The immunohistochemical expression was assessed in tumor cells and endocrine micronodular hyperplasia present in mucosa adjacent to the tumor, and it was classified in relation to the number of stained cells. <b>Results:</b> Chromogranin was positive in 14 out of 15 tumors. Ghrelin and preproghrelin immunoreactive cells were detected in 11 (73%) and 13 (87%) tumors, respectively. There was a significant correlation between the immunohistochemical results of both antigen expressions (<math>\kappa = 81\%</math>). Ghrelin and preproghrelin expression was detected in hyperplastic nodules present in the mucosa adjacent to the tumor in seven and eight cases, respectively. There was no correlation between these results and those observed in neoplastic cells. <b>Conclusion:</b> Ghrelin and preproghrelin immunoreactive cells may be found in variable number in Type I neuroendocrine gastric tumors and in hyperplastic nodules associated with these tumors. However, it remains unclear what role these peptides play on the development of these tumors.</p>
Gastric carcinoid	
Ghrelin	
Pre-proghrelin	
Atrophic gastritis	
Endocrine hyperplasia	

resumo	unitermos
<p><b>Introdução:</b> Grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos, reconhecido como liberador endógeno do hormônio do crescimento, sendo secretado principalmente por células endócrinas da mucosa gástrica. A expressão imuno-histoquímica da grelina tem sido descrita em tumores neuroendócrinos, acreditando-se que possa ter ação moduladora relacionada com o crescimento desses tumores. <b>Objetivo:</b> Estudar a presença de células imunorreativas a grelina e pré-progrelina em tumores neuroendócrinos gástricos associados à gastrite crônica atrófica do corpo. <b>Métodos:</b> Biópsias endoscópicas de 15 pacientes portadores de tumor neuroendócrino da mucosa gástrica, associados à gastrite crônica atrófica do corpo, foram obtidas para as colorações imuno-histoquímicas, utilizando-se anticorpos contra cromogranina, grelina e pré-progrelina. A expressão imuno-histoquímica foi avaliada nas células tumorais e na hiperplasia endócrina micronodular presente na mucosa adjacente ao tumor e classificada em relação ao número de células coradas. <b>Resultados:</b> A cromogranina foi positiva em 14 dos 15 tumores. Células imunorreativas à grelina foram detectadas em 11 (73%) tumores e à pré-progrelina em 13 (87%), ocorrendo excelente concordância (<math>\kappa = 81\%</math>) entre os resultados imuno-histoquímicos dos dois antígenos. A expressão de grelina e pré-progrelina foi detectada em nódulos hiperplásicos presentes na mucosa adjacente ao tumor em sete e oito casos, respectivamente, não ocorrendo concordância entre esses resultados e aqueles observados nas células neoplásicas. <b>Conclusão:</b> Células imunorreativas a pré-progrelina e grelina podem ser encontradas em número variável nos tumores neuroendócrinos tipo I do estômago e nas lesões hiperplásicas associadas a esses tumores. Entretanto, permanece obscuro o papel desses peptídeos em relação ao desenvolvimento desses tumores.</p>	<p>Tumor neuroendócrino Carcinóide gástrico Grelina Pré-progrelina Gastrite atrófica Hiperplasia endócrina</p>

1. Mestra em Patologia; docente de Patologia Geral na Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG).

2. Veterinária; estagiária no Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina (LPDN) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3. Doutor em Patologia; professor titular e responsável pelo LPDN da Faculdade de Medicina da UFMG; patologista do Instituto Alfa de Gastroenterologia.

## Introduction

Ghrelin, a 28-amino-acid peptide, predominantly displays strong growth hormone-releasing action mediated by the activation of growth hormone secretagogue receptor type 1a<sup>(6, 10, 19)</sup>. First described about 10 years ago, it is known since then that it is secreted mainly by endocrine cells in the body of the stomach, which account for about 80% of plasma levels of this hormone<sup>(1, 9)</sup>. A growing number of studies have indicated that ghrelin-immunoreactive cells are present in smaller numbers in other organs<sup>(5, 12, 13)</sup>. Apart from stimulating growth hormone secretion ghrelin also stimulate appetite and positive energy balance<sup>(11)</sup>. It also presents actions on the hypothalamus and on the exocrine and endocrine pancreas, among other reported activities<sup>(22)</sup>. Ghrelin and obestatin, two products derived from post-translational cleavage of the same precursor molecule named pre-proghrelin, are often present in the same neuroendocrine cell and seem to have antagonistic actions on energy balance and on gastrointestinal functions<sup>(21)</sup>. In the gastric mucosa of rats the obestatin- and pre-proghrelin-immunoreactive cells seem to be more frequent than those that express ghrelin and the precursor molecule<sup>(23)</sup>. This indicates that different tissues may provide a differentiated precursor cleavage molecule.

Endocrine cells that express ghrelin have been described in neuroendocrine tumors from different tissues<sup>(14)</sup>. Type I gastric neuroendocrine tumors have an indolent course and are believed to originate from hyperplastic nodules, common in atrophic body gastritis<sup>(20)</sup>. Often, these patients have hypergastrinaemia, supposedly the main stimulus for the appearance of the hyperplastic lesions and their progression to neuroendocrine tumor. However, the boundaries between the biological behavior of the hyperplastic and neoplastic state remain largely unknown.

Since ghrelin has been considered to be modulator of multiple endocrine functions including tumor cell proliferation, the aim of this work was to study its presence, as well as the precursor pre-proghrelin molecule, in gastric type I neuroendocrine tumors and in nodular hyperplasia present in gastric mucosa adjacent to the tumor.

## Methods

For this study paraffin blocks of endoscopic biopsies from 15 patients with well-differentiated neuroendocrine tumor of the gastric mucosa associated with atrophic body gastritis (ABG) have been obtained from the Alfa Institute of Gastroenterology

from Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. The hematoxylin and eosin slides of each case were re-examined and the previous histological diagnoses were confirmed. New 4 µm thick paraffin sections were obtained and used for immunohistochemical staining performed after antigen retrieval; this last step was performed by pretreatment of histological sections in antigen retrieval solution (citrate buffer solution retrieval pH 6, Dako Laboratories, USA) in a water bath at 98°C for 20 minutes and subsequent cooling at room temperature.

For immunohistochemical reactions the following primary antibodies were used: monoclonal antibodies against chromogranin A (Novocastra Laboratories, UK) to confirm the neuroendocrine nature of the tumors and polyclonal antibodies raised in rabbits against human ghrelin and pre-proghrelin (Phoenix Pharmaceuticals, USA). The degree of immunohistochemical expression of positive cells in tumor, and in nodular endocrine hyperplasia adjacent to the tumor was evaluated semi-quantitatively and classified as + (few stained cells, or < 10%); ++ (moderate number of stained cells, 10% to 50%), and +++ (numerous stained cells, or > 50%). Although different histological types of hyperplastic proliferation of neuroendocrine cells in ABG have been described only the nodular hyperplasia was considered for the objective of the present work<sup>(20)</sup>.

The agreement between the different immunohistochemical results were subjected to the *kappa* coefficient considering the following cutoffs: *kappa* ≤ 40% weak agreement; *kappa* > 40% to < 75% good or fair agreement; *kappa* ≥ 75% excellent agreement. This study was approved by the Ethics Committee of the UFMG, Brazil.

## Results

Among the patients studied, nine (60%) were female and six (40%) were male. The average age of male patients (50 ± 10 years) was lower than that of (63 ± 13 years) female patients (**Table 1**).

**Table 1** Comparison of mean age in relation to sex in 15 patients with gastric neuroendocrine tumor type I

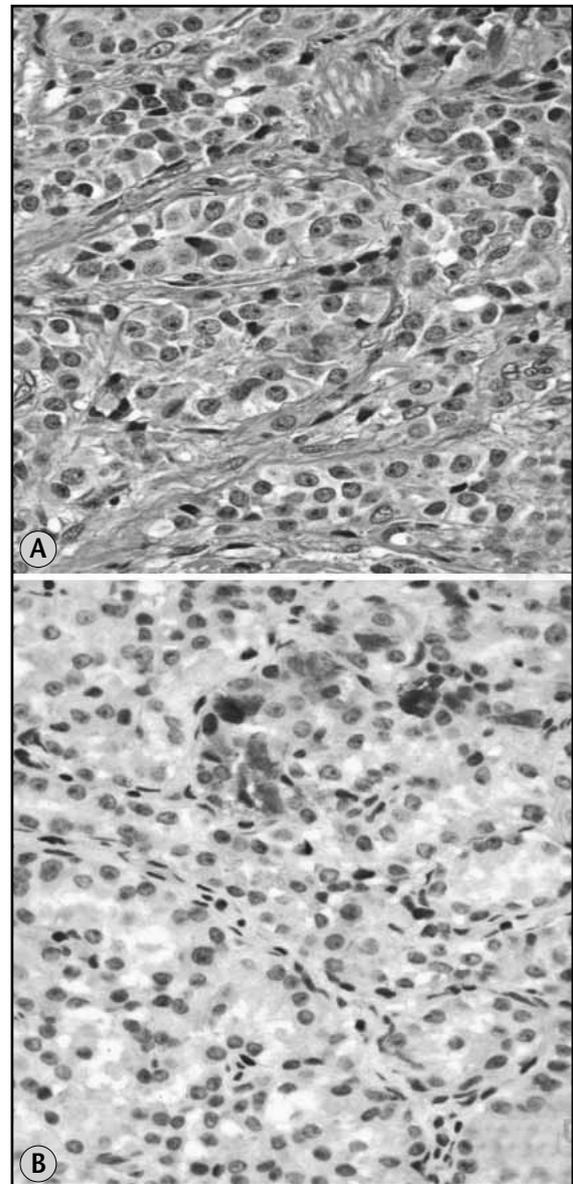
Sex	n	Average ± sd	Statistic test	p
Female	9	63 ± 13	t = 2.13	0.0544
Male	6	50 ± 10		

sd: standard deviation.

The histological pattern of the 15 tumors was similar in all of them, showing cells with regular, round nuclei, forming cords and small nests, immersed in the *lamina propria*, often occupying the full mucosa thickness, and infiltrating and destroying gastric crypts. Infiltration of *muscularis mucosa* occurred in most of the examined samples of tumors with or without infiltration of the submucosa (**Figure 1**). The neuroendocrine marker chromogranin was positive in 14 out of the 15 tumors studied. The one negative tumor for chromogranin, corresponding to the patient n. 10, subsequently showed positive immunoreactivity to antibodies against synaptophysin confirming its neuroendocrine nature (**Table 2**).

The immunohistochemical expression of ghrelin was present in 11 (73%), and pre-proghrelin in 13 (87%) neuroendocrine tumors and the degree of positivity of the immunoreactive cells was similar between these two peptides, showing excellent concordance for the presence of these two antigens in samples of the tumors (**Table 3**).

However, no significant correlation was seen between the results of immunostaining for chromogranin and ghrelin, as it was between chromogranin and pre-proghrelin. In almost all the tumors the chromogranin staining pattern



**Figure 1** – Microscopic view of well differentiated gastric neuroendocrine tumor. (A) Hematoxylin and eosin staining (400x); (B) few ghrelin immunoreactive cells (400x)

**Distribution of the patients with gastric neuroendocrine tumor type I according to sex, age and immunohistochemical expression of chromogranin, ghrelin and pre-proghrelin**

**Table 2**

Patient	Sex	Age	Neuroendocrine tumor		
			Chromogranin	Ghrelin	Pre-proghrelin
1	M	63	+	+	+
2	F	73	+	+	+
3	M	43	+	+	+
4	M	42	+	+	+
5	F	67	+	-	+
6	M	56	+	+	+
7	F	75	+	-	-
8	F	55	+	+	+
9	F	44	+	-	+
10*	F	83	-	+	+
11	M	57	+	-	-
12	F	49	+	+	+
13	F	71	+	+	+
14	M	39	+	+	+
15	F	55	+	+	+

M: male; F: female.

\*Tumor positive for synaptophysin.

**Study of correlation between the degree of immunohistochemical reaction for ghrelin and pre-proghrelin in 15 gastric type I neuroendocrine tumor**

**Table 3**

Ghrelin	Pre-proghrelin				Total
	-	+	++	+++	
-	2	1	1	0	4
+	0	6	0	0	6
++	0	0	1	0	1
+++	0	0	0	4	4

Degree of immunostained cells: + = < 10%; ++ = 10% to 50%; +++ = > 50%; kappa = 81%.

was predominantly diffuse while the presence of ghrelin and pre-proghrelin positive cells varied in each case (Tables 4 and 5) (Figure 2).

The expression of ghrelin immunoreactive cells in the hyperplastic nodules was observed in seven (47%) and pre-proghrelin in eight (53%) cases (Tables 6 and 7).

**Study of correlation between the degree of immunohistochemical reaction for ghrelin and chromogranin in 15 gastric type I neuroendocrine tumors**

**Table 4**

Ghrelin	Chromogranin				Total
	-	+	++	+++	
-	0	0	0	4	4
+	1	0	1	4	6
++	0	0	0	1	1
+++	0	0	0	4	4
Total	1	0	1	13	15

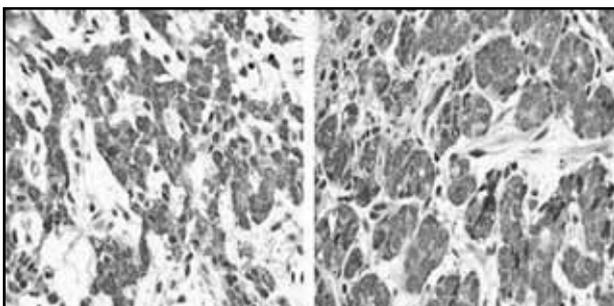
Degree of immunostained cells: + = < 10%; ++ = 10% to 50%; +++ = > 50%; kappa = 2%.

**Study of correlation between the degree of immunohistochemical reaction for chromogranin and pre-proghrelin in 15 gastric type I neuroendocrine tumors**

**Table 5**

Pre-proghrelin	Chromogranin				Total
	-	+	++	+++	
-	0	0	0	2	2
+	1	0	1	5	7
++	0	0	0	2	2
+++	0	0	0	4	4
Total	1	0	1	13	15

Degree of immunostained cells: + = < 10%; ++ = 10% to 50%; +++ = > 50%; kappa = 2%.



**Figure 2** – Microscopic view of well differentiated gastric neuroendocrine tumor: immunohistochemical staining showing numerous ghrelin (A) and pre-proghrelin (B) immunoreactive cells. A and B 400x

**Ghrelin immunoreactive cells in 15 type I gastric neuroendocrine tumors and in the hyperplastic nodules of adjacent mucosa**

**Table 6**

Ghrelin in hyperplastic nodules	Ghrelin in neuroendocrine tumors				Total
	-	+	++	+++	
Negative	3	4	0	1	8
Positive	1	2	1	3	7

Degree of immunostained cells: + = < 10%; ++ = 10% to 50%; +++ = > 50%; kappa = 22%.

**Pre-proghrelin immunoreactive cells in 15 type I gastric neuroendocrine tumors and in the hyperplastic nodules of adjacent mucosa**

**Table 7**

Pre-proghrelin in hyperplastic nodules	Pre-proghrelin in neuroendocrine tumors				Total
	-	+	++	+++	
Negative	2	4	0	1	7
Positive	2	2	1	3	8

Degree of immunostained cells: + = < 10%; ++ = 10% to 50%; +++ = > 50%; kappa = 4%.

## Discussion

The gastric neuroendocrine tumor type I is associated with ABG, and this latter pathological condition, considered as predisposing to gastric carcinoids, has been diagnosed with relative frequency in the Alfa Institute of Gastroenterology<sup>(8)</sup>. Patients with ABG often have elevated serum gastrin, and the main source of gastrin is the G cells located mainly in gastric antral mucosa of the stomach that is usually preserved in this pathological condition. The hypergastrinaemia is the result of progressive impairment of the parietal cells of these patients resulting in achlorhydria. The atrophic gastric mucosa of the body, however, is rich in endocrine cells, which persist despite the glandular atrophy, and hyperplastic endocrine proliferation frequently occurs during the evolution of the disease. It is recognized that endocrine hyperplasia would result mainly from stimulation of the hormone gastrin on enterochromaffin-like cells (ECL); however, one can not rule out other local and systemic stimuli as well as other types of endocrine cells participating of the hyperplastic changes of the endocrine cells in this pathological condition<sup>(3)</sup>. Finally, in a certain number of these patients, probably

due to the presence of hyperplastic nodules, comes the neuroendocrine tumor, often multifocal and usually presenting an indolent course<sup>(2)</sup>. No one knows exactly neither the factors responsible for the progression of these hyperplastic nodules into neoplastic nor the factors, besides the hormone gastrin, that modulate the growth of these tumors. Similarly, the morphological boundaries between these two conditions, hyperplasia and neoplasia, are not clear. The present study adopted as indicative of neoplasia the presence of enlarged nodules with at least 500 µm in diameter with invasion and destruction of gastric crypts and infiltration of the *muscularis mucosa* or submucosa. The presence of dysplasia usually does not provide parameters for accurate diagnosis because these tumors, regardless of their biological behavior, have fairly uniform cellularity. Ghrelin immunoreactive cells seems to be a common finding in neuroendocrine tumors not only from the stomach but also in other organs, such as pituitary, pancreas and thyroid<sup>(7, 14)</sup>. However, it does not seem to occur in non-endocrine tumors, even in organs rich in ghrelin-producing cells as the stomach<sup>(15)</sup>. The fact that we frequently find neuroendocrine tumors containing a variable number of immunoreactive ghrelin cells does not indicate that this peptide is being released in significant quantities in the bloodstream. As far as we know, only one case of pancreatic neuroendocrine tumor, with numerous immunoreactive ghrelin cells, was reported to be associated with high levels of plasma ghrelin<sup>(4)</sup>. In the present study the immunohistochemical expression of ghrelin was observed in 11 (73.3%) among the 15 gastric neuroendocrine tumors studied. Therefore, as observed by other authors, a significant number of these tumors contain ghrelin immunoreactive cells. It should be noted that the number of immunoreactive cells varied in relation to the different tumors that express this peptide, i. e., six (55%) of them have only a few cells (< 10%) positive for ghrelin, while in four (36%) tumors this occurred in more than 50% of the neoplastic tissue. In fact, in a substantial proportion (27%) of 15 studied tumors the presence of ghrelin immunoreactive cells has not been observed. The frequency of findings of ghrelin immunoreactive cells in

the present study is very close to the results reported by Papotti *et al.*<sup>(16)</sup>. These authors found 12 (75%) ghrelin positive cases in 16 gastric carcinoids studied. Likewise, this finding is similar to that observed by Rindi *et al.* who found ghrelin immunoreactive cells in 25 (76%) out of 33 well-differentiated neuroendocrine tumors of the stomach. It should be noted that in the latter study only 21 (64%) of tumors were type I gastric carcinoid and the others were types II and III<sup>(17, 18)</sup>.

Since nodular hyperplasia observed in patients with ABC is believed to be a precursor lesion of gastric neuroendocrine tumors it would also be of interest to do a comparative study between ghrelin and pre-proghrelin immunoreactivity in these hyperplastic nodules. The presence of these nodules containing ghrelin immunoreactive cells occurred just in seven, and pre-proghrelin in eight out of the 15 tumors of the present series. Therefore, in seven tumors nodular hyperplasia did not present immunoreactivity to ghrelin and pre-proghrelin. Therefore, there seems to be no statistical correlation between the immunohistochemical expression of ghrelin and pre-proghrelin in both tumors and hyperplastic nodules.

---

## Conclusion

In conclusion, one can assume that both ghrelin and pre-proghrelin immunoreactive cells may be found frequently, and with similar proportions, in type I gastric neuroendocrine tumors, and in endocrine hyperplasia associated with them. Because of the wide spectrum of endocrine and paracrine actions of ghrelin, one can also hypothesize that somehow this peptide may be involved in the pathogenesis and development of type I gastric neuroendocrine tumors and of its associated hyperplastic lesions.

---

## Acknowledgements

We are indebted to Eugênio M. A. Goulart for excellent technical assistance in statistics.

---

## References

1. ABIKO, Y. *et al.* Enhanced plasma ghrelin levels in *Helicobacter pylori*-colonized, interleukin-1-receptor type 1-homozygous knockout (IL-1R1<sup>-/-</sup>) mice. *World J Gastroenterol*, v. 11, n. 27, p. 4148-53, 2005.
2. ANNIBALE, B. *et al.* Atrophic body gastritis patients with enterochromaffin-like cell dysplasia are at increased risk for the development of type I gastric carcinoid. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 12, n. 12, p. 1449-56, 2001.

3. BORDI, C. *et al.* Endocrine cell growths in atrophic body gastritis. Critical evaluation of a histological classification. *J Pathol*, v. 182, n. 3, p. 339-46, 1997.
4. CORBETTA, S. *et al.* Circulating ghrelin levels in patients with pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors: identification of one pancreatic ghrelinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 88, n. 7, p. 3117-20, 2003.
5. DATE, Y. *et al.* Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesised in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, v. 141, p. 4255-61, 2000.
6. HOWARD, A. D. *et al.* A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, v. 273, p. 974-7, 1996.
7. IWAKURA, H. *et al.* Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, p. 4885-8, 2002.
8. KAKEHASI, A. M. *et al.* Chronic gastritis and bone mineral density in women. *Dig Dis Sci*, v. 54, p. 819-24, 2009.
9. KOJIMA, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, v. 402, p. 656-60, 1999.
10. KOJIMA, M.; HOSODA, H.; KANGAWA, K. Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the GH (growth hormone) secretagogue receptor. *Horm Res*, v. 56, Suppl, p. 93-7, 2001.
11. KORBONITS, M. *et al.* Ghrelin: a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*, v. 25, p. 27-68, 2004.
12. KORBONITS, M. *et al.* Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine*, v. 14, p. 101-4, 2001.
13. KORBONITS, M. *et al.* The expression of the GHS receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other NE tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 2, p. 881-7, 2001.
14. LEONITIOU, C. A. *et al.* Ghrelin in neuroendocrine organs and tumours. *Pituitary*, v. 10, n. 3, p. 213-25, 2007.
15. MOTTERSHEAD, M. *et al.* Immunohistochemical and quantitative mRNA assessment of ghrelin expression in gastric and oesophageal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*, v. 60, n. 4, p. 405-9, 2007.
16. PAPOTTI, M. *et al.* Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 10, p. 5052-9, 2001.
17. RINDI, G. *et al.* Characterization of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol*, v. 117, p. 511-9, 2002.
18. RINDI, G. *et al.* Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochem Cell Biol*, v. 117, n. 6, p. 521-5, 2002.
19. SMITH, R. G.; LEONARD, R. GH secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine*, v. 14, n. 1, p. 9-14, 2001.
20. SOLCIA, E. *et al.* Histopathological classification of non-antral gastric endocrine growths in man. *Digestion*, v. 41, p. 185-200, 1988.
21. ZHANG, J. V. *et al.* Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science*, v. 310, p. 996-9, 2005.
22. ZHANG, W. *et al.* Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat. *J Physiol*, v. 537, p. 231-6, 2001.
23. ZHAO, C-M. *et al.* Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res*, v. 331, p. 575-87, 2008.

**Mailing address**

Alfredo J. A. Barbosa  
 Departamento de Patologia  
 Faculdade de Medicina, UFMG  
 Av. Alfredo Balena, 190  
 CEP: 30130-100 - Belo Horizonte-MG

**8.2 ANEXO 2- ARTIGO PUBLICADO NO JORNAL BRASILEIRO DE  
PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL NO ANO DE 2011.**

# Ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells in atrophic body gastritis

Primeira submissão em 10/02/11  
Última submissão em 10/02/11  
Aceito para publicação em 15/03/11  
Publicado em 20/10/11

*Células imunorreativas a grelina e preprogrelina na gastrite atrófica do corpo*

Letícia F. Moreira<sup>1</sup>; Alfredo J. A. Barbosa<sup>2</sup>

key words	abstract
Gastritis Atrophic body gastritis Ghrelin Preproghrelin Endocrine cells Endocrine hyperplasia	<p><b>Introduction:</b> Ghrelin is a 28 amino acid peptide mainly secreted by endocrine cells of the gastric mucosa, which is believed to have a modulating effect on cell growth. <b>Objective:</b> To assess the presence of ghrelin and its precursor preproghrelin molecule in endocrine hyperplasias associated with atrophic body gastritis (ABG). <b>Material and methods:</b> Endoscopic biopsies from 54 patients with ABG were processed for immunohistochemistry and specific antibodies against ghrelin, preproghrelin and chromogranin were applied. We assessed the immunoreactive cells in endocrine hyperplasia from the atrophic mucosa and intestinal and pseudo-antral metaplasia areas. <b>Results:</b> There was ghrelin expression in a variable number of hyperplastic endocrine cells from all patients studied. There was a statistically significant difference in the number of hyperplastic nodules with more than 50% immunostained cells for chromogranin and ghrelin and for chromogranin and preproghrelin. The mean number of hyperplastic nodules identified by chromogranin was 8.6 per patient. Most nodules were immunoreactive to ghrelin and preproghrelin. The presence of ghrelin and preproghrelin expression was uncommon in glands showing intestinal metaplasia: four (9.5%) and nine (21.4%) cases, respectively. In contrast, they were relatively frequent in pseudo-antral metaplasia areas: 37 (72.5%) and 26 (50.9%) cases, respectively. <b>Conclusion:</b> Ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells are frequently present in endocrine hyperplasias associated with ABG. However, further studies are required to determine to what extent these hormones act as modulators of hyperplastic nodular growth and evolution.</p>

resumo	unitermos
<p><b>Introdução:</b> Grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos secretado principalmente pelas células endócrinas da mucosa gástrica, acreditando-se que apresente ação moduladora relacionada com o crescimento celular. <b>Objetivo:</b> Estudar a presença de grelina e da molécula precursora preprogrelina na hiperplasia endócrina associada à gastrite atrófica do corpo (GAC). <b>Material e métodos:</b> Biópsias endoscópicas de 54 pacientes com GAC foram processadas para imuno-histoquímica, e anticorpos específicos contra grelina, preprogrelina e cromogranina foram utilizados. As células imunorreativas foram examinadas na hiperplasia endócrina presente na mucosa atrófica e nas áreas de metaplasia intestinal e pseudoantral. <b>Resultados:</b> Ocorreu expressão de grelina em número variável de células endócrinas hiperplásicas em todos os pacientes estudados. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a frequência de nódulos hiperplásicos com mais de 50% de células imunomarcadas por cromogranina e grelina ou por cromogranina e preprogrelina. O número médio de nódulos hiperplásicos por paciente demonstrado pela cromogranina foi de 8,6. A maioria desses nódulos apresentou células imunorreativas para grelina e preprogrelina, respectivamente, 5,1 e 5,6, em média. A presença da expressão imuno-histoquímica de grelina e preprogrelina foi incomum em glândulas exibindo metaplasia intestinal, respectivamente, em quatro (9,5%) e nove (21,4%) casos e foram frequentes nas áreas de metaplasia pseudoantral em, respectivamente, 37 (72,5%) e 26 (50,9%) casos. <b>Conclusão:</b> Células imunorreativas a grelina e preprogrelina estão presentes na hiperplasia endócrina associada à GAC. Entretanto, mais estudos são necessários para saber até que ponto esses hormônios estão atuando como moduladores do crescimento e a evolução desses nódulos hiperplásicos.</p>	Gastrite Gastrite atrófica do corpo Grelina Preprogrelina Células endócrinas Hiperplasia endócrina

1. Mestra em Patologia Geral; doutoranda em Patologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2. Doutor em Ciências; professor titular da Faculdade de Medicina da UFMG.

## Introduction

Ghrelin is a 28-amino-acid peptide first described in 1999 with a strong growth hormone-releasing action mediated by the activation of the growth hormone secretagogue receptor<sup>(8, 9)</sup>. This peptide is known to be secreted mainly by endocrine cells present in the oxyntic mucosa of the stomach, which account for about 80% of the plasma levels of this hormone<sup>(5)</sup>. A growing number of studies have indicated that ghrelin-immunoreactive cells are present in smaller numbers in other organs<sup>(5, 10)</sup>. In addition to stimulating growth hormone secretion, ghrelin also stimulates appetite and a positive energy balance<sup>(22)</sup>. It also acts on the hypothalamus and on the exocrine and endocrine pancreas, among other reported activities<sup>(2, 6, 12)</sup>. Ghrelin is derived from post-translational cleavage of the precursor molecule preproghrelin. Endocrine cells that express ghrelin have been described in neuroendocrine tumors from different tissues<sup>(13, 15, 19)</sup>. Type I gastric neuroendocrine tumors (carcinoid tumors) are believed to originate from nodules of hyperplastic endocrine cells usually present in the atrophic gastric mucosa of patients with autoimmune gastritis<sup>(18)</sup>. We have recently shown that ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells are variably present in type I gastric carcinoids and in the adjacent endocrine hyperplastic nodules of patients with atrophic body gastritis<sup>(14)</sup>. Given the multiple functions proposed for ghrelin, including a possible role in controlling cell proliferation, we decided to determine the presence of this peptide and its precursor molecule preproghrelin in different types of endocrine cell hyperplasia associated with atrophic body gastritis. We also decide to study the presence of these immunoreactive cells in areas of intestinal and pseudopyloric metaplasia which are frequent changes observed in the atrophic mucosa of patients with advanced stages of atrophic body gastritis (ABG).

## Material and methods

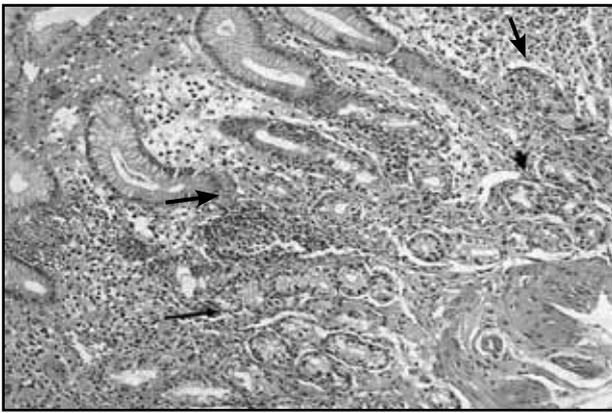
Paraffin blocks of endoscopic biopsies from 54 patients with histologically well recognized ABG were obtained from the Alfa Institute of Gastroenterology, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Hematoxylin and eosin (HE) slides of antral and oxyntic mucosa from each case were re-examined and the previous histological diagnoses were confirmed. New 4 µm thick paraffin sections were obtained for staining with the combined Alcian blue-periodic acid-Schiff

(PAS/Ab) technique, and for immunohistochemistry. PAS/Ab staining was necessary to confirm the presence of intestinal metaplasia and of PAS-positive mucin-producing glands (pseudopyloric metaplasia). Immunohistochemical staining was performed by pretreating histological sections in antigen retrieval solution (citrate buffer retrieval solution, pH 6, Dako Laboratories, USA) in a water bath at 98°C for 20 minutes and subsequent cooling at room temperature. The following primary antibodies were used: a) monoclonal antibodies against chromogranin A (Novocastra Laboratories, UK), working dilution 1:150, to confirm the presence of neuroendocrine cell hyperplasia; b) polyclonal antibodies raised in rabbits against human ghrelin, working dilution 1:1500, and preproghrelin, working dilution 1:4000 (Phoenix Pharmaceuticals, USA). For the purpose of the present study two types of endocrine cell hyperplasia were considered, i.e., (1) nodular endocrine cell hyperplasia, characterized by small clusters of chromogranin-positive cells immersed in the connective tissue of the *lamina propria*, and (2) immunoreactive cells present in the glandular wall, either as isolated cells or cells acquiring the so-called linear hyperplasia format<sup>(20)</sup>. The presence of immunohistochemical expression of ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells was evaluated in the glands presenting intestinal metaplasia, mucin-secreting glands (so-called pseudopyloric metaplasia), and in the nodular and diffuse endocrine cell hyperplasia.

The study was approved by the Ethics Committee (COEP 479/04) of the UFMG, Brazil.

## Results

Of the 54 patients studied, 42 (77.8%) were females and 12 (22.2%) were males. The mean age of male patients was 58 ± 19 years and the mean age of female patients was 53 ± 14 years. The histological pattern of the gastric mucosa was similar in almost all the 54 patients studied, showing diffuse involvement of the corpus mucosa by severe chronic atrophic gastritis. Most patients exhibited areas of intestinal and pseudopyloric metaplasia throughout the gastric mucosa of the body, and lymphoid follicles (**Figure 1**). The gastric mucosa of the antrum was histologically normal or presented minimal changes. Areas of intestinal metaplasia and pseudopyloric metaplasia were present in sections from 42 (77.8%) and 51 (94.4%) patients, respectively (**Table 1**). The atrophic body gastric mucosa of all 54 patients exhibited endocrine cell hyperplasia demonstrated

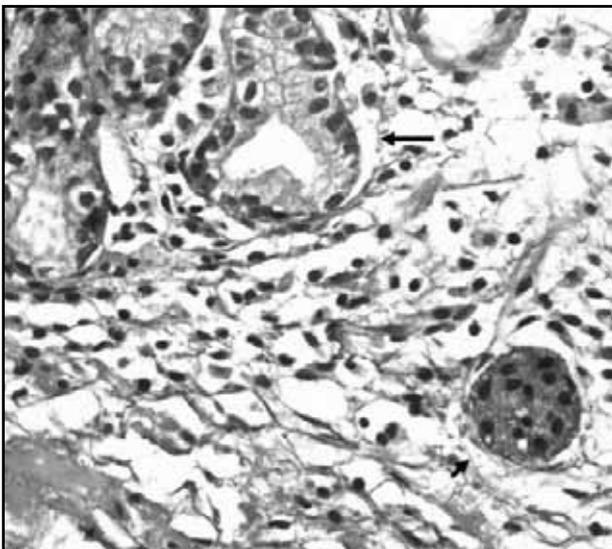


**Figure 1** – Oxyntic gastric mucosa of patient with advanced atrophic body showing: diffuse mononuclear cell infiltration of the entire thickness of the lamina propria; few remained acidopeptic glands (short arrow), and pseudopyloric metaplasia (long arrow) (HE staining, 100x)

HE: hematoxylin and eosin.

by chromogranin staining. Fifty-one patients (94.4%) had multiple hyperplastic endocrine nodules in the lamina propria in addition to diffuse endocrine hyperplasia, and three (5.6%) presented diffuse endocrine cell hyperplasia without the presence of hyperplastic nodules. Some of the hyperplastic nodules were reasonably apparent in the HE sections, but most of them were detected after chromogranin staining (**Figure 2**). The immunohistochemical expression of ghrelin and preproghrelin was variably present in hyperplastic endocrine cells from all patients studied (**Figure 3**).

Most of the hyperplastic nodules also presented variable number of immunoreactive cells to chromogranin, ghrelin and preproghrelin, but only those nodules with more than 50% of immunoreactive cells were considered for comparative analysis between the different antibodies



**Figure 2** – Immunoreactive cells to chromogranin in diffuse (long arrow) and nodular (short arrow) endocrine cell hyperplasia of patient with ABG (IHC staining, 400x)

ABG: atrophic body gastritis; IHC: immunohistochemical.

used. The mean number of hyperplastic nodules per patient demonstrated by chromogranin staining was 8.6. Most of these hyperplastic nodules presented ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells, 5.1 ( $p = 0.004$ ) and 5.6 ( $p = 0.018$ ), respectively (**Tables 2** and **3**).

Ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells were scarcely observed in glands exhibiting intestinal metaplasia, with four (9.5%) and nine (21.4%) cases presenting these types of epithelial changes, respectively. In contrast, in areas of pseudopyloric metaplasia ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells were present in many patients with this type of metaplasia, 37 (72.5%) and 26 (50.9%), respectively (**Table 1**) (**Figure 3**).

**Immunohistochemical expression of ghrelin and preproghrelin in glands with intestinal metaplasia and in glands with pseudopyloric metaplasia in patients with ABG**

**Table 1**

Type of metaplasia	n	Ghrelin n (%)	Preproghrelin n (%)
Intestinal	42	4 (9.5%)	9 (21.4%)
Pseudopyloric	51	37 (72.5%)	26 (50.9%)

ABG: atrophic body gastritis.

**Number of endocrine hyperplastic nodules per patient containing more than 50% of immunoreactive endocrine cells to chromogranin A and ghrelin**

**Table 2**

Immunoreaction to	Mean ± SD	Paired t test	p
Chromogranin A	8.6 ± 10.1	3.01	0.004
Ghrelin	5.1 ± 6.4		

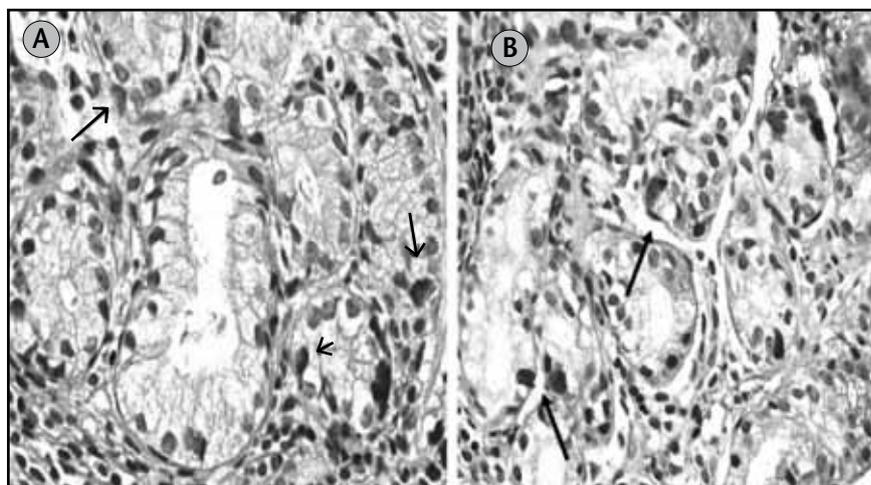
SD: standard deviation.

**Number of endocrine hyperplastic nodules per patient containing more than 50% of immunoreactive endocrine cells to chromogranin A and preproghrelin**

**Table 3**

Immunoreaction to	Mean ± SD	Paired t test	p
Chromogranin A	8.6 ± 10.1	2.42	0.0189
Preproghrelin	5.6 ± 6.7		

SD: standard deviation.



**Figure 3** – Diffuse hyperplastic immunoreactive cells (arrows) to ghrelin (A) and to preproghrelin (B) in pseudopyloric metaplasia of gastric mucosa of patient with ABG (IHC staining, 400x)

ABG: atrophic body gastritis; IHC: immunohistochemical.

## Discussion

The atrophy of specialized glands of the gastric mucosa associated with chronic inflammation is a common pathological condition in humans. In general, the more severe cases of atrophy of the gastric mucosa do not involve diagnostic difficulties by the two methods commonly used, i.e., endoscopic and histopathological examinations. The current importance of the recognition of gastric mucosal atrophy is the frequency at which this condition is associated with the development of precancerous lesions, i.e., intestinal metaplasia and dysplasia of the gastric epithelium, which may develop into gastric cancer in the sequence known as Correa cascade<sup>(4)</sup>. The two pathological conditions most frequently associated with the development of gastric mucosa atrophy are *H. pylori*-associated multifocal chronic gastritis and ABG, which in most cases has autoimmune etiology. Being selective for the oxyntic mucosa, autoimmune gastritis leads to progressive loss of parietal cells and chief cells, resulting in the majority of clinical manifestations presented by patients in the later stages of the disease, due to the occurrence of achlorhydria, hypergastrinemia, anemia and their consequences.

It is known that the development of autoimmune gastritis, with or without pernicious anemia, is more common among members of one family in successive generations. Although this is not clearly explained, it is assumed that there is a propensity to develop anti-parietal cell antibodies in genetically predisposed individuals. The existence of genetic predisposition contributing to the induction of atrophy of the oxyntic glands is

suspected since ABG is often associated with other diseases with an immunological background. Moreover, racial preferences seem to exist since this disease appears to be significantly more conspicuous in Caucasian than in Asian patients<sup>(1, 7, 16, 21)</sup>. Despite all of this evidence, the mechanisms of inheritance and the importance of environmental factors related to ABG are not known. Among the putative environmental factors, the bacterium *H. pylori* has been cited as the most important<sup>(17)</sup>. All patients in this study were negative for *H. pylori* infection which is expected to occur in cases of severe atrophy of the gastric mucosa, regardless its etiology. Among the patients studied here, women prevailed over men and age was similar in both groups,  $58 \pm 19$  and  $53 \pm 14$  years, respectively. These data are similar to most of those reported in the western literature<sup>(3, 11)</sup>.

The gastric mucosa of the body is rich in neuroendocrine cells that occur in the crypts between the parietal cells, mucus-secreting cells and chief cells. Interestingly, in patients with ABG these neuroendocrine cells become hyperplastic under the constant stimulus of gastrin, contrary to what occurs with the parietal cells, which virtually cease to exist in the more advanced stages of the disease. The hyperplasia of neuroendocrine cells occurs both in the wall of the crypts (diffuse and linear hyperplasia), and forming hyperplastic nodules in the intimacy of the connective tissue of the *lamina propria*<sup>(20)</sup>. It is frequently assumed that the latter type of hyperplasia is a first step towards the development of gastric neuroendocrine tumor type I. There are no recognized factors responsible for the progression of hyperplastic nodules to cancer. Thus studies that address morphological, biochemical and evolutionary

aspects of these hyperplastic lesions may be useful in improving our understanding of the pathogenesis of neuroendocrine tumors of the stomach. In a previous study we observed that both ghrelin peptide and its precursor molecule preproghrelin are present in a large number of neoplastic endocrine cells in gastric neuroendocrine tumors associated with ABG<sup>(14)</sup>. Other studies have shown that ghrelin is present not only in neuroendocrine tumors of the stomach but also in neuroendocrine tumors in other locations<sup>(6, 13)</sup>.

It is known that ghrelin-producing cells are present in different tissues, including the intestinal mucosa, however sparingly and inconstantly. In contrast, in the body gastric mucosa these cells reach their highest density and are considered to be the main source of plasma ghrelin<sup>(8,9)</sup>. In the present study ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells showed similar frequencies both in areas of intestinal metaplasia (9.5% and 21.4%, respectively) and in areas of pseudopyloric metaplasia (72.5% and 50.9%, respectively). These results show that ghrelin-producing cells was uncommon in areas of intestinal metaplasia and, conversely, was frequent in areas of pseudopyloric metaplasia, the latter showing gastric differentiation. Therefore, regarding the differentiation of endocrine elements, one may assume that the areas of intestinal metaplasia and pseudopyloric metaplasia, present in the gastric mucosa of patients with

ABG, and consequently with autoimmune gastritis, should still retain many of the genetic characteristics of the original tissues they represent.

We conclude that the ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells are frequently found in the different types of endocrine hyperplasia of the gastric mucosa in advanced stages of ABG. However, these peptides should not be used as immunohistochemical markers for the endocrine hyperplasia that occurs in ABG, since they are significantly less sensitive than chromogranin. Ghrelin- and preproghrelin-immunoreactive cells occur in a relatively frequent manner in glands with pseudopyloric metaplasia and are uncommon in glands with intestinal metaplasia, two types of histological changes frequently seen in ABG. These cells are frequently present in nodular endocrine hyperplasia of patients with ABG. However, the extent to which the proliferation of hyperplastic nodules and their progression to cancer are under the influence of these peptides remains a matter for further research.

## Acknowledgements

The authors thank Dr. Eugênio M. A. Goulart for the helpful technical assistance in statistics.

## References

- ALONSO, M. *et al.* Plasma ghrelin concentrations in type 1 diabetic patients with autoimmune atrophic gastritis. *Eur J Gastroenterol*, v. 157, p. 763-9, 2007.
- BALDELLI, R. *et al.* Ghrelin: a new hormone with endocrine and non-endocrine activities. *Pediatr Endocrinol Rev*, v. 2, n. 1, p. 8-14, 2004.
- CHLUMSKA, A. *et al.* Autoimmune gastritis. A clinicopathologic study of 25 cases. *Cesk Patol*, v. 41, p. 137-42, 2005.
- CORREA, P. Chronic gastritis as a cancer precursor. *Scand J Gastroenterol Suppl*, v. 104, p. 131-6, 1984.
- DATE, Y. *et al.* Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesised in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, v. 141, p. 4255-61, 2000.
- IWAKURA, H. *et al.* Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, p. 4885-8, 2002.
- KEKKI, M. *et al.* Classification, principles and genetics of chronic gastritis. *Scan J Gastroenterol*, v. 22, Suppl. 141, p. 1-28, 1987.
- KOJIMA, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, v. 402, p. 656-60, 1999.
- KOJIMA, M.; HOSODA, H.; KANGAWA, K. Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the GH (growth hormone) secretagogue receptor. *Horm Res*, v. 56, Suppl., p. 93-7, 2001.
- KORBONITS, M. *et al.* The expression of the GHS receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other NE tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 2, p. 881-7, 2001.
- LAHNER, E. *et al.* Occurrence and risk factors for autoimmune thyroid disease in patients with atrophic body gastritis. *Am J Med*, v. 121, p. 136-41, 2008.
- LELY, A. J. *et al.* Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr*, v. 25, p. 426-57, 2004.

13. LEONITIOU, C. A. *et al.* Ghrelin in neuroendocrine organs and tumours. *Pituitary*, v. 10, n. 3, p. 213-25, 2007.
14. MOREIRA, L. F.; CARVALHO, M. R. N.; BARBOSA, A. J. A. Ghrelin-, and pré-proghrelin immunoreactive cells in gastric neuroendocrine tumors associated with atrophic body gastritis. *J Bras Patol Med Lab*, v. 46, p. 329-34, 2010.
15. PAPOTTI, M. *et al.* Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 10, p. 5052-9, 2001.
16. PARK, J. Y. *et al.* Gastric lesions in patients with autoimmune metaplastic atrophic gastritis (AMAG) in a tertiary care setting. *Am J Surg Pathol*, v. 34, p. 1591-8, 2010.
17. PRESOTTO, F. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and gastric autoimmune diseases: is there a link? *Helicobacter*, v. 8, p. 578-84, 2003.
18. RINDI, G. *et al.* Gastric carcinoids and neuroendocrine carcinomas: pathogenesis, pathology and behavior – clinicopathologic analysis of 205 cases. *World J Surg*, v. 20, p. 168-72, 1996.
19. RINDI, G. *et al.* Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochem Cell Biol*, v. 117, n. 6, p. 521-5, 2002.
20. SOLCIA, E. *et al.* Histopathological classification of nonantralgastric endocrine growths in man. *Digestion*, v. 41, p. 185-200, 1988.
21. TOZZOLI, R. Recent advances in diagnostic technologies and their impact in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, v. 10, p. 80-3, 2007.
22. WANG, H. S. *et al.* Elevated serum ghrelin exerts an orexigenic effect that may maintain body mass index in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *J Mol Neurosci*, v. 33, p. 225-31, 2007.

---

**Mailing address**

Alfredo J. A. Barbosa  
Faculdade de Medicina da UFMG  
Laboratório de Patologia Digestiva e  
Neuroendócrina  
Av. Alfredo Balena, 190  
CEP: 30130-100 – Belo Horizonte-MG

### 8.3 ANEXO 3- COPIA DA ATA DE DEFESA E DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA TESE.



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640  
cpg@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **LETÍCIA FIGUEIREDO MOREIRA**, nº de registro 2007652352. Às quatorze horas do dia **24 de fevereiro de dois mil e onze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"ESTUDO DAS CÉLULAS ENDÓCRINAS IMUNORREATIVAS A GHRELINA E PREPROGHRELINA NA HIPERPLASIA ENDÓCRINA ASSOCIADA À GASTRITE ATRÓFICA DO CORPO E NO CARCINÓIDE GÁSTRICO TIPO 1"**, requisito final para a obtenção do grau de Doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Alfredo José Afonso Barbosa, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Alfredo José Afonso Barbosa /Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Profa. Maria da Consolação Vieira Moreira	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Extensão de</u>
Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Reprovado</u>
Profa. Marlene Isabel Vargas Vitoria	Instituição: UFV	Indicação: <u>Aprovado</u>
Profa. Sheila Adad	Instituição UFTM	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada Aprovada.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2011.

Prof. Alfredo José Afonso Barbosa \_\_\_\_\_

Profa. Maria da Consolação Vieira Moreira \_\_\_\_\_

Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral \_\_\_\_\_

Profa. Marlene Isabel Vargas Vitoria \_\_\_\_\_

Profa. Sheila Adad \_\_\_\_\_

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) \_\_\_\_\_

Prof. Wagner Luiz Tafuri  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Patologia - Faculdade de Medicina/UFMG

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

CONFERE COM O ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação



**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
[cpg@medicina.ufmg.br](mailto:cpg@medicina.ufmg.br)



**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Alfredo José Afonso Barbosa, Maria da Consolação Vieira Moreira, Mônica Maria Demas Álvares Cabral, Marlene Isabel Vargas Vilorio e Sheila Adad, aprovou a defesa da tese intitulada: **“ESTUDO DAS CÉLULAS ENDÓCRINAS IMUNORREATIVAS A GHRELINA E PREPROGHRELINA NA HIPERPLASIA ENDÓCRINA ASSOCIADA À GASTRITE ATRÓFICA DO CORPO E NO CARCINÓIDE GÁSTRICO TIPO 1”**, apresentada pela doutoranda **LETÍCIA FIGUEIREDO MOREIRA**, para obtenção do título de Doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 24 de fevereiro de 2011.

Prof. Alfredo José Afonso Barbosa  
Orientador

Profa. Maria da Consolação Vieira Moreira

Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral

Profa. Marlene Isabel Vargas Vilorio

Profa. Sheila Adad