



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANA SAYURI TAKEMURA

***HELICOBACTER* SPP. GÁSTRICO EM CÃES E GATOS:
RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES INFECTANTES,
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E PROLIFERAÇÃO
CELULAR**

Londrina
2007

LUCIANA SAYURI TAKEMURA

***HELICOBACTER* SPP. GÁSTRICO EM CÃES E GATOS:
RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES INFECTANTES,
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E PROLIFERAÇÃO
CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (nível mestrado) – área de concentração: Sanidade Animal – da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientação: Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense

Co-orientação: Prof. Dr. Pedro Luiz de Camargo

Londrina
2007

LUCIANA SAYURI TAKEMURA

***HELICOBACTER* SPP. GÁSTRICO EM CÃES E GATOS:
RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES INFECTANTES,
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E PROLIFERAÇÃO
CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (nível mestrado) – área de concentração: Sanidade Animal – da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientação: Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense

Co-orientação: Prof. Dr. Pedro Luiz de Camargo

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Maria Reis Ferreira

Prof. Dra. Roberta Lemos Freire

Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense

À minha família e verdadeiros amigos pelo
apoio e paciência

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Às instituições financiadoras CAPES, CnPQ e Fundação Araucária.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Departamento de Clínicas Veterinárias do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica (Claudia, Letícia, Tiziane, Profa. Giovana, Zé Carlos, Prof. Antônio Carlos e Profa. Ana Paula): a todos que me receberam tão bem, pela ajuda e ensinamentos do dia-dia sempre com muita paciência. Aos estagiários e amigos “Eli” (Elisângela) e “Naldo” (Reginaldo) pelas mãos direita e esquerda.

Ao Laboratório de Virologia Animal (Professores Amauri e Alice Alfieri, Kerlei, Maria e Dalíria) por me receberem e permitirem a realização de parte do trabalho.

A todos os funcionários atenciosos que com muita paciência e boa vontade me atenderam.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação que de alguma forma mostraram a importância em se fazer ciência. Em especial, à Dra. Roberta L. Freire, pelas dicas e auxílio em relação a algumas análises estatísticas.

À Banca de qualificação composta pelos docentes Dra. Alice F. Alfieri, Dr. Antônio Carlos F. Reis e Dr. Pedro L. de Camargo que só engrandeceram este trabalho.

À minha orientadora, Prof. Dra. Ana Paula Bracarense, minha mestre, deixo aqui toda minha gratidão pela oportunidade, confiança e paciência, pela cumplicidade durante a construção deste trabalho, mas por todo aprendizado gerado durante esses anos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Pedro Luiz de Camargo, meu muito obrigada por ter permitido minha participação nesse projeto, considero um ombro amigo, me amparou e me aconselhou, por todos aqueles momentos de ensinamento e paciência.

À Profa. Ides, do Hospital Universitário da UEL, pela parceria e confiança.

À minha Família, meu alicerce e porto-seguro. Às minhas três mães (biológica e madrinhas) pela criação e educação, por todo incentivo e apoio de toda minha vida. Ao meu pai, que apesar da distância, esteve sempre me incentivando para batalhar e me tornar uma pessoa e profissional cada vez mais completa. Ao meu único avô de 98 anos, por estar sempre por perto. Aos meus irmãos Dry, Mau e Rô por todo significado e pela existência diária na minha vida. Aos meus sobrinhos Pedro Henrique e Caio, Manu e Bibi por me proporcionarem momentos de muita alegria e de “estresse”. Às minhas crias Julie, Wendy, Inês, Sarita, Grace Kelly, “Tuki-Tuki” e “Veinha” por todo amor e bem estar que elas me provocam.

Aos meus queridos e verdadeiros AMIGOS, que sem eles “tudo” teria sido muito mais difícil. Ao “Fê” (Felipe) e à “Toba” (Fabiana) por serem tão companheiros e fiéis, principalmente nos piores momentos, mas pelas festas, risadas e choradeiras. Às “Alinão” (Barry), “Beta” (Betinha) e “Floriana” (Flora), minhas confidentes, por estarem sempre ao meu lado, rindo ou chorando, dando força ou chamando à atenção, mas pela forte amizade. Meus amigos Alê Amude e Andréia, Katinha (Kátia), Mi Igarashi, Marlise, Wanessa, Oba e Aniê, Kazuo e Carlinha, Fábio Galli e Marcy, Sônia Filla, Ana Millet, Frango e Puff meu muito obrigada pela força, incentivo, apoio, ajuda, carinho e tudo mais que uma amizade possa significar.

À DEUS, por toda fé que deposito Nele, por toda importância no meu dia-dia, por guiar-me, e por colocar todas essas pessoas aqui citadas na minha vida.

Agradeço a todas as pessoas de bom coração que passaram na minha vida durante a realização deste mestrado, que de maneira atenciosa me ajudaram e contribuíram para a sua realização.

Acredito que ninguém faz nada sozinho.

TAKEMURA, L.S. *Helicobacter* spp. em cães e gatos: relação entre espécies infectantes, alterações histológicas e proliferação celular. 2007. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

RESUMO

Bactérias espiraladas colonizando a mucosa gástrica de várias espécies de mamíferos têm sido observadas desde o fim do século XIX. Em humanos, as espécies *Helicobacter pylori* e *H. heilmannii* têm sido relacionadas a quadros de gastrite, úlcera péptica, e ainda carcinoma e linfoma tipo MALT. Em cães e gatos, a infecção por *Helicobacter* spp. apresenta distribuição mundial, podendo ocorrer em 100% dos animais, no entanto sua patogenicidade não está bem elucidada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre as espécies infectantes de *Helicobacter*, e as alterações histológicas e proliferação celular. Foram utilizados 37 cães e 23 gatos domiciliados que foram submetidos à gastroscopia para biópsia de antro pilórico, corpo e fundo. As amostras foram submetidas às técnicas de Warthin Starry e PCR para identificação de *Helicobacter* spp., exame histológico para verificar alterações da mucosa gástrica, e técnica de AgNOR para analisar a taxa de proliferação celular. As ocorrências de *Helicobacter* spp. foram da ordem de 75,7% e 87,0% em cães e gatos, respectivamente. Foram identificadas as espécies *H. heilmannii* e *H. felis* em gatos, além do *H. bizzozeronii* ou *H. salomonis* em cães. Nenhum animal foi positivo para *H. pylori*. Infiltrado inflamatório mononuclear discreto foi frequentemente observado (29/37 cães e 17/23 gatos), assim como fibrose da lâmina própria (30/37 cães e 19/23 gatos) e degeneração glandular (25/37 cães e 19/23 gatos). Dezenove cães e 14 gatos apresentaram nódulos linfóides; 5/37 cães e 4/23 gatos tinham erosão do epitélio gástrico, e 4/37 cães e 1/23 gato mostraram edema intersticial da mucosa gástrica. A infecção por *Helicobacter* spp. estava associada com a presença de nódulo linfóide em gatos, mas não em cães e, aumento da proliferação celular em ambas as espécies estudadas. Nota-se que a observação de lesões da mucosa gástrica é comum tanto em cães quanto em gatos infectados ou não por *Helicobacter* spp.

Palavras-chave: Cães. Gatos. *Helicobacter* spp. Lesões gástricas. Proliferação celular.

TAKEMURA, L.S. *Helicobacter* spp. in dogs and cats: association between infecting species, histological findings and cellular proliferation. 2007. 107f. Dissertation (Master Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

ABSTRACT

Spiral shaped bacteria colonizing gastric mucosa of many mammals species have been observed since the end of 19th century. In humans, the species *Helicobacter pylori* and *H. heilmannii* have been related with gastritis, peptic ulcer and also carcinoma and MALT lymphoma. In dogs and cats the infection by *Helicobacter* spp. is present worldwide, and is bound to happen in 100% in the animals, but the pathogenicity is unclear. The aim of this study was to evaluate the relationship between *Helicobacter* infecting species, histological alterations and cellular proliferation. Thirty seven domiciled dogs and twenty three domiciled cats were submitted to gastroscopy to biopsy of pyloric antrum, corpus and fundus. The samples were submitted to Warthin Starry technique and PCR to identify the *Helicobacter* spp., histological exam to verify gastric mucosa alterations, and AgNOR technique to analyze tax cellular proliferation tax. The occurrences of *Helicobacter* spp. were in the order of 75,7% and 87,0% in dogs and cats, respectively. It was identified the species *H. heilmannii* and *H. felis* in cats, as well as *H. bizzozeronii* or *H. salomonis* in dogs. None of the animals was *H. pylori* positive. Mild mononuclear infiltrated inflammatory was frequently observed (29/37 dogs and 17/23 cats), as well as fibrosis in the lamina propria (30/37 dogs and 19/23 cats) and glandular degeneration (25/37 dogs and 19/23 cats). Nineteen dogs and fourteen cats presented lymphoid nodules; 5/37 dogs and 4/23 cats had erosion of gastric epithelium, and 4/37 dogs and 1/23 cat presented interstitial edema. The infection by *Helicobacter* spp. was associated with the presence of lymphoid nodules in cats, but not in dogs, and increasing of cellular proliferation in both studied species. It has been noticed that observation of gastric mucosa gastric is common in dogs and cats infected or not due *Helicobacter* spp.

Keywords: Dogs. Cats. *Helicobacter* spp. Gastric lesions. Cellular proliferation.

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

***Helicobacter* spp. em cães: relação entre espécies infectantes, alterações histológicas e proliferação celular**

Tabela 1 – Frequência de escores de intensidade de colonização bacteriana na mucosa gástrica de cães, de acordo com as regiões gástricas. Londrina, 2007.....44

Tabela 2 – Resultado das PCRs de *Helicobacter* spp. da mucosa gástrica de cães. Londrina, 2007.....45

Tabela 3 – Frequência das lesões gástricas histológicas em cães de acordo com presença ou ausência de infecção por *Helicobacter* spp. Londrina, 2007.....49

Tabela 4 – Lesões gástricas histológicas e sua frequência de acordo com as regiões da biópsia gástrica de cães. Londrina, 2007.....49

Tabela 5 – Valores de média (\pm desvio padrão) da quantificação da proliferação celular de mucosa gástrica de cães negativos e positivos para *Helicobacter* spp., das regiões de antro, corpo e fundo, utilizando método histoquímico de AgNOR. Londrina, 2007.....51

Quadro 1 – Agentes estudados, referências, seqüências dos *primers* produtos amplificados [pares de base (pb)]. Londrina, 2007.....40

Quadro 2 – Condições de tempo e temperatura utilizadas nas reações de PCRs para gênero *Helicobacter* e espécies. Londrina, 2007.....40

Figura 1 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de cães. A) *Helicobacter* spp. agrupadas e localizadas no interior da fóvea. B) *Helicobacter* spp. localizadas no interior de glândulas gástricas. Warthin Starry. Objetiva 40x. Londrina, 2007.....44

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA de *Helicobacter* spp. (399 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de cão. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular de 123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 a 11: amostras provenientes de cães. Londrina, 2007.....46

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação do gene ureB de *Helicobacter heilmannii* (580 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de cão. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular de 123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 a 8: amostras provenientes de cães. Londrina, 2007.....46

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação dos genes ureA e ureB de *Helicobacter felis* (241 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de cão. Canaleta 1: padrão de tamanho

molecular de 123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 a 11: amostras provenientes de cães. Londrina, 2007.....46

Figura 5 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de cão infectado por *Helicobacter* spp. Nódulo linfóide. H.E. Objetiva 10x.....50

Figura 6 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de cão infectado por *Helicobacter* spp. A) Fibrose de lâmina própria. B) Degeneração epitelial glandular associado com infiltrado inflamatório mononuclear. H.E. Objetiva 100x.....50

Figura 7 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de cão. A) Cão negativo para *Helicobacter* spp. B) Cão positivo para *Helicobacter* spp. AgNOR. Objetiva 100x.....51

***Helicobacter* spp. em gatos: relação entre espécies infectantes, alterações histológicas e proliferação celular**

Tabela 1 – Frequência de escores de intensidade de colonização bacteriana na mucosa gástrica de gatos, de acordo com as regiões gástricas. Londrina, 2007.....72

Tabela 2 – Resultado das PCRs de *Helicobacter* spp. da mucosa gástrica de gatos. Londrina, 2007.....73

Tabela 3 – Lesões gástricas histológicas e sua frequência de acordo com as regiões de biópsia gástrica em gatos. Londrina, 2007.....77

Tabela 4 – Frequência das lesões gástricas histológicas em gatos de acordo com presença ou ausência de infecção por *Helicobacter* spp. Londrina, 2007.....77

Tabela 5 – Valores de média (\pm desvio padrão) da quantificação da proliferação celular de mucosa gástrica de cães negativos e positivos para *Helicobacter* spp., das regiões de antro, corpo e fundo, utilizando método histoquímico de AgNOR. Londrina, 2007.....79

Quadro 1 – Agentes estudados, referências, seqüências dos *primers* produtos amplificados [pares de base (pb)]. Londrina, 2007.....68

Quadro 2 – Condições de tempo e temperatura utilizadas nas PCRs para gênero *Helicobacter* e espécies de interesse do estudo. Londrina, 2007.....69

Figura 1 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato. A) Helicobactérias localizadas no interior de fóvea gástrica. B) Helicobactérias localizadas no interior de glândula gástrica e intracelular (setas). WS. Objetiva 100x. Londrina, 2007.....73

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA de *Helicobacter* spp. (399 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de gato. Canaleta 1: padrão molecular de

123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 a 8: amostras provenientes de gatos. Londrina, 2007.....74

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação do gene ureB de *Helicobacter heilmannii* (580 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de gato. Canaleta 1: padrão molecular de 123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaleta 4: amostra proveniente de gato. Londrina, 2007.....74

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação dos genes ureA e ureB de *Helicobacter felis* (241 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de cão. Canaleta 1: padrão molecular de 123 pb; canaleta 2: controle negativo; canaleta 3 a 6: amostras provenientes de gatos. Londrina, 2007.....74

Figura 5 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato infectado por *Helicobacter* spp. Nódulo linfóide. H.E. Objetiva 10x. Londrina, 2007.....78

Figura 6 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato infectado por *Helicobacter* spp. Erosão epitelial gástrica (seta). H.E. Objetiva 20x. Londrina, 2007.....78

Figura 7 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato infectado por *Helicobacter* spp. Infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração glandular e fibrose discreta em lâmina própria. H.E. Objetiva 40x. Londrina, 2007.....78

Figura 8 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato. A) Gato negativo para *Helicobacter* spp. B) Gato positivo para *Helicobacter* spp. AgNOR. Objetiva de 100x. Londrina, 2007.....80

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Geral.....	32
2.2 Específicos.....	32
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO.....	33
3.1 <i>Helicobacter</i> spp. em cães: relação entre espécies infectantes, alterações histológicas e proliferação celular.....	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
3.1.1 Introdução.....	36
3.1.2 Material e Métodos.....	37
3.1.2.1 Local.....	37
3.1.2.2 Animais / Amostras.....	37
3.1.2.3 Endoscopia e colheita de fragmentos da mucosa gástrica.....	38
3.1.2.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	39
3.1.2.5 Exames Histológico e Histoquímico.....	41
3.1.2.6 Análise estatística.....	42
3.1.3 Resultados.....	43
3.1.3.1 Warthin Starry.....	43
3.1.3.2 PCR.....	45
3.1.3.3 Alterações histológicas.....	47
3.1.3.4 Histoquímica: proliferação celular.....	50
3.1.4 Discussão.....	52
AGRADECIMENTO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

3.2 <i>Helicobacter</i> spp. em gatos: relação entre espécies infectantes, alterações histológicas e proliferação celular.....	63
RESUMO.....	63
ABSTRACT.....	64
3.2.1 Introdução.....	65
3.2.2 Material e Métodos.....	66
3.2.2.1 Local.....	66
3.2.2.2 Animais / Amostras.....	66
3.2.2.3 Endoscopia e colheita de fragmentos da mucosa gástrica.....	67
3.2.2.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	67
3.2.2.5 Exames Histológico e Histoquímico.....	69
3.2.2.6 Análise estatística.....	71
3.2.3 Resultados.....	72
3.2.3.1 Warthin Starry.....	72
3.2.3.2 PCR.....	73
3.2.3.3 Alterações histológicas.....	75
3.2.3.4 Histoquímica: proliferação celular.....	79
3.2.4 Discussão.....	80
AGRADECIMENTO.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
4 CONCLUSÕES.....	93
APÊNDICES.....	95
Apêndice A – Resultados tabulados de cães e gatos.....	96
ANEXOS.....	99
Anexo A – Lista de Reagentes.....	100
Anexo B – Soluções e Tampões.....	102
Anexo C – Protocolo de Técnicas.....	104

1 REVISÃO DE LITERATURA

Bactérias do gênero *Helicobacter* têm sido observadas desde o final do século XIX (BIZZOZERO, 1893), infectando o estômago de humanos e espécies animais como cães, gatos, furões, suínos, algumas espécies de macacos (HERMANNNS et al., 1995), tigres e onça parda (CATTOLI et al, 2000), golfinhos e baleias (HARPER et al., 2002), ursos polares (OXLEY et al., 2005) e coelhos (VAN DEN BULCK et al., 2005a). Foi primeiramente classificada como *Campylobacter* spp. por Warren e Marshall em 1983, estabelecendo-se taxonomicamente como *Helicobacter* spp. em 1989 baseado nas características morfológicas (OWEN, 1998). Bactérias espiraladas encontradas no estômago de cães e gatos foram denominadas como *Gastrospirillum hominis* por McNulty e colaboradores em 1989, pois já haviam sido observadas estruturas semelhantes na mucosa gástrica de humanos e que essa seria uma possível causa de gastrite crônica ativa (HEILMANN e BORCHARD, 1991).

As helicobactérias são espiraladas ou em forma de “S”, flageladas, algumas espécies têm fibrilas periplasmáticas (HERMANNNS et al. 1995); microaerófilas (OWEN, 1998; NEIGER e SIMPSON, 2000), gram negativas e produtoras de urease (HERMANNNS et al. 1995). Quando em cultivo *in vitro* e submetidas à temperatura de 37°C, crescem em três a cinco dias em média (OWEN, 1998), podendo demorar até 12 dias (JALAVA et al., 1998), sob pH do meio de cultura entre 5,5 a 8,5 (pH ótimo de 6,9 a 8,0), não resistindo a pH abaixo de 5,5 em crescimento *in vitro* (OWEN, 1998).

Até agora, há registro de 165 organismos com características típicas de *Helicobacter*, no entanto apenas 39 foram classificadas taxonomicamente (NCBI, 2007). Das espécies reconhecidas, foram encontradas em cães e gatos as seguintes espécies gástricas: *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. pylori*, “*Flexispira rappini*”; hepatobiliar: *H. bilis*, e intestinal: *H. pametensis* (NEIGER E SIMPSON, 2000). Recentemente foi isolada uma

espécie, até então denominada de *H. cynogastricus* da mucosa gástrica de cão, baseado na análise da sequência do 16S rRNA (VAN DEN BULCK et al., 2006). Podem ser encontradas helicobactérias intestinais como *H. cianaedi*, *H. fennelliae* e *H. canis*, e que foram descritas pela primeira vez associadas a doenças entéricas em homens homossexuais. Há citação de que a espécie *H. cianaedi* pode causar bacteremia, febre e leucocitose com trombocitopenia em humanos, sendo também encontrado em hamsters saudáveis. *H. pullorum* já foi encontrado no trato intestinal de pacientes humanos com gastroenterites e no fígado (OWEN, 1998). A espécie *H. heilmannii* é relatada em vários estudos, no entanto, ainda não foi classificada oficialmente (NCBI, 2007).

A infecção pela espécie *H. pylori*, descrita em humanos em 1983, apresenta grande importância na gastroenterologia desde então (NEIGER e SIMPON, 2000), por estar relacionada a patologias gástricas. Estima-se que 50% da população mundial esteja infectada (BROWN, 2000).

É sensível ao pH ácido do suco gástrico, e um dos fatores mais característicos da bactéria é sua capacidade na produção de urease, capaz de catalisar a uréia em amônia e bicarbonato, propiciando um meio alcalino, permitindo que a bactéria chegue até o muco gástrico (MARSHALL et al., 1987). Devido aos seus flagelos, possui a capacidade de motilidade e penetração no muco gástrico, migrando para as junções intercelulares, local de alta concentração de nutrientes, meio de microaerofilia e pH alcalino (HAZELL et al., 1986). O *H. pylori* pode se aderir na mucosa gástrica devido principalmente à BabA, uma adesina presente na sua superfície, tornando viável a penetração de produtos antigênicos nas células da mucosa e dificultando a sua eliminação pelo indivíduo infectado, resultando em resposta imune persistente (STABILE et al., 2005). O *H. pylori* ainda possui duas citotoxinas relacionadas à sua patogenia, que são a *cytotoxin-associated gene A* (CagA) e a *vacuolating-associated cytotoxin* (VacA). A CagA induz a produção de citocina (SHIMADA e TERANO,

1998), estimulando a proliferação celular, apoptose, motilidade celular bacteriana e expressão de resposta imune (BLASER e ATHERTON, 2004). Já a proteína VacA induz principalmente a vacuolização (LEUNK et al., 1998), e apoptose da célula epitelial (GALMICHE et al., 2000), além da imunomodulação (BLASER e ATHERTON, 2004). Em decorrência desses eventos a infecção bacteriana pode levar à ruptura da barreira mucosa gástrica e à indução de uma variedade de mediadores inflamatórios (TORRES et al., 2000) que intensificam a apoptose e o *turnover* celular. A intensidade da inflamação gástrica por *H. pylori* em humanos é decorrente de uma complexa interação entre as características do hospedeiro e dos fatores de virulência da helicobactéria, definindo dessa forma a extensão específica da infecção (DEL GIUDICE e MICHETTI, 2004).

Assim como o *H. pylori* em humanos, a espécie *H. mustelae* promove um quadro de gastrite, ulceração e neoplasia em furões (FOX et al., 1997; YAMAZAKI et al., 2002). À inoculação de *H. pylori*, foi observado desenvolvimento de inflamação gástrica em cães (RADIN et al., 1990), em cães beagles gnotobiotas (LEE et al., 1992) e em gatos (FOX et al., 1995). Com o intuito de obterem maiores informações na diversidade de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de cães, Buczolits e colaboradores (2003) analisaram quatro seqüências parciais de 16S rDNA de *Helicobacter* spp. de biópsias gástricas de quatro cães com *Helicobacter* spp. e constataram em dois animais a espécie *H. pylori* ou uma outra, até então desconhecida, geneticamente semelhante.

A espécie *H. heilmannii*, comumente encontrado em animais (PRIESTNALL et al., 2004), é encontrado em 0,25 a 4,0% dos pacientes humanos com gastrite (ANDERSEN et al., 1999; SVEC et al., 2000), sendo também apontado como agente carcinogênico em humanos (PRIESTNALL et al., 2004). Na espécie suína está relacionada à gênese de úlceras da *pars esophagea* (QUEIROZ et al., 1996). Em tigres, o *H. acinonychis* é causador de lesões gástricas (CATTOLI et al., 2000). Uma espécie de *Helicobacter* spp. geneticamente

semelhante ao *H. pylori* foi associada a lesões de ulceração gástrica em golfinhos (HARPER et al., 2000).

Há evidências de que 67 a 100% de cães e 90 a 100% dos gatos sadios albergam pelo menos uma espécie de *Helicobacter* spp. (NEIGER e SIMPSON, 2000). Embora estudos demonstrem os efeitos da infecção gástrica por determinadas espécies de *Helicobacter* spp. em cães e gatos, diferentemente dos seres humanos, a real patogenicidade não está bem elucidada.

As espécies como *H. felis*, *H. heilmannii* e *H. bizzozeronii* ou *H. salomonis*, que são maiores e mais espiraladas que o *H. pylori* (LEE e O'ROURKE, 1993) têm sido encontradas colonizando o estômago de cães, gatos e, com menor frequência, humanos (VAN DEN BULCK et al., 2005b). Recentemente foram detectadas as espécies *H. felis*, *H. salomonis*, "*H. heilmannii*" e *H. pullorum* / *H. rappini* em coelhos (VAN DEN BULCK et al., 2005a). No entanto, a relação entre a presença das helicobactérias em cães e gatos e as manifestações clínicas ainda não estão definidas, pois as mesmas são encontradas tanto em animais hígidos quanto naqueles com algum distúrbio gastrintestinal (HERMANNNS et al., 1995).

Geyer et al. (1993), na Alemanha, detectaram taxas de *Helicobacter* spp. em seu grupo de cães e gatos doentes de 73,8% (31/42) e 56,6% (34/60), respectivamente e outra de 41,4% (12/29) em população de gatos sadios. No Japão, Yamasaki et al. (1998) observaram uma ocorrência de 86% (18/21) e 90% (9/10) em cães e gatos sadios, respectivamente. Ainda nesse estudo, contataram uma taxa de 61% (34/56) e 64% (21/33) em cães e gatos com distúrbio gástrico. Papasouliotis et al. (1997) e Neiger et al. (1998) observaram uma taxa de infecção por helicobactéria gástrica em gatos sadios de 100% (n=54) e 84,5% (49/58), respectivamente. Mais recentemente na Bélgica, foram relatadas taxas de infecção de 83% (91/110) em cães e 86% (37/43) em gatos (VAN DEN BULCK et al., 2005b). Camargo

(2002), no Brasil, estudando cães e gatos com sinais clínicos gástricos, constatou uma ocorrência de 9/14 cães e 5/5 gatos.

Em humanos, sabe-se que a infecção por *H. pylori* está relacionada a gastrites, úlceras pépticas, adenocarcinomas e linfoma do tecido linfóide associado da mucosa gástrico (MALT) (WACK et al., 1997; YAMAZAKI et al. 2002). Alguns autores vêm tentando determinar os tipos de lesões gástricas presentes em cães e gatos infectados por *Helicobacter* spp. Com esse intuito, Hermanns et al. (1995) listaram como mais frequentes a degeneração glandular com acúmulo de linfócitos e neutrófilos, fibrose e edema da lâmina própria, presença de folículos linfóides e de infiltrados inflamatórios. Camargo em 2002 observou infiltrado inflamatório de graus variados em cães e gatos infectados e não infectados, não resultando correlação entre as variáveis; não foram listadas as demais lesões histológicas gástricas. Straubinger et al. (2003) observaram infiltrado inflamatório e fibrose da lâmina própria mais intensos e número e tamanho maiores de nódulos linfóides em gatos infectados naturalmente por *H. pylori* do que o visto em gatos não infectados, embora não houvesse correlação entre intensidade de colonização e inflamação gástrica, atrofia ou fibrose.

Outra importante alteração relacionada à infecção por *H. pylori* em humanos é a proliferação de células epiteliais gástricas (ROKKAS et al., 1999; MISRA et al., 2000; DE FREITAS et al. 2004), semelhante ao observado em gerbils inoculados com *H. felis* e *H. bizzozeronii* (DE BOCK et al., 2006).

O modo de transmissão do *Helicobacter* spp. ainda é incerto, mas aponta-se que o fecal-oral seja o principal, já que *H. pylori* foi isolado de fezes de homem e gato. Este modo de transmissão tem maior importância em países em desenvolvimento, devido às condições sanitárias precárias. Outro meio de transmissão descrito é o oral-oral, pois já se encontrou *Helicobacter* spp. na saliva, placa dentária e secreções gástricas de humanos (NEIGER e SIMPSON, 2000) e cães. Esse estudo em cães demonstrou uma prevalência de 71,1% de

DNA de *Helicobacter* spp. na cavidade oral de uma determinada população de cães na Itália (RECORDATI et al., 2007). Há ainda citações de que a água e vegetais lavados com água contaminada seriam uma via de transmissão (HOPKINS et al., 1993).

Assim como os humanos que são infectados por *H. pylori* ainda na infância (MITCHELL et al., 1993), os cães adquirem infecção por *Helicobacter* spp. ainda muito jovens, já no período de amamentação, pelo próprio comportamento da espécie, sendo a mãe a fonte de infecção. Ainda, os filhotes podem transmitir uns aos outros pelo contato próximo (HÄNNINEN et al., 1998).

O potencial zoonótico e a importância dos animais como reservatórios naturais da doença ainda não estão bem esclarecidos (EL-ZAATARI et al., 1997). Considerando-se que já foi encontrado *H. pylori* na mucosa gástrica de gatos (HANDT et al., 1994 e CAMARGO, 2002), esses podem ser considerados fonte de infecção para o homem, e a transmissão, nesse caso seria via oral-oral, pelo contato próximo entre as espécies ou via fecal-oral, por já ter sido encontrado *H. pylori* em fezes de gatos (HANDT et al., 1994). Em furões já se encontrou *H. mustelae* viável em suas fezes, tornando um risco também para os humanos (FOX et al., 1992).

No caso da espécie *H. heilmannii*, comprovadamente patogênica para o ser humano (DIETERICH et al., 1998) e encontrada em cães, gatos e suínos, supõe-se implicações na saúde pública. Um estudo realizado com gatos oriundos dos EUA e Alemanha e cães da Dinamarca demonstrou que cães e gatos infectados por *H. heilmannii* oferecem um risco zoonótico pequeno, já que os humanos geralmente são infectados por um subtipo (1) diferente do comumente observado em cães e gatos (subtipo 2 e 4). No entanto, os suínos representam um risco maior, devido a elevada frequência de infecção pelo subtipo 1 (PRIESTNALL et al., 2004). Lopez et al. (1993), Sykora et al. (2003) e Kato et al. (2005) relataram a ocorrência de *H. heilmannii* em crianças que não tinham contato com animais

domésticos. Mas, Thomson et al. (1994) e Van Loon et al. (2003) reportaram *H. heilmannii* em crianças e em seus animais de companhia. De acordo com os resultados obtidos por De Groote et al. (2005) e Van den Bulck et al. (2005b) o contato com cães, gatos e suínos pode ser considerado fator de risco para os humanos na aquisição de infecção por *Helicobacter* não-*pylori*.

O diagnóstico da infecção por *Helicobacter* spp. pode ser feito por meio do teste rápido da urease (OTTO et al., 1994), sorologia, teste respiratório (NEIGER et al., 1998), técnicas tintoriais para citologia e histopatologia (HAPPONEN et al., 1996; SIMPSON et al., 1999), cultivo microbiológico, microscopia eletrônica (HANDT et al., 1994; HAPPONEN et al., 1996) e PCR (NEIGER e SIMPSON, 2000).

Devido à distribuição do *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica das diferentes espécies de animais não ser homogênea em toda sua extensão, sendo necessária durante a gastroscopia a colheita de vários fragmentos da mucosa nas biópsias, ou combinação de métodos diagnósticos (DEBONGNIE et al., 1995).

O teste rápido da urease revela a urease produzida pelas bactérias desse gênero (KATELARIIS et al., 1992) e, embora necessite de um fragmento da mucosa gástrica, é fácil de ser realizado, rápido e de baixo custo. A citologia por escovação da mucosa é um método bastante sensível na visualização dessas bactérias, além de ser um teste rápido e barato (HAPPONEN et al., 1996). Já a histopatologia possibilita, além da identificação da bactéria, a avaliação da amostra tecidual de acordo com a técnica de coloração indicada (JALAVA et al., 1997). A técnica de Warthin Starry tem sido considerada a melhor para a identificação desses organismos espiralados (STEVENS, 1990); outros métodos como Giemsa (GODDARD et al., 1997), Gram (YAMASAKI et al., 1998; NEIGER et al., 1998) e coloração de Steiner (GARVEY et al., 1985) também são relatados como efetivos. Happonen e colaboradores (1996) utilizaram hematoxilina-eosina (H.E.), porém não obtiveram sucesso em todos os

casos. O cultivo microbiológico tem se mostrado um método problemático, pois são bactérias muito exigentes quanto às condições de cultivo (JALAVA et al., 1997), além de que algumas espécies usualmente encontradas em animais e eventualmente no homem, como *H. heilmannii*, dificilmente serem cultivadas (NORRIS et al., 1999). Embora essas bactérias tenham sido descritas há muitas décadas, a espécie *H. pylori* não havia sido cultivada a partir de amostra gástrica do homem até 1982 (WARREN e MARSHALL, 1983), e a primeira helicobactéria em animais a ser cultivada foi a *H. felis* em gatos (LEE et al., 1988).

As bactérias do gênero *Helicobacter* spp. podem ser vistas por meio da microscopia eletrônica. Essa técnica revela sua morfologia típica helicoidal e características peculiares de cada espécie (HANDT et al., 1994). As provas de biologia molecular, como a PCR oferecem grande sensibilidade e especificidade, além de serem mais rápidas que o cultivo microbiológico, possibilitando ainda a identificação da espécie infectante. A sensibilidade da PCR pode ser aumentada utilizando-se a técnica de nested-PCR (BAMFORD et al., 1998).

Em humanos são utilizadas as técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas para avaliação do efeito do *H. pylori* na proliferação celular (DE FREITAS et al., 2004). A técnica histoquímica *Argyrophil Nucleolar Organizer Regions* (AgNOR) evidencia essas unidades funcionais do nucléolo onde estão localizados todos os componentes necessários para a síntese do rRNA. Duas proteínas argirofílicas (nucleolina e nucleofosmina) envolvidas na transcrição e processo do rRNA estão associadas na fase de interfase da mitose. Essas proteínas são facilmente marcadas pelo nitrato de prata, promovendo a visualização dessa fase à microscopia óptica, tanto nas preparações citológicas quanto histopatológicas de rotina. O número dessas regiões está estritamente relacionado à atividade de transcrição das células em proliferação e daquelas em que estão sofrendo rápida proliferação celular (DERENZINI, 2000). A análise qualitativa (parâmetros morfométricos e morfológicos) das NORs,

demonstra que em lesões malignas, além de em maior número, as NORs (regiões organizadoras de nucléolos) estão diminuídas de tamanho, dispersas pelo núcleo e com forma e contornos irregulares (CABRINI et al., 1992). Esse método foi utilizado com sucesso por Steininger e colaboradores, em 1995, que relataram que o número de NORs aumenta de acordo com a gravidade da lesão gástrica (de mucosa normal a crescentes graus de inflamação, metaplasia, displasia a adenocarcinoma), podendo contribuir no prognóstico da doença. Mais recentemente, em 2000, Misra e colaboradores na Índia, demonstraram também uma relação direta entre o grau de lesão na mucosa gástrica e a infecção por *H. pylori*. Os autores enfatizaram a participação da bactéria como agente promotor da carcinogênese por estimular a proliferação celular durante a inflamação crônica, sujeitando essas células a agentes neoplásicos endógenos e exógenos. Sabe-se ainda que o subtipo *H. pylori* CagA(+) induz maior proliferação celular que *H. pylori* CagA(-) e em pacientes livres da infecção (ROKKAS et al., 1999; DE FREITAS et al., 2004).

Utilizando outra metodologia para avaliação da proliferação celular, o PCNA, Liu et al. (1998) analisaram o efeito do *H. pylori* na proliferação epitelial gástrica na progressão de mucosa gástrica normal a carcinoma gástrico, e também observaram um aumento na proliferação celular e, ainda sugeriram a técnica como indicadora na avaliação de risco de carcinogênese gástrica.

Não se encontrou na literatura estudo de proliferação celular da mucosa gástrica em cães e gatos utilizando a técnica de AgNOR. Em suínos, Preziosi et al. (2000) avaliaram por meio da técnica de AgNOR a patogênese das lesões da *pars esophagea*, e concluíram que a proliferação celular foi um evento prévio de lesões de degeneração e ulceração dessa região, apresentando dessa forma um desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose. A técnica de AgNOR já foi utilizada como meio auxiliar para estimar um prognóstico mais objetivo para mastocitomas em cães (RECH et al., 2004), além de ter sido apontada como de fácil execução

e baixo custo. Já Rassnick et al. (1999) não puderam afirmar o mesmo na tentativa de determinar um valor prognóstico para linfoma intestinal em gatos. Na Polônia, Sapierski e Malicka (2004) utilizaram um método imunoistoquímico para investigar a expressão antigênica do Ki-67 (MIB-1) na mucosa gástrica de cães, e determinaram que tanto a presença do *Helicobacter* spp. quanto o infiltrado inflamatório promovem uma proliferação celular mais pronunciada em regiões de antro e corpo gástricos.

A obtenção de resultados por meio de diferentes métodos diagnósticos e pesquisa será de grande valia para o entendimento da real fisiopatologia de infecções por *Helicobacter* spp. em animais, sendo possível estabelecer o uso dos mesmos como modelos experimentais, levando à proposição de protocolos terapêuticos mais eficazes e profilaxia.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, L.P.; BOYE, K.; BLOM, J.; HOLCK, S.; NORGAARD, A.; ELSBORG, L. Characterization of a culturable “*Gastrospirillum hominis*” (*Helicobacter heilmannii*) strain isolated from human gastric mucosa. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1069-1076, 1999.
- BAMFORD, K.B.; LUTTON, D.A.; O’LOUGHLIN, B.; COULTER, W.A.; COLLINS, J.S. Nested primers improve sensitivity in the detection of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. **The Journal of Infection**, v.36, p.105-110, 1998.
- BIZZOZERO, G. Sulla presenza di batteri nelle ghiandole gastriche del cane (in Italian). **Atti della Reale Accademia delle Scienze di Torino**, v.28, p.249, 1893.
- BLASER, M.J.; ATHERTON, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.113, p.321-333, 2004.
- BROWN, L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiology Reviews**, v.22, p.283-297, 2000.
- BUCZOLITS, S.; REINHARD, H.; ROSENGARTEN, R.; BUSSE, H.-J. PCR-based genetic evidence for occurrence of *Helicobacter pylori* and novel *Helicobacter* species in the canine gastric mucosa. **Veterinary Microbiology**, v.95, p.259-270, 2003.
- CABRINI, R.L.; SCHWINT, A.E.; MENDEZ, A.; FEMOPASE, F.; LANFRANCHI, H.; ITOIZ, M.E. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v.21, p.275-279, 1992.
- CAMARGO P.L. Identificação das espécies de *Helicobacter* spp. presentes na mucosa gástrica de cães, gatos e seres humanos, e sua correlação com as alterações da mucosa. 112 f. **Tese de doutorado**. Clínica Médica, Clínica Veterinária. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- CATTOLI, G.; BART, A.; KLAVER, P.S.J.; ROBIJN, R.J.; BEUMER, H.J.; VAN VUGT, R.; POT, R.G.J.; VAN DER GAGG, I.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; KUIPERS, E.J.; KUSTERS, J.G. *Helicobacter acinonychis* eradication leading to the resolution of gastric lesions in tigers. **The Veterinary Record**, n.147, p.164-165, 2000.
- DE BOCK, M.; D’HERDE, K.; DUCHATEAU, L.; HELLEMANS, A. ; DECOSTERE, A. ; HAESBROUCK, F. ; DUCATELLE, R. The effect of *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii* on the gastric mucosa in mongolian gerbils: a sequential pathological study. **Journal of Comparative Pathology**, v.135, p.226-236, 2006.
- DEBONGNIE, J.C.; DONNAY, M.; MAIRESSE, J. *Gastrospirillum hominis* (“*Helicobacter heilmannii*”): a cause of gastritis; sometimes transient; better diagnosed by touch cytology? **The American Journal of Gastroenterology**, v.90, p.411-416, 1995.

DE FREITAS, D.; URBANO, M.; GOULAO, M.H.; DONATO, M.M.; BALDAIA, C.; MARTINS, M.I.; SOUTO, P.; GREGORITO, C.; FIGUEIREDO, P.; GOUVEIA, H.; ROMAOZINHO, J.M. The effects of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. **Hepatogastroenterology**, v.51, p.876-882, 2004.

DE GROOTE, D.; VAN DOORN, L.-J.; VAN DEN BULCK, K.; BAÑADME, P.; VIETH, M.; STOLTE, M.; DEBONGNIE, J.-C.; BURETTE, A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Detection of non-*pylori Helicobacter* species in “*Helicobacter heilmannii*”-infected humans. **Helicobacter**, v.10, n.5, p.398-406, 2005.

DEL GIUDICE, G.; MICHETTI, P. Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.9 (Suppl.), p.23-28, 2004.

DERENZINI I. M. The AgNORs. **Micron**, v.31, n.2, p.117-120, 2000.

DIETERICH, C.; WIESEL, P.; NEIGER, R.; BLUM, A.; CORTHÉSY-THEULAZ, I. Presence of multiple “*Helicobacter heilmannii*” strains in an individual suffering from ulcers and in his two cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.5, p.1366-1370, 1998.

EL-ZAATARI, F.A.; WOO, J.S.; BADR, A.; OSATO, M.S.; SERNA, H.; LICHTENBERGER, L.M.; GENTA, R.M.; GRAHAM, D.Y. Failure to isolate *Helicobacter pylori* from stray cats indicates that *H. pylori* in cats may be an anthroponosis – an animal infection with a human pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v.46, p.372-376, 1997.

FOX, J.G.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; TAYLOR, N.S.; YAN, L.L.; MACUCH, P.J.; CHMURA, L.M. *Helicobacter mustelae* isolation from fezes of ferrets: evidence to support fecal-oral transmission of a gastric helicobacter. **Infection and Immunity**, v.60, p. 606-611, 1992.

FOX, J.G.; BATCHELDER, M.; MARINI, R.; YAN, L.; HANDT, L.; LI, X.; SHAMES, B.; HAYWARD, A.; CAMPBELL, J.; MURPHY, J.C. *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. **Infection and Immunity**, v.63, p.2674-2681, 1995.

FOX, J.G.; DANGLER, C.A.; SAGER, W.; BORKOWSKI, R.; GLIATTO, J.M. *Helicobacter mustelae*-associated gastric adenocarcinoma in ferrets (*Mustela putorius furo*). **Veterinary Pathology**, v.34, p.225-229, 1997.

GALMICHE, A.; RASSOW, J.; DOYE, A.; CAGNOL, S.; CHAMBARD, J.C.; CONTAMIN, S.; DE THILLOT, V. ; JUST, I. ; RICCI, V. ; SOLCIA, E.; VAN OBBERGHEN, E.; BOQUET, P. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome *c* release. **The EMBO Journal**, v.19, p.6361-6370, 2000.

GARVEY, W.; FATHI, A.; BIGELOW, F. Modified Steiner for the demonstration of spirochetes. **Journal of Histotechnology**, v.8, p.15-17, 1985.

GEYER, C.; COLBATZKY, F.; LECHNER, J.; HERMANN, W. Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. **The Veterinary Record**, v.133, p.18-19, 1993.

GODDARD, A.; LOGAN, R.P.H.; ATHERTON, J.C.; JENKINS, D.; SPILLER, R.C. Healing of duodenal ulcer after eradication of *Helicobacter heilmannii*. **The Lancet**, v.349, n.9068, 1997.

HANDT, L.K.; FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; FRASER, G.J.; PASTER, B.J.; YAN, L.L.; ROZMIAREK, H.; RUFO, R.; STALIS, I.H. *Helicobacter pylori* isolated from domestic cat: public health implications. **Infection and Immunity**, v.62, p.237-2374, 1994.

HÄNNINEN, M.-L.; HAPPONEN, I.; JALAVA, K. Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies. **Veterinary Microbiology**, v.62, p.47-58, 1998.

HAPPONEN, I.; SAARI, S.; CASTREN, L.; TYNI, O.; HÄNNINEN, M.-L.; WESTERMARCK, E. Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, v.115, p.117-127, 1996.

HARPER, C.M.G.; DANGLER, C.A.; XU, S.; FENG, Y.; SHEN Z., SHEPPARD, B.; STAMPER, A.; DEWHIRST, F.E., PASTER, B.J.; FOX, J.G. Isolation and characterization of a *Helicobacter* sp. from the gastric mucosa of dolphins, *Lagenorhynchus acutus* and *Delphinus delphinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.11, p.4751-4757, 2000.

HARPER, C.M.G.; FENG, Y.; XU, S.; TAYLOR, N.S.; KINSEL, M.; DEWHIRST, F.E., PASTER, B.J.; GREENWELL, M.; LEVINE, G.; ROGERS, A.; FOX J.G. *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.12, p.4536-4543, 2002

HAZELL, S.L.; LEE, A.; BRADY, L.; HENNESSY, W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus at important factors in colonization of the gastric epithelium. **The Journal of Infectious Disease**, v.153, p.658-663, 1986.

HEILMANN, K.L.; BORCHARD, F. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical; histological; and ultrastructural findings. **Gut**, v.32, n.2, p.137-140, 1991.

HERMANN, W.; KREGEL, K.; BREUNER, W.; LECHNER, J. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, v.112, p.307-18, 1995.

HOPKINS, R.J.; VIAL, P.A.; FERRECCIO, C.; OVALLE, J.; PRADO, P.; SOTOMAYOR, V.; RUSSEL, R.G.; WASSERMAN, S.S.; MORRIS, J.G. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. **The Journal of Infectious Disease**, n.168, p.222-226, 1993.

JALAVA, K.; KAARTINEN, M.; UTRIAINEN, M.; HAPPONEN, I.; HÄNNINEN, M.-L. *Helicobacter salomonis* sp. nov.; a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis*; and *Helicobacter bizzozeronii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.975-982, 1997.

JALAVA, K.; ON, S.L.W.; VANDAMME, P.A.R.; HAPPONEN, I.; SUKURA, A.; HÄNNINEN, M-L. Isolation and identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.10, p.3998-4005, 1998.

KATELARIS, P.H.; LOWE, D.G.; NORBU, P.; FARTHING, M.J.G. Field evaluation of a rapid, simple and inexpensive urease test for detection of *Helicobacter pylori*. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.7, p.569-571, 1992.

KATO, S.; OZAWA, K.; SEKINE, H.; OHYAUCHI, M.; SHIMOSEGAWA, T.; MINOURA, T.; IINUMA, K. *Helicobacter heilmannii* infection in a child after successful eradication of *Helicobacter pylori*: case report and review of literature. **Journal of Gastroenterology**, v.40, p.94-97, 2005.

LEE, A.; HAZELL, S.L.; O'ROURKE, J.; KOUPRACH, S. Isolation of spiral-shaped bacterium from the cat stomach. **Infection and Immunity**, v.56, p.2843-2850, 1988.

LEE, A.; KRAKOWKA, S.; FOX, J.G.; OTTO, G.; EATON, K.A.; MURPHY, J.C. Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. **Veterinary Pathology**, v.29, p.487-494, 1992.

LEE, A.; O'ROURKE, J. Gastric bacteria other than *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.22, p.21-42, 1993.

LEUNK, R.D.; JOHNSON, P.T.; DAVID, B.C.; KRAFT, W.G.; MORGAN, D.R. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pyloridis*. **Journal of Medical Microbiology**, v.26, p.93-98, 1998.

LIU, W.-Z.; ZHENG, X.; SHI, Y.; DONG, Q.-J.; XIAO, S.-D. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial proliferation in progression from normal mucosa to gastric carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v.4, p.246-248, 1998.

LOPEZ, H.A.; TAMAYO, M.C.; MEJIA, G.I.; TRUJILLO, H.; ESPINAL, D.; PEREZ, M.; ROBLEDO, J.A. *Gastrospirillum hominis* in a child with chronic gastritis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.12, p.701-702, 1993.

MARSHALL, B.J.; BARRET, L.; PRAKASH, C.; McCALLUM, R.W.; GUERRANT, R.L. Survival of *Campylobacter pylori* associated gastritis and peptic ulcer disease at acid pH. **Gastroenterology**, v.92, p.1517 (abstract), 1987.

McNULTY, C.A.M.; DENT, J.C.; CURRY, A.; UFF, J.S.; FORD, G.A.; GEAR, M.W.L.; WILKINSON, S.P. New spiral bacterium in gastric mucosa. **Journal of Clinical Pathology**, v.42, p.585-591, 1989.

MISRA, V.; BISHT, D.; MISRA, S.P.; DWIVEDI, M.; BHATIA, R. Argyrophilic nucleolar organizer regions in *Helicobacter pylori*-associated gastric lesions. **Acta Pathologica; Microbiologica; et Immunologica Scandinavica**, v.108, p.448-452, 2000.

MITCHELL, H.M.; BOHANE, T.; HAWKES, R.A.; LEE, A. *Helicobacter pylori* infection within families. **International Journal of Medical Microbiology**, v.280, p.128-136, 1993.

NCBI – Taxonomy Browser. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=209>> . Acesso em: 10 mar. 2007.

NEIGER R.; DIETERICH, C.; BURNENS, A.; WALDVOGEL A.; CORTHÉSY-THEULAZ, I.; HALTER, F.; LAUTERBURG, B.; SCHMASSMANN, A. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.3, p.634-637, 1998.

NEIGER, R.; SIMPSON, K.W. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, p.125-33, 2000.

NORRIS, C.R.; MARKS, S.L.; EATON, K.A.; TORABIAN, S.Z.; MUNN, R.J.; SOLNICK, J.V. Healthy cats are commonly colonized with “*Helicobacter heilmannii*” that is associated with minimal gastritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.1, 189-194, 1999.

OTTO, G.; HAZELL, S.; FOX, J.G.; HOWLETT, C.R.; MURPHY, J.C.; O’ROURCKE, J.L.; LEE, A. Animal and public health implications of gastric colonization of cats by *Helicobacter*-like organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1043-1049, 1994.

OXLEY, A.P.; ARGO, J.A.; McKAY, D.B. *Helicobacter* spp. from captive bottlenose dolphins (*Tursiops* spp.) and polar bears (*Ursus maritimus*). **Veterinary Journal**, v.170, n.3, p.77-80, 2005.

OWEN, R.J. *Helicobacter* – species classification and identification. **British Medical Bulletin**, v.54, n.1, p.17-30, 1998.

PAPASOULIOTIS, K.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; WERRETT, G.; BROWN, P.J.; PEARSON, G.R. Occurrence of ‘gastric *Helicobacter*-like organisms’ in cats. **The Veterinary Record**, v.140, p.369-370, 1997.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; MARCATO, P.S. Cell proliferation and apoptosis in the pathogenesis of oesophagogastric lesions in pigs. **Research in Veterinary Science**, v.68, p.189-196, 2000.

PRIESTNALL, S.L.; WIINBERG, B.; SPOHR, A.; NEUHAUS, B.; KUFFER, M.; WIEDMANN, M.; SIMPSON, K.W. Evaluation of “*Helicobacter heilmannii*” subtypes in the gastric mucosae of cats and dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.5, p.2144-2151, 2004.

QUEIROZ, D.M.; ROCHA, G.A.; MENDES, E.N.; DEMOURA, S.B.; OLIVEIRA, A.M.; MIRANDA, D. Association between helicobacter and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. **Gastroenterology**, v.111, n.1, p.19-27, 1996.

RADIN, M.J.; EATON, K.A.; KRAKOWKA, S.; MORGAN, D.R.; LEE, A.; OTTO, G.; FOX, J. *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic Beagle dogs. **Infection and Immunity**, v.58, p.2606-2612, 1990.

RASSNICK, K.M.; MAULDIN, G.N.; MOROFF, S.D.; MAULDIN, G.E.; McENTEE, M.C.; MOONEY, S.C. Prognostic value of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in feline intestinal lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, n.3, p.187-90, 1999.

RECH, R.R.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; SALLIS, E.S.V.; RAFFI, M.B.; GARMATZ, S.L. Canine cutaneous mast cell tumor. Study of 45 cases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p.441-448, 2004.

RECORDATI, C.; GUALDI, V.; TOSI, S.; FACCHINI, R.V.; PENGO, G.; LUINI, M.; SIMPSON, K.W.; SCANZIANI, E. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. **Veterinary Microbiology**, v.119, n.2-4; p.346-351; 2007.

ROKKAS, T.; LADAS, S.; LIASOS, C.; PETRIDOU, E.; PAPTAEODOROU, G.; THEOCHARIS, S.; KARAMERIS, A.; RAPTIS, S. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. **Digestive Diseases and Sciences**, v.44, 487-493, 1999.

SAPIERZYNSKI, R.; MALICKA, E. Effect of gastric *Helicobacter*-like organisms on gastric epithelial cell proliferation rate in dogs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.7, n.4, p.275-281, 2004.

SHIMADA, T.; TERANO, A. Chemokine expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. **Journal of Gastroenterology**, v.33, p.613-617, 1998.

SIMPSON, K.W.; STRAUSS-AYALI, D.; McDONOUGH, P.L.; CHANG, Y.-F., VALENTINE, B.A. Gastric function in dogs with naturally acquired gastric *Helicobacter* spp. infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, p.507-515, 1999.

STABILE, B.E.; SMITH, B.R.; WEEKS, D.L. *Helicobacter pylori* infection and surgical disease - Part I. **Current Problems in Surgery**, v.42, p.756-789, 2005.

STEININGER, H.; STREITBERG, U.v.; WUNDER, I.; FALLER, G.; KIRCHNER, T. Inflammatory, preneoplastic, and neoplastic changes of the gastric mucosa. **General and Diagnostic Pathology**, v.141, p.15-19, 1995.

STEVENS, A. Micro-organisms. In: **Theory and Practice of Histological Techniques**, 3.ed., J.D. Bancroft and A. Stevens, Eds, Churchill Livingstone, New York, pp.289-308, 1990.

STRAUBINGER, R.K.; GREITER, A.; McDONOUGH, S.P.; GEROLD, A.; SCANZIANI, E.; SOLDATI, S.; DAILIDIENE, D.; DAILIDE, G.; BERG, D.E.; SIMPSON, K.W. Quantitative evaluation of inflammatory and immune responses in the early stages of chronic *Helicobacter pylori* infection. **Infection and Immunity**, v.71, n.5, p.2693-2703, 2003.

SVEC, A.; KORDAS, P.; PAVLIS, Z.; NOVOTNY, J. High prevalence of *Helicobacter heilmannii*-associated gastritis in a small; predominantly rural area: further evidence in support of a zoonosis? **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.35, p.925-928, 2000.

SYKORA, J.; HEJDA, V.; VARVAROVSKA, J.; STOZICKY, F.; GOTTRAND, F.; SIALA, K. *Helicobacter heilmannii*-related gastric ulcer in childhood. **Journal of Pediatric Gastroenterology**, v.36, p.410-413, 2003.

THOMSON, M.A.; GREER, R.; CLEGHORN, G.J.; STOREY, P. Canine-human transmission of *Gastrospirillum homonis*. **Lancet**, v.343, p.1605-1607, 1994.

TORRES, J.; PEREZ-PEREZ, G.; GOODMAN, K.J.; ATHERTON, J.C.; GOLD, B.D.; HARRIS, P.R.; IA GARZA, A.M.; GUARNER, J.; MUNOZ, O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. **Archives of Medical Research**, v.31, p.431-469, 2000.

VAN DEN BULCK, K.; BAELE, M.; HERMANS, K.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F.; DECOSTERE, A. First report on the occurrence of "*Helicobacter heilmannii*" in the stomach of rabbits. **Veterinary Research Communications**, v29, p.271-279, 2005a.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; DRIESSEN, A.; DEBONGNIE, J.-C.; BURETT, A.; STOLTE, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. **Journal of Clinical Microbiology**, n.43, v.5, p.2256-2260, 2005b.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; VANDAMME, P.; MAST, J.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, n.7, p.1559-64, 2006.

VAN LOON, S.; BART, A.; Den HERTOOG, E.J.; NIKKELS, P.J.G.; HOUWEN, R.H.J.; DE SCHRYVER, J.E.A.R.; OUDSHOORN, J.H. *Helicobacter heilmannii* gastritis caused by cat to child transmission. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutritional**, v.36, p.407-409, 2003.

WACK, R.F.; EATON, K.A.; KRAME, L.W. Treatment of gastritis in cheetahs (*Acinonychis jubatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, n.28, v.3, p.260-266, 1997.

WARREN, J.R.; MARSHALL, B. Unidentified curver bacilli on gastric epithelium active chronic gastritis. **Lancet**, i., p.1273-1275, 1983.

YAMASAKI, K.; SUEMATSU, H.; TAKAHASHI, T. Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.212, n.4, p.529-533, 1998.

YAMAZAKI, Y.; AONO, I.; OHYA, T.; SHIBAHARA, T.; KADOTA, K. Gastroduodenal adenocarcinomas and rectal adenoma in a cougar (*Felis concolor*) infected with *Helicobacter*-like organisms and spirochetes. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.64, n.2, p.149-153, 2002.

2.1. Objetivo Geral

- Analisar a participação de *Helicobacter* spp. na patogênese das alterações teciduais gástricas de cães e gatos.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar a presença de bactérias espiraladas por meio de exame histológico;
- Identificar o gênero *Helicobacter* e quatro espécies de helicobactérias pela técnica da PCR;
- Correlacionar a presença de *Helicobacter* spp. com alterações histopatológicas na mucosa gástrica de cães e gatos;
- Comparar os índices de proliferação celular na presença ou não de *Helicobacter* spp. gástrica utilizando método histoquímico (AgNOR).

3.1 *Helicobacter* spp. em cães: relação entre espécies infectantes, alterações histológicas e proliferação celular

RESUMO

As helicobactérias têm sido observadas infectando a mucosa gástrica de animais desde o século XIX. A patogenicidade do *Helicobacter* spp. em cães ainda não está bem elucidada, embora apresente prevalência que varia entre 67 a 100%. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a ocorrência de *Helicobacter* spp. em cães domiciliados, relacionar as espécies infectantes com alterações gástricas histológicas e proliferação celular. Neste estudo, 37 cães domiciliados foram submetidos à gastroscopia e biópsia gástrica de antro pilórico, corpo e fundo. As amostras foram submetidas às técnicas de Warthin Starry e PCR para identificação de helicobactéria; ao exame histológico para avaliar as lesões da mucosa gástrica e ainda à técnica de AgNOR para comparar os índices de proliferação celular. Foi observado *Helicobacter* spp. em 75,7% (28/37) das amostras pela técnica de WS e 73,0% (27/37) pela PCR. Foram identificadas as espécies *H. heilmannii* (5/27), *H. felis* (7/27) e *H. bizzozeronii* ou *H. samolonis* (10/27), além de infecções mistas (6/27). Nenhum dos animais apresentou infecção por *H. pylori*. Treze cães foram positivos para gênero, e negativos para as espécies testadas. Infiltrado inflamatório mononuclear foi observado em 78% das amostras; lesões como fibrose da lâmina própria e degeneração glandular estavam presentes em 30 (81%) e 25 (68%) animais, respectivamente, sem estarem associadas à infecção por *Helicobacter* spp. Notou-se que nos animais avaliados não houve relação entre infecção e infiltrado inflamatório ou outras lesões. Os cães infectados apresentaram médias de proliferação celular maior que os não infectados ($p \leq 0,05$).

Palavras-chave: *Helicobacter* spp., lesões gástricas, cães, proliferação celular

ABSTRACT

Helicobacters have been observed infecting gastric mucosa of the animals since the 19th century. The *Helicobacter* spp. pathogenicity is not yet clear in dogs, although the prevalence varies from 67 to 100%. The objectives of this study were to evaluate the association of *Helicobacter* spp. infection in gastric mucosa of domiciled dogs with histological gastric lesions and cellular proliferation. In this study, 37 domiciled dogs were submitted to gastroscopy and gastric biopsy of pyloric antrum, corpus and fundus. The samples were submitted to Warthin Starry and PCR techniques for the identification of helicobacteria, histological exam to evaluate the gastric mucosa lesions, and AgNOR technique to compare cellular proliferation tax. An occurrence of 75,7% (28/37) of *Helicobacter* spp. by WS technique and 73,0% (27/37) by PCR was observed. *H. heilmannii* (5/27), *H. felis* (7/27) and *H. bizzozeronii* or *H. salomonis* (10/27) and also mixed infections (6/27) were identified. None the animals showed *H. pylori* infection. Thirteen dogs were positive in genus, and negative for the tested species. Inflammatory infiltrate were observed in 78% of the samples; lesions like fibrosis in the lamina propria and glandular degeneration were present in 30 (81%) and 25 (68%) of the animals, respectively, without association *Helicobacter* spp. infection. It has been noticed that in the evaluated animals had no relation between infection and inflammatory infiltrate or others lesions, although the infected dogs presented cellular proliferation indices greater than the not infected.

Key-words: *Helicobacter* spp., gastric lesions, dogs, cellular proliferation

3.1.1 INTRODUÇÃO

Helicobacter spp. são bactérias microaerófilas (OWEN, 1998; NEIGER e SIMPSON, 2000), gram negativas, flageladas e urease positivas (HERMANNNS et al. 1995) e têm sido descritas colonizando o estômago de cães desde o século XIX (BIZZOZERO, 1893). As helicobactérias encontradas em cães são consideradas “grandes helicobactérias”, pois medem de 5-15 µm de comprimento (JALAVA et al., 1997) e são morfologicamente distintas do *H. pylori*. A espécie *H. heilmannii*, comumente encontrada em animais, apresenta prevalência de 0,2 a 4,0% em pacientes humanos com gastrite e tem sido considerada como agente carcinogênico nesta espécie (JALAVA et al., 2001; PRIESTNALL et al., 2004). Três outras espécies de *Helicobacter* spp. têm sido cultivadas da mucosa gástrica de cães: *H. felis*, *H. bizzozeronii* e *H. salomonis* (HÄNNINEN et al., 1996; JALAVA et al., 1997). O contato com cães foi apontado como fator de risco para a infecção por *Helicobacter* não-*H. pylori* em humanos, indicando que esses animais podem ser a fonte de infecção (MEINING et al., 1998).

Diferentemente dos seres humanos, a real patogenicidade das helicobacterioses para os cães não está bem elucidada, embora haja evidência de que 67 a 100% dos cães possam albergar pelo menos uma espécie de *Helicobacter* spp. (NEIGER e SIMPSON, 2000). Os estudos de Eaton et al. (1996), Yamasaki et al. (1998), Simpson et al. (1999b) e Camargo (2002) demonstraram não haver relação entre intensidade de colonização bacteriana e presença de infiltrado celular inflamatório. Porém, já foi registrado que cães infectados por *Helicobacter* spp. podem apresentar outras alterações de mucosa gástrica, além de um infiltrado inflamatório leve a moderado (LEE et al., 1992; HERMANNNS et al., 1995). Diminuição do muco superficial, presença de células cubóides, variação na largura e profundidade das glândulas gástricas, degeneração glandular, edema intersticial, diferentes

graus de fibrose, hiperplasia, vacuolização e necrose das células parietais quando da presença da bactéria no seu interior já foram constatadas (HERMANNNS et al., 1995; YAMASAKI et al., 1998).

Alterações relacionadas à proliferação celular e apoptose têm sido descritas em pacientes infectados por *H. pylori*, contribuindo com o desenvolvimento de metaplasias, displasias e neoplasias (DE FREITAS et al., 2004). Em cães pouco se sabe sobre a associação entre a presença de helicobactérias e índices de proliferação celular na mucosa gástrica. Os objetivos deste estudo foram identificar as espécies de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de cães, verificar as lesões gástricas e relacionar a espécie infectante com o grau de inflamação e proliferação celular.

3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.2.1 Local

Foram realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina/PR, as biópsias gástricas dos cães. O trabalho foi desenvolvido junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP – UEL), nos laboratórios de Anatomia Patológica e de Virologia Animal.

3.1.2.2 Animais / Amostras

Foram utilizadas amostras de biópsia gástrica de 37 cães domiciliados em Londrina/PR, 15 machos e 22 fêmeas de diversas raças e sem raça definida, com idade

variando entre seis meses a 12 anos. Vinte e cinco cães eram assintomáticos e 12 apresentavam algum distúrbio gastrintestinal primário que, a partir de então, foram encaminhados para o Serviço de Endoscopia para serem submetidos à gastroscopia e biópsia gástrica. O procedimento foi realizado mediante o consentimento do proprietário, durante o período de 2002 a 2005. Nenhum dos animais foi submetido a tratamento por antibióticos, antiinflamatórios ou antiácidos nas quatro semanas precedentes à colheita. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

3.1.2.3 Endoscopia e colheita de fragmentos da mucosa gástrica

Os animais foram submetidos à anestesia geral endovenosa [tiopental (12,5 mg/Kg) ou propofol (3 a 5 mg/Kg)] para o procedimento de gastroscopia e biópsia de mucosa gástrica.

A endoscopia digestiva alta foi realizada com o paciente em decúbito lateral direito, com gastroscópio pediátrico marca FUJINON[®], modelo UGI-7 acoplado a fonte de luz marca MICRONAL[®], modelo 0200. Utilizou-se pinça de biópsia endoscópica de 2,8 cm de diâmetro, marca OLYMPUS[®] devidamente esterilizada. Foram colhidos 3 fragmentos de cada região (antro pilórico, corpo e fundo). Para PCR, uma amostra de cada região foi agrupada e os fragmentos armazenados em microtubo livre de RNase e DNase, mantidos em freezer a -20°C até o momento do processamento. Para exame histológico, as amostras foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas e álcool 70% posteriormente.

3.1.2.4 Reação da Polimerase em Cadeia

Previamente à extração de DNA, foi realizada digestão dos fragmentos gástricos utilizando 25 µL de proteinase K (20mg/mL), adicionado de 200 µL de tampão de lise pH 8 (100 mM de cloreto de sódio, 100 mM de EDTA e 0,5% de dodecil sulfato de sódico), sendo então agitado em aparelho vórtex e incubados em banho-maria a 56°C durante 3 horas. O DNA foi extraído a partir do de 500 µL do material resultante da digestão de acordo com Barreiros et al. (2004). Para reação de amplificação todas as reações foram preparadas com volume final de 25 µL, sendo 5 µL de mix de DNA (1 µL do DNA extraído, 3,0 µL de água e 1 µL de cada primer a 20 pM) e 20 µL do mix da reação contendo 11,75 µL água, 0,4 mM de cada dNTP, 1X tampão de PCR (20 mM Tris –HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,25 U de *Taq platinum* DNA polimerase e 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen™ Life Technologies, USA). A seqüência dos *primers* e o tamanho dos produtos amplificados estão descritos na quadro 1 (CAMARGO et al., 2003). Todos os *primers* utilizados foram produzidos pela GIBCO BRL PRODUCTS – Life Technologies do Brasil Ltda. A reação de amplificação foi executada em termociclador modelo PTC-100™ (MJ Reserch INC) como descrito na quadro 2. Foi utilizado controle negativo da extração de DNA água ultra-pura estéril.

Quadro 1 – Agentes estudados, referências, seqüências dos *primers*, produtos amplificados [pares de base (pb)]. Londrina, 2007

ESPÉCIES	REFERÊNCIAS	PRIMERS	Produtos amplificados
<i>Helicobacter</i> spp. Gene 16S rRNA	GERMANI et al. (1997)	(f) 5' AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA 3' (r) 5' GTG CTT ATT CST NAG ATA CCG TCA T 3'	399 pb
<i>H. bizzozeronii</i> ou <i>H. salomonis</i> Gene ureB	NEIGER et al. (1999)	(f) 5' ACT AGG CGA TAC CAA CTT GAT TT 3' (r) 5' TTC TTC AGC TGC GCG GAG CAT GC 3'	499 pb
<i>H. felis</i> Genes ureA e ureB	GERMANI et al. (1997)	(f) 5' GTG AAG CGA CTA AAG ATA AAC AAT 3' (r) 5' GCA CCA AAT CTA ATT CAT AAG AGC 3'	241 pb
<i>H. heilmannii</i> Gene ureB	NEIGER et al. (1998)	(f) 5' GGG CGA TAA AGT GCG CTT G 3' (r) 5' CTG GTC AAT GAG AGC AGG 3'	580 pb
<i>H. pylori</i> Gene ureB	CLAYTON et al. (1992)	(f) 5' GCC AAT GGT AAA TTA GTT 3' (r) 5' CTC CTT AAT TGT TTT TAC 3'	411 pb

Fonte: CAMARGO et al., 2003

Quadro 2 – Condições de tempo e temperatura utilizadas nas PCRs para gênero *Helicobacter* e espécies de interesse do estudo. Londrina, 2007

Espécies testadas	Desnaturação	Temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão	Nº de ciclos e duração	Extensão final
<i>Helicobacter</i> spp.	95°C por 5 min	95°C, 65°C e 72°C	40 por 1 min	72°C / 10 min
<i>H. bizzozeronii</i> *	94°C por 5 min	94°C, 63°C e 72°C	40 por 1 min	72°C / 10 min
<i>H. heilmannii</i>	94°C por 3 min	94°C, 59°C e 72°C	35 por 1 min	72°C / 5 min
<i>H. felis</i>	94°C por 5 min	94°C, 62°C e 72°C	40 por 1 min	72°C / 10 min
<i>H. pylori</i>	95°C por 5 min	94°C, 45°C e 72°C	40 por 1 min	72°C / 10 min

*ou *H. salomonis*. Fonte: Modificado de CAMARGO et al., 2003

Todas as amostras foram submetidas às reações de amplificação com os *primers* gênero-específico. Aquelas amostras em que as reações geraram produtos do tamanho esperado (399 pb) foram, posteriormente, testadas para as quatro espécies propostas neste estudo.

Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese de agarose a 2,5% com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão de TEB pH 8,4 (89 mM Tris HCl, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), submetidos à eletroforese, em voltagem constante 100 V por

aproximadamente 40 minutos e visualizado em trans-iluminador sob luz ultravioleta. O registro fotográfico foi realizado utilizando sistema digital Kodak (cúpula Kodak EDAS e KODAK digital câmera DC290 ZOOM – EASTMAN KODAK COMPANY).

3.1.2.5 Exames Histológico e Histoquímico

Após as amostras terem sido fixadas, foram submetidas à desidratação em soluções de concentração crescente de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram corados pelos métodos de hematoxilina e eosina (HE) e Warthin Starry (WS) para exame histológico e pesquisa de bactérias espiraladas, respectivamente.

Histopatologia: A interpretação dos resultados histopatológicos foi baseada nos critérios de avaliação histológica propostos por Happonen et al. (1998), em que se avaliou o número de agregados linfocitários, a intensidade do infiltrado inflamatório e o tipo de células presentes, utilizando-se as objetivas de 10 e 40x, respectivamente. As lâminas submetidas à impregnação argêntea (WS) foram avaliadas quanto à morfologia e contagem de bactérias sugestivas de *Helicobacter* spp. presentes em cada região do estômago, em três campos visuais escolhidos aleatoriamente e com objetiva de 100x, levando-se em conta também a distribuição na mucosa gástrica. A classificação da intensidade de colonização bacteriana seguiu o seguinte escore: (0) negativo ou ausência de bactéria; (1) colonização discreta, com presença de uma a 10 bactérias; (2) moderada, 11 a 30 bactérias; (3) intensa, 31 a 50 bactérias; e (4) acentuada, quando o número ultrapassava 50 bactérias por campo. A intensidade do infiltrado inflamatório em cada região do estômago foi graduada conferindo-se os escores: (0) quando presentes até 4 células inflamatórias; (1) de 5 a 15 células por campo; (2) de 16 a 25; (3) mais de 25 células por campo. A mucosa gástrica foi considerada normal

quando da presença de 0 a 4 linfócitos esparsos e ausência ou presença de até 4 neutrófilos e/ou eosinófilos e ausência de agregados linfocitários ou com agregados solitários e esparsos e sem alterações epiteliais. A gastrite foi classificada como discreta quando o infiltrado era composto por 5 a 14 células inflamatórias; moderada quando presente de 15 a 25 células inflamatórias e acentuada quando o infiltrado apresentava mais de 25 células e com três ou mais agregados linfocitários. O diagnóstico de gastrite foi estabelecido quando o infiltrado inflamatório estava presente em pelo menos uma região gástrica. Gastrite foi considerada regional quando não estava presente em todas as regiões gástricas.

Histoquímico: Para a análise histoquímica foram selecionados 10 cães, machos e fêmeas, com raça e sem raça definida, de idades variadas, sendo cinco negativos e cinco positivos para *Helicobacter* spp., compondo os grupos G1 e G2, respectivamente. Para avaliar a proliferação celular utilizou-se o método *Argyrophil Nucleolar Organizer Regions* (AgNORs) de acordo com a metodologia modificada de Crocker e Skilbeck (1987). A avaliação quantitativa foi realizada contando-se o número de NORs em um total de 100 células das regiões do colo e istmo das glândulas gástricas com a objetiva de 100x, utilizando registro fotográfico com câmera digital MOTICAM[®] 2000 2.0 M Pixel USB 2.0, e programa MOTIC[®] Images Plus 2.0 M.L. para mensuração da área (morfometria) de cada NOR contada.

3.1.2.6 Análise estatística

Para todas as análises foi utilizado programa SAS – *Statistics Analysis Systems* V.8 for Windows.

Para verificar a intensidade da colonização bacteriana e do infiltrado inflamatório entre as regiões gástricas, e ainda associar a espécie infectante com o infiltrado inflamatório

foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para observar se houve correlação entre densidade de colonização bacteriana e infiltrado celular foi realizado teste de correlação de Pearson.

O teste Exato de Fisher foi utilizado para avaliar se a presença de *Helicobacter* spp. estava associada com gastrite, degeneração epitelial glandular, fibrose e formação de nódulos linfóides.

Para comparar a proliferação celular nas diferentes regiões da mucosa gástrica dos cães infectados ou não por *Helicobacter* spp. foi utilizado teste de análise de variância (ANOVA).

Considerando um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

3.1.3 RESULTADOS

3.1.3.1 Warthin Starry

Estruturas impregnadas pela prata foram visualizadas em 28/37 (75,7%) cães, bem espiraladas e sugestivas de *Helicobacter* spp. foram visualizadas recobrando a superfície epitelial, colonizando o lúmen de foveas e de glândulas gástricas (Figura 1). As bactérias foram vistas em pequenos ou grandes aglomerados, mas também isoladamente, e geralmente verticalmente ao lúmen da região. A maior frequência de colonização foi observada na região de corpo (100%), seguida de fundo (93%) e antro (82%) (Tabela 1). A intensidade da colonização bacteriana das regiões variou de 1 a 2, sendo que nenhum dos cães apresentou uma infecção maciça. Onze pacientes apresentaram uma colonização homogênea da mucosa gástrica, ou seja, antro pilórico, corpo e fundo com o mesmo escore. Em dois cães puderam ser observadas populações distintas de bactérias espiraladas, umas mais curtas que as outras.

Foram observadas ainda, em três cães, sendo dois deles positivos, estruturas bem marcadas, acastanhadas, não espiraladas e nem curvas, semelhantes a bacilos, distribuídas pelo muco superficial ou sobre a região glandular.

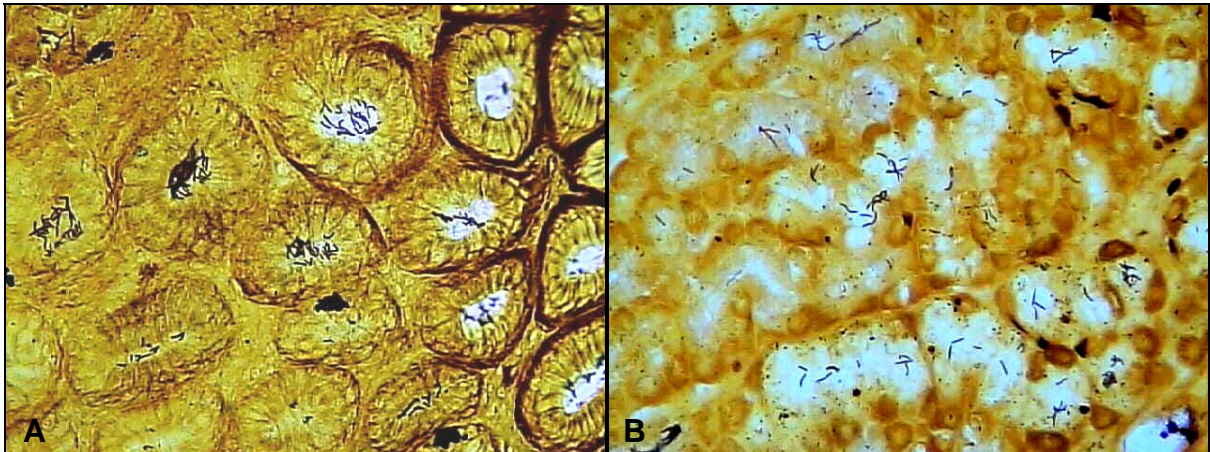


Figura 1 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de cães. A) *Helicobacter* spp. agrupados e localizados no interior da fóvea. B) *Helicobacter* spp. localizados no lúmen de glândulas gástricas. Warthin Starry. Objetiva 40x (original).

Tabela 1 – Frequência de escores de intensidade de colonização bacteriana na mucosa gástrica de cães, de acordo com as regiões gástricas. Londrina, 2007

Escores	Antro (n=37)	Corpo (n=37)	Fundo (n=37)
0	14	9	11
1	16	22	23
2	7	6	3
3	0	0	0
4	0	0	0

Não houve diferença significativa ($p = 0,4145$) entre as três regiões gástricas em relação à intensidade de colonização.

3.1.3.2 PCR

A ocorrência para cada uma das espécies testadas está descrita na tabela 2. Vinte e sete (73%) dos 37 cães foram positivos para gênero *Helicobacter* (Figuras 2, 3 e 4).

Tabela 2 – Resultado das PCRs de *Helicobacter* spp. da mucosa gástrica de cães. Londrina, 2007

Resultados das PCRs	Frequência
Reações positivas para gênero e negativas para as espécies testadas	13
<i>H. bizzozeronii</i> ou <i>H. salomonis</i>	4
<i>H. bizzozeronii</i> ou <i>H. salomonis</i> e <i>H. felis</i>	4
<i>H. heilmannii</i>	3
<i>H. heilmannii</i> , <i>H. bizzozeronii</i> ou <i>H. salomonis</i> e <i>H. felis</i>	2
<i>H. felis</i>	1
Negativos	10

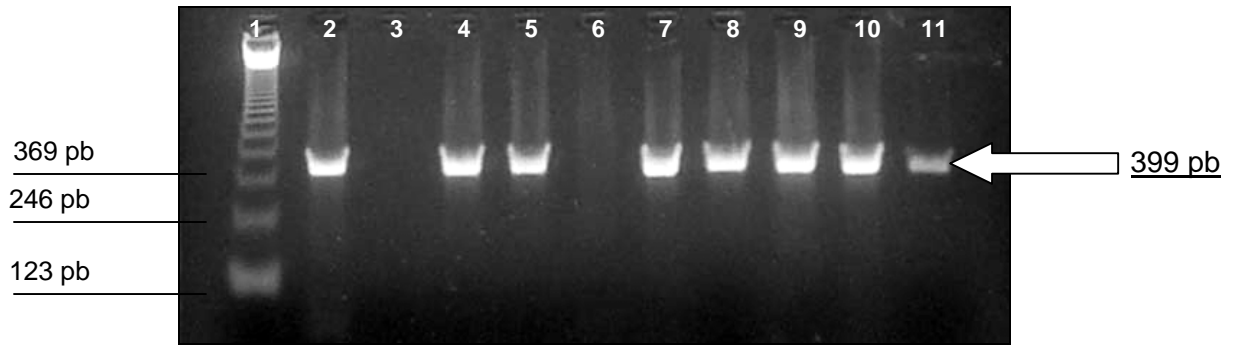


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA de *Helicobacter* spp. (399 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de cão. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular de 123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 a 11: amostras provenientes de cães. Londrina, 2007.

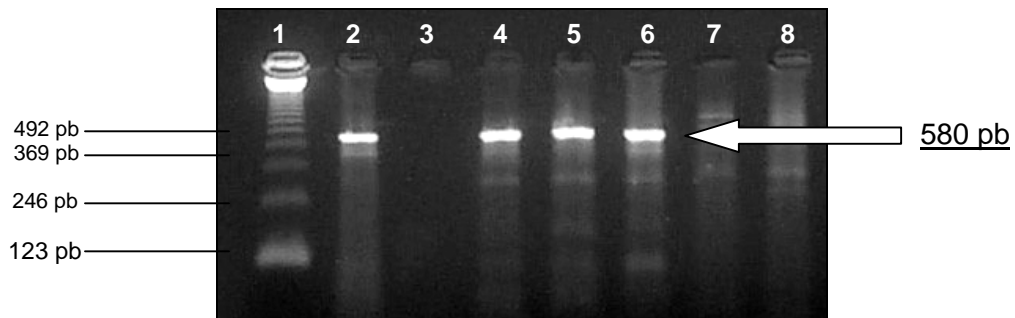


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação do gene ureB de *Helicobacter heilmannii* (580 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de cão. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular de 123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 a 8: amostras provenientes de cães. Londrina, 2007.

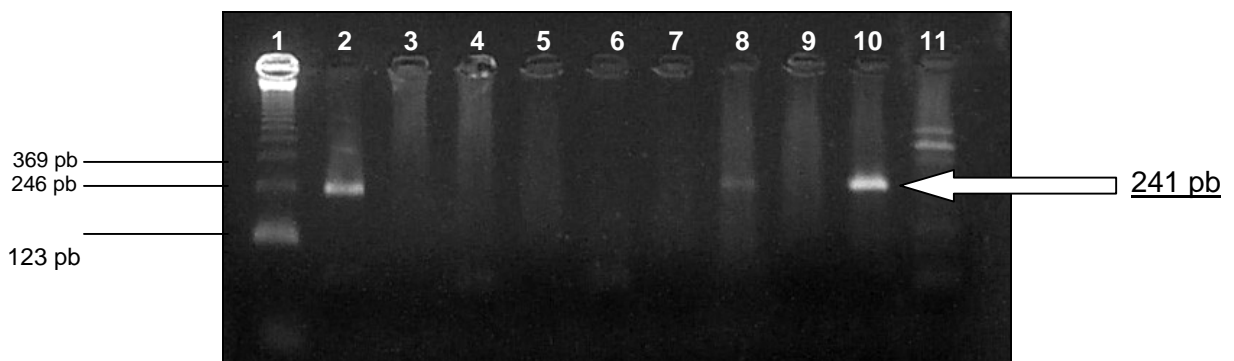


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação dos genes ureA e ureB de *Helicobacter felis* (241 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de cão. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular de 123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 a 11: amostras provenientes de cães. Londrina, 2007.

3.1.3.3 Alterações histológicas

Observou-se que a maioria dos cães (29/37) apresentava infiltrado inflamatório em pelo menos uma região do estômago (Tabela 3). Esses infiltrados eram de grau 1, constituídos por células mononucleares, caracterizando uma gastrite discreta crônica. As frequências do infiltrado de cada região gástrica e sua relação com a presença da bactéria estão representadas na tabela 4. Dos 28 cães positivos para *Helicobacter* spp., cinco não apresentavam infiltrado inflamatório; cinco cães apresentavam gastrite discreta crônica nas três regiões avaliadas e os demais 23 pacientes gastrite discreta crônica regional. A região que menos apresentou escore inflamatório foi a de fundo gástrico (10/28). Em cinco cães pôde-se observar a presença da bactéria, porém sem o acompanhamento de processo inflamatório gástrico. Não houve diferença significativa ($p = 0,1321$) entre as regiões gástricas de acordo com o infiltrado celular. As intensidades de colonização bacteriana e de infiltrado inflamatório foram variáveis independentes uma da outra, não havendo dessa forma correlação.

Dezenove cães apresentaram pelo menos um nódulo linfóide (Tabela 3) e não mais que dois em cada região gástrica, sendo todos acompanhados por infiltrado inflamatório e/ou infecção por *Helicobacter* spp (Figura 5). A frequência de ocorrência de agregados linfocitários deu-se da seguinte forma: 11/19 em antro, 12/19 em corpo e 11/19 em fundo. Dois desses cães não estavam infectados por *Helicobacter* spp. Cinco pacientes apresentaram nódulos linfóides nas três regiões gástricas, sendo que um era do grupo não infectado. Não houve associação entre presença de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de cães e presença de agregados linfocitários ($p = 0,06$).

Além da classificação do infiltrado inflamatório e presença de agregado linfocitário, outras alterações foram observadas: fibrose discreta e acentuada, degeneração glandular, erosão e edema intersticial. As lesões histológicas e sua frequência estão descritas

nas tabelas 3 e 4. Todos os cães, inclusive aqueles com mucosa sem infiltrado inflamatório ou negativo para *Helicobacter* spp. apresentaram algum tipo de lesão.

A largura e profundidade das fossetas variavam; em alguns casos apresentavam-se mais rasas e largas; eventualmente eram pouco evidentes. Dentre os 28 animais positivos, três apresentaram erosão em região de corpo e um em fundo gástrico; um cão não infectado apresentou erosão no corpo gástrico.

Fibrose da lâmina própria pôde ser observada como sendo discreta ou acentuada, focal ou difusa (Figura 6). Fibrose discreta foi observada em 24 dos cães positivos (Tabela 3), e ainda, em sete pode ser observada fibrose acentuada associada. Em seis dos nove animais negativos foi observada fibrose discreta e desses, dois apresentaram também fibrose acentuada. A frequência desse tipo de lesão histológica de acordo com as regiões gástricas deu-se conforme disponível na tabela 4.

Edema intersticial foi observado em três animais positivos (antro, corpo e/ou fundo) e um negativo (corpo). Degeneração glandular estava presente em 20/28 dos cães positivos (Tabela 3) com distribuição que variou entre as regiões (Tabela 4). Em 18 e quatro cães infectados e não infectados, respectivamente, observaram-se fibrose e degeneração glandular no mesmo corte. Notou-se ainda que algumas células parietais apresentavam vacuolização citoplasmática, caracterizando a degeneração (Figura 6).

Não houve associação entre presença de *Helicobacter* spp. com gastrite, com degeneração glandular e com fibrose (Tabela 3). Não foi observada relação entre espécie infectante e intensidade de infiltrado inflamatório ($p = 0,15$).

Tabela 3 – Frequência das lesões gástricas histológicas em cães de acordo com presença ou ausência de infecção por *Helicobacter* spp. Londrina, 2007

Lesão gástrica	Total (n=38)	Positivos (n=28)	Negativos (n=9)	Valor de p
Gastrite discreta crônica	29	23	6	0,37
Nódulos linfóides	19	17	2	0,06
Erosão	5	4	1	-
Degeneração glandular	25	19	6	0,73
Fibrose da lâmina própria	30	24	6	0,43
Edema	4	3	1	-

Teste Exato de Fisher: significância quando $p \leq 0,05$

Tabela 4 – Lesões gástricas histológicas e sua frequência de acordo com as regiões da biópsia gástrica de cães. Londrina, 2007

Achado histopatológico	Número de regiões gástricas afetadas					
	Cães Positivos (n=28)			Cães Negativos (n=09)		
	Antro	Corpo	Fundo	Antro	Corpo	Fundo
Superfície epitelial gástrica						
Erosão	0	3	1	0	0	1
Lâmina própria						
Nódulo linfóide	10	10	10	1	2	1
Infiltrado mononuclear grau 1	17	16	10	2	5	2*
Fibrose discreta	16	11	12	5	0	2
Fibrose acentuada	4	0	3	1	1	0
Edema	1	1	2	0	0	1
Glândulas gástricas						
Degeneração glandular	15	8	11	5	1	2

*Considerar n=8

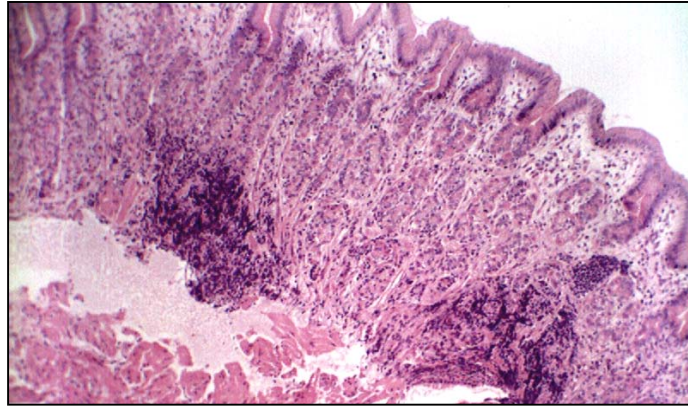


Figura 5 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de cão infectado por *Helicobacter* spp. Nódulo linfóide. H.E. Objetiva 10x (original).

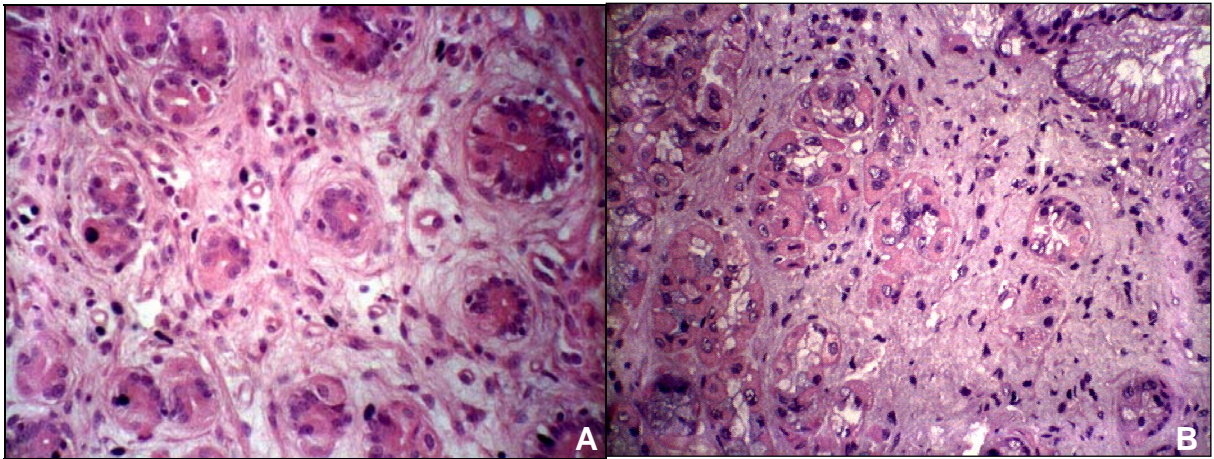


Figura 6 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de cão infectado por *Helicobacter* spp. A) Fibrose de lâmina própria. B) Degeneração epitelial glandular associado com infiltrado inflamatório mononuclear. H.E. Objetiva 100x (original).

3.1.3.4 Histoquímica: proliferação celular

As NORs apresentavam-se como pontos pretos distribuídos no interior do núcleo, com formato e tamanho variados (Figura 7).

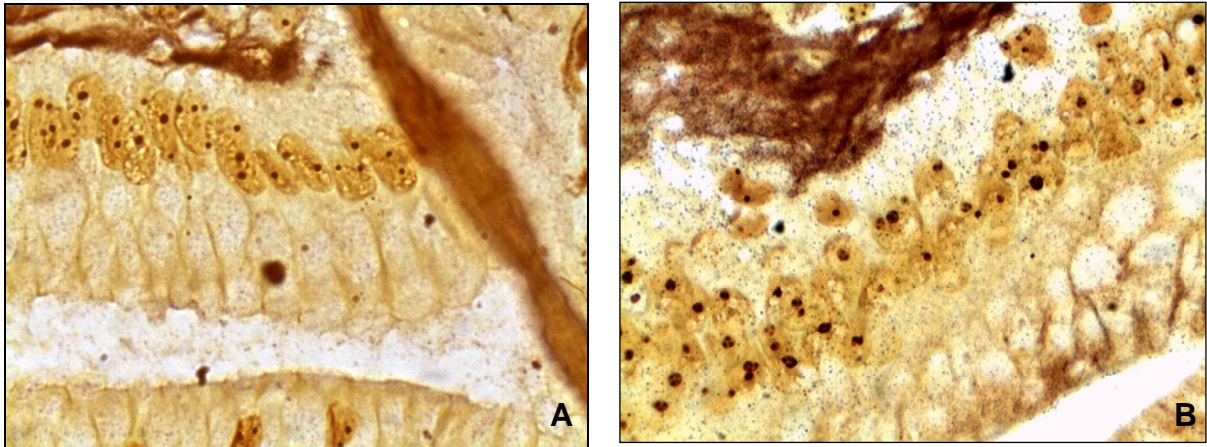


Figura 7 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de cão. A) Cão negativo para *Helicobacter* spp. B) Cão positivo para *Helicobacter* spp. AgNOR. Objetiva 100x (original).

Os valores de média da contagem das NORs e área das mesmas estão dispostos na tabela 5. Houve diferença estatística em relação à proliferação celular entre as regiões gástricas de antro ($p = 0,019$) e corpo ($p = 0,008$) nos cães do G1; o mesmo não foi observado nos cães infectados por *Helicobacter* spp. Ainda, pôde ser observada diferença estatística em relação à proliferação celular nos animais infectados por *Helicobacter* spp. nas regiões de antro ($p = 0,029$) e fundo ($p = 0,008$) gástricos, sendo que os animais negativos apresentaram valores menores de proliferação celular. Não houve diferença significativa em relação à área das NORs dentro e entre os grupos.

Tabela 5 – Valores de média (\pm desvio padrão) da quantificação da proliferação celular de mucosa gástrica de cães negativos e positivos para *Helicobacter* spp., das regiões de antro, corpo e fundo, utilizando método histoquímico de AgNOR. Londrina, 2007

Parâmetro	Valores de média (\pm desvio padrão) de proliferação celular					
	G1 - Negativos			G2 - Positivos		
	Antro	Corpo	Fundo	Antro	Corpo	Fundo
Nº NORs	1,54 \pm 0,59 ^{a,c}	1,55 \pm 0,57 ^b	1,45 \pm 0,56 ^{a,b,d}	1,63 \pm 0,70 ^c	1,60 \pm 0,68	1,56 \pm 0,69 ^d
Morfometria (μm^2)	1,09 \pm 0,64	0,94 \pm 0,53	0,92 \pm 0,52	0,88 \pm 0,44	0,76 \pm 0,33	0,76 \pm 0,35

ANOVA: letras iguais, significância estatística. a) $p = 0,019$; b) $p = 0,008$; c) $p = 0,029$; d) $p = 0,008$

3.1.4 DISCUSSÃO

A ocorrência de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de cães observada neste trabalho foi relativamente alta, assim como as observadas em países do Hemisfério Norte, como Alemanha (82%) (HERMANNNS et al., 1995), Estados Unidos da América (91%) (EATON et al., 1996), Japão (68%) (YAMASAKI et al., 1998) e Bélgica (83%) (VAN DEN BULCK et al., 2005).

Foram utilizados cães domiciliados, diferentemente de Eaton et al. (1996) e Camargo (2002) que utilizaram cães aparentemente sadios de canis. Eaton et al. (1996) relataram uma ocorrência de 91% e Camargo (2002) 94,6%. Geyer et al. (1993) reportaram que cães domiciliados apresentam taxas de infecção relativamente mais baixas, devido às diferenças dos ambientes onde habitam e do contato com menor número de cães de fontes aleatórias, o que pôde ser verificado no estudo.

Pelos resultados obtidos por meio da técnica de WS foi possível avaliar que os cães apresentaram distribuição e intensidade homogêneas de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica, de modo semelhante ao relatado por Happonen e colaboradores (1998), porém, diferente de outros autores que descreveram regiões preferenciais da colonização bacteriana (YAMASAKI et al., 1998; CAMARGO, 2002).

Embora os resultados das técnicas de WS e PCR tenham sido discordantes (28/37 e 27/37, respectivamente), ambas demonstraram alta sensibilidade, além de que a impregnação pela prata apresenta como vantagem o seu baixo custo, e com a PCR a possibilidade de identificar a(s) espécie(s) infectante(s) na mucosa gástrica pelo uso dos *primers* específicos. Essa discordância dos resultados reforça a necessidade da colheita de múltiplos fragmentos e do uso combinado de métodos diagnósticos (DEBONGNIE et al., 1995; SIMPSON et al., 2000). A impregnação argêntea permitiu visualizar bactérias do

gênero *Helicobacter* spp. pela sua morfologia fortemente espiralada e reconhecer como sendo não-*H. pylori* e, ainda, observar em alguns cães estruturas mais curtas, não helicoidais, semelhantes a bacilos, albergando-se simultaneamente em sua mucosa gástrica. Esses bacilos apresentavam-se dispostos na superfície epitelial, nas fóveas e dispersos nas glândulas.

As espécies de *Helicobacter* spp. que mais infectam o estômago de cães são *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. heilmannii* e *H. salomonis* (CAMARGO, 2002; VAN DEN BULCK et al., 2005) e, ocasionalmente *H. rappini* e *H. bilis* (EATON et al., 1996; NEIGER et al., 1999), sendo freqüente a ocorrência de infecções por mais de uma espécie (JALAVA et al., 1998; NORRIS et al., 1999). Com exceção da espécie *H. pylori*, as outras espécies de interesse do estudo foram observadas, inclusive em infecções mistas.

H. bizzozeronii ou *H. salomonis* ocorreu como única espécie infectante identificada, mas também em co-infecções com *H. heilmannii* e/ou *H. felis*. A ocorrência foi de 27% (10/37), sendo superior à observada por Cattoli et al. (1999) de 4%. Jalava et al. (1998) relataram uma taxa de 46,7% por meio de isolamento bacteriano; pela técnica de PCR, Camargo (2002) e Van den Bulck et al. (2005) observaram taxas de 65,7% e 70%, respectivamente. Embora a ocorrência de *H. bizzozeronii* varie de acordo com o estudo, o fato de ter sido a espécie mais predominantemente identificada foi um achado comum entre os autores.

A taxa de infecção por *H. heilmannii* (13,5%) foi superior à citada por Camargo (2002) (1,4%), mas inferior ao observado por Neiger et al. (1999) (50%). Foi observada uma ocorrência de *H. felis* de 19% na população estudada, enquanto que Jalava et al. (1998) e Camargo (2002) relataram taxas de 18% e 50%, respectivamente.

O fato de 13 animais terem sido positivos para gênero, mas negativos para espécie sugere a existência de outras espécies aqui não testadas, ocasionalmente detectadas no cão, como o "*Flexispira rappini*", *H. bilis* (NEIGER et al., 1999), *H. cynogastricus* (VAN DEN

BULCK et al., 2006), ou da existência de outras espécies com semelhanças morfológicas à microscopia óptica (VAN DEN BULCK et al., 2005). A ausência de *H. pylori* nesses cães vai de encontro a vários outros trabalhos existentes (EATON et al., 1996; YAMASAKI et al., 1998; CATTOLI et al., 1999; CAMARGO, 2002), embora Buczolits et al. (2003) tenham identificado em alguns cães essa espécie ou outra geneticamente semelhante. A ausência de infecção por *H. pylori* nesses cães sugere que eles não são reservatórios da infecção para o homem.

Infiltrado inflamatório mononuclear foi visto em 78,4% dos cães infectados ou não por *Helicobacter* spp. Este tem sido um achado comum tanto em cães sadios como em cães com algum sinal clínico gástrico (HERMANNNS et al., 1995; HAPPONEN et al., 1996; YAMASAKI et al., 1998; HAPPONEN et al., 1998; CAMARGO, 2002), e não tem mostrado ter relação com a presença e intensidade de colonização bacteriana (EATON, et al., 1996; SIMPSON et al., 1999b; CAMARGO 2002).

Assim como Eaton et al. (1996) e Simpson et al. (1999a), nódulos linfóides foram observados tanto em mucosa gástrica infectada quanto em não infectada. Sabe-se que nos seres humanos a infecção por *H. pylori* leva à ocorrência de agregados linfocitários na mucosa gástrica (MITCHELL et al., 1993). Nos animais avaliados observou-se que os nódulos linfóides foram mais freqüentes nas amostras positivas, no entanto não houve significância estatística, sugerindo que sua presença na mucosa gástrica seja um achado comum, assim como relatado por Happonen et al. (1998). Lee et al. (1992) e Simpson et al. (1999a) observaram aumento do número de nódulos linfóides e infiltrado inflamatório difuso predominantemente mononuclear quando da inoculação de *H. felis* em cães livres de patógenos específicos (*specific-pathogen-free* – SPF), porém, não demonstraram relação entre espécie infectante e infiltrado inflamatório. Em estudo realizado com ratos, De Bock et al. (2005) relataram infiltrado inflamatório moderado a intenso causado por inoculação de *H.*

bizzozeronii, *H. salomonis* ou *H. felis*. No presente estudo não foi observada relação entre espécie infectante e infiltrado inflamatório.

As microerosões foram achados inconsistentes, o que já havia sido relatado anteriormente (EATON et al., 1996). O mesmo não foi observado por outros autores (HERMANNNS et al., 1995; HAPPONEN et al., 1996).

A degeneração glandular foi observada na maioria dos cães positivos e negativos ($p > 0,73$) e, em vários casos essa alteração vinha acompanhada de células inflamatórias mononucleares. Hermanns et al. (1995) não demonstraram associação entre degeneração glandular e grau de colonização bacteriana; por outro lado, Yamasaki et al. (1998) relataram uma frequência maior em cães infectados do que os animais negativos. Ainda puderam notar que a presença desse tipo de lesão gástrica não reflete na condição de saúde desses animais. Avaliando mucosa gástrica de gatos, Hermanns et al. (1995) observaram uma relação direta entre colonização bacteriana, número de células inflamatórias, nódulos linfóides e degeneração glandular e alterações do epitélio superficial gástrico. Não se sabe se essa diferença é pela patogenicidade da espécie de *Helicobacter* envolvida ou se pela diferença genética entre os hospedeiros.

Alterações no tecido conjuntivo, particularmente a fibrose foi frequentemente observada, sendo focal ou difusa, o mesmo já observado por outros autores (HERMANNNS et al., 1995; YAMASAKI et al., 1998). Embora não haja associação estatística entre a presença de *Helicobacter* spp. e a fibrose da lâmina própria, a prevalência foi maior nos cães positivos. O mesmo foi reportado por Yamasaki et al. (1998), que também observaram esse tipo de alteração em cães jovens (dois meses de idade) sem qualquer sinal clínico.

A proliferação celular e a apoptose são eventos essenciais para homeostase dos tecidos. No estômago normal e nos outros órgãos, o desequilíbrio entre esses dois processos pode resultar no desenvolvimento de patologias (GO e CROWE, 2000; XIA e TALLEY,

2001). O efeito deletério à mucosa gástrica de seres humanos já foi demonstrado (MISRA et al., 2000; DE FREITAS et al., 2004).

Métodos imunoistoquímicos, como o PCNA e Ki-67, foram utilizados na avaliação da proliferação celular. Os resultados indicaram que a infecção em seres humanos por *H. pylori*, e em cães por *Helicobacter* spp., resultam em aumento do índice de proliferação epitelial gástrica (LIU et al., 1998; SAPIERZYNSKI e MALICKA, 2004). Preziosi et al. (2000) avaliaram por meio da técnica de AgNOR a patogênese das lesões da *pars esophagea* em suínos e concluíram que a proliferação celular foi um evento prévio de lesões de degeneração e ulceração dessa região, apresentando dessa forma um desequilíbrio entre proliferação celular e morte celular programada.

No presente trabalho, a presença de *Helicobacter* spp. estava relacionada com aumento no índice de proliferação celular, do mesmo modo que o observado em humanos que albergam a espécie *H. pylori* (STEININGER et al., 1995; MISRA et al., 2000; DE FREITAS et al., 2004). No entanto, este evento foi constatado apenas na avaliação do número de NORs, diferindo dos resultados de De Freitas et al. (2004) que também observaram a alteração em relação à área das NORs. Uma maior proliferação celular em humanos está relacionada à infecção pelo subtipo *H. pylori* CagA(+) (ROKKAS et al., 1999; DE FREITAS et al., 2004). Não foram encontrados relatos na literatura que avaliassem a proliferação celular da mucosa gástrica de cães com a técnica de AgNOR.

Deve ser observado, que as alterações histológicas em cães infectados por espécies *H. não-pylori* são bem menos severas do que em humanos afetados por *H. pylori* (HERMANNNS et al., 1995). Por meio dos resultados obtidos, nota-se que essa espécie animal pode apresentar infecções mistas por helicobactéria e, pode-se inferir que as alterações inflamatórias e as degenerativas presentes na mucosa gástrica de cães não estão relacionadas à infecção por *Helicobacter* spp. Os fatores envolvidos na atuação da proliferação celular

permanecem incertos, abrindo perspectivas para outros estudos que envolvam os cães como modelos experimentais. Ainda, o fato de esses cães serem negativos pela espécie *H. pylori* sugere que os mesmos não sejam reservatórios para o homem.

AGRADECIMENTO

À Profa. Dra. Patrícia Tholon, pelas análises estatísticas contidas nesse trabalho, por toda sua paciência e dedicação.

REFERÊNCIAS

- Barreiros, M.A., Alfieri, A.F., Medici, K.C., Leite, J.P., Alfieri, A.A., 2004. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 51, 104-109.
- Bizzozero G. Sulla presenza di batteri nelle ghiandole gastriche del cane (in Italian), 1893. *Atti della Reale Accademia delle Scienze di Torino* 28, 249.
- Buczolits S., Reinhard H., Rosengarten R., Busse H.-J., 2003. PCR-based genetic evidence for occurrence of *Helicobacter pylori* and novel *Helicobacter* species in the canine gastric mucosa. *Veterinary Microbiology* 95, 259-270.
- Camargo P.L. Identificação das espécies de *Helicobacter* spp. presentes na mucosa gástrica de cães, gatos e seres humanos, e sua correlação com as alterações da mucosa. 112 f. Tese (Clínica Médica) - Clínica Veterinária. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

- Camargo, P.L., Alfieri, A.A., Bracarense, A.P.F.R.L., Menoli, R., Spinosa, S.R., Hagiwara, M.K., 2003. Use of polymerase chain reaction and enzymatic cleavage in the identification of *Helicobacter spp.* in gastric mucosa of human beings from North Paraná, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 265-68.
- Cattoli G., van Vugt R., Zanoni R.G., Sanguinetti V., Chiocchetti R., Gualtieri M., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Gaastra W., Kusters J.G., 1999. Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter spp.* in naturally infected dogs. *Veterinary Microbiology* 70, 239-250.
- Clayton C.L., Kleanthous H., Coates P.J., Morgan D.D., Tabaqchali S., 1992. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 192-200.
- Crocker J., Skilbeck N., 1987. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *Journal of Clinical Pathology* 40, 885-889.
- Debonnie J.C., Donnay M., Mairesse J., 1995. *Gastrospirillum hominis* (“*Helicobacter heilmannii*”): a cause of gastritis, sometimes transient, better diagnosed by touch cytology ? *The American Journal of Gastroenterology* 90, 411-416.
- De Bock M., Decostere A., Van den Bulck K., Baele M., Duchateau L., Haesebrouck F., Ducatelle R., 2005. *Journal of Comparative Pathology* 133, 83-91.
- De Freitas, D., Urbano M., Goulao M.H., Donato M.M., Baldaia C., Martins M.I., Souto P., Gregorito C., Figueiredo P., Gouveia H., Romaozinho J.M., 2004. The effects of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. *Hepatogastroenterology* 51, 876-882.
- Eaton K.A., Dewhirst F.E., Paster B.J., Tzellas N., Coleman B.E., Paola J., Sherding R., 1996. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 3165-3170.

- Germani Y., Dauga C., Duval P., Huerre M., Levy M., Pialoux G., Sansonetti P., Grimont P.A.D., 1997. Strategy for detection of helicobacter species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in human gastric biopsy. *Research in Microbiology* 148, 315-326.
- Geyer C., Colbatzky F., Lechner J., Hermanns W., 1993. Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. *The Veterinary Record* 133, 18-19.
- Go M.F., Crowe S.E., 2000. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America* 29, 649-670.
- Hänninen M.-L., Happonen I., Saari S., Jalava K., 1996. Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 160-166.
- Happonen I., Saari S., Castren L., Tyni O., Hänninen M.-L., Westermarck E., 1996. Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. *Journal of Veterinary Medicine* 43, 305-315.
- Happonen I., Linden J., Saari S., Karjalainen M., Hänninen M.-L., Jalava, K., Westermarck E., 1998. Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213, 1767-1773.
- Hermanns W., Kregel, K., Breuer, W., Lechner, J., 1995. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology* 112, 307-18.
- Jalava K., Kaartinen M., Utriainen M., Happonen I., Hänninen M.-L., 1997. *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis*, and *Helicobacter bizzozeronii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 975-982.

- Jalava K., On S.L.W., Vandamme P.A.R., Happonen I., Sukura A., Hänninen M.-L., 1998. Isolation and identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosa. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3998-4006.
- Jalava K., On S.L., Harrington C.S., Andersen L.P., Hänninen M.-L., Vandamme P., 2001. A cultured strain of “*Helicobacter heilmannii*”, a human gastric pathogen, identified as *H. bizzozeronii*: evidence for zoonotic potential of *Helicobacter*. *Emerging Infectious Disease* 7, 1036-1038.
- Lee A., Krakowka S., Fox J.G., Otto G., Eaton K.A., Murphy J.C., 1992. Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. *Veterinary Pathology* 29, 487-494.
- Liu W.-Z., Zheng X., Shi Y., Dong Q.-J., Xiao S.-D., 1998. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial proliferation in progression from normal mucosa to gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 4, 246-248.
- Meining A., Kroher G., Stolte M., 1998. Animal reservoirs in the transmission of *Helicobacter heilmannii*. Results of a questionnaire-based study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 33, 795-798.
- Misra V., Bisht D., Misra S.P., Dwivedi M., Bhatia R., 2000. Argyrophilic nucleolar organizer regions in *Helicobacter pylori*-associated gastric lesions. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 108, 448-452.
- Mitchell H.M., Bohane T.D., Tobias V., Bullpitt P., Daskalopoulos G., Carrick J., Mitchell J.D., Lee A., 1993. *Helicobacter-pylori* infection in children – potential clues to pathogenesis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 16, 120-125.
- Neiger R., Dieterich C., Burnens A., Waldvogel A., Corthésy-Theulaz I., Halter F., Lauterburg B., Schmassmann A., 1998. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 634-637.

- Neiger R., Tschudi M.E., Burnens A., Göke B., Schmassmann A., 1999. Diagnosis and identification of gastric *Helicobacter* species by polymerase chain reaction in dogs. *Microbial Ecology in Health and Disease* 11, 234-240.
- Neiger, R., Simpson K.W., 2000. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 125-33.
- Norris C.R., Marks S.L., Eaton K.A., Torabian S.Z., Munn R.J., Solnick J.V., 1999. Healthy cats are commonly colonized with “*Helicobacter heilmannii*” that is associated with minimal gastritis. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 189-194.
- Owen, R.J., 1998. *Helicobacter* – species classification and identification. *British Medical Bulletin* 54, 17-30.
- Preziosi R., Sarli G., Marcato P.S., 2000. Cell proliferation and apoptosis in the pathogenesis of oesophagogastric lesions in pigs. *Research in Veterinary Science* 68, 189-196.
- Priestnall, S.L., Wiinberg, B., Spohr, A., Neuhaus, B., Kuffer, M., Wiedmann, M., Simpson, K.W., 2004. Evaluation of “*Helicobacter heilmannii*” subtypes in the gastric mucosas of cats and dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2144-2151.
- Rokkas T., Ladas S., Liasos C., Petridou E., Papatheodorou G., Theocharis S., Karameris A., Raptis S., 1999. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Digestive Diseases and Sciences* 44, 487-493.
- Sapierzynski R., Malicka E., 2004. Effect of gastric *Helicobacter*-like organisms on gastric epithelial cell proliferation rate in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 7, 275-281.
- Simpson K.W., McDonough P.L., Strauss-Ayali D., Chang Y.-F., Harpending P., Valentine B.A., 1999a. *Helicobacter felis* infection in dogs: effect on gastric structure and function. *Veterinary Pathology* 36, 237-248.

Simpson K.W., Strauss-Ayali D., McDonough P.L., Chang Y.-F., Valentine B.A., 1999b. Gastric function in dogs with naturally acquired gastric *Helicobacter* spp. infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13, 507-515.

Simpson K.W., Strauss-Ayali D., Scanziani E., Straubinger R.K., McDonough P.L., Straubinger A.F., Chang Y.-F., Domeneghini C., Arebi N., Calam J., 2000. *Helicobacter felis* infection is associated with lymphoid follicular hyperplasia and mild gastritis but normal secretory function in cats. *Infection and Immunity* 68, 779-790.

Steininger H., Streitberg U.v., Wunder I., Faller G., Kirchner T., 1995. Inflammatory, preneoplastic, and neoplastic changes of the gastric mucosa. *General and Diagnostic Pathology* 141, 15-19.

Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Driessen A., Debongnie J.-C., Burett A., Stolte M., Ducatelle R., Haesebrouck F., 2005. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 2256-2260.

Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Bañadme P., Mast J., Ducatelle R., Haesebrouck F., 2006. *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1559-1564.

Yamasaki K., Suematsu, H., Takahashi, T., 1998. Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. *Journal of American Veterinary Medical Association* 212, 529-533.

Xia H.H.-X., Talley N.J., 2001. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infections: implications in gastric carcinogenesis. *The American Journal of Gastroenterology* 96, 16-26.

3.2 *Helicobacter* spp. em gatos: relação entre espécies infectantes, alterações histológicas e proliferação celular

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre infecção por *Helicobacter* spp. e o estabelecimento de lesões gástricas e proliferação celular. Foram utilizados 23 gatos domiciliados, de ambos os sexos, com idade e raças variadas. Fragmentos de antro pilórico, corpo e fundo foram colhidos por gastroscopia. O diagnóstico da infecção e a densidade da colonização bacteriana foram verificados utilizando a técnica de Warthin Starry. As espécies infectantes foram determinadas pela técnica de PCR. As alterações histológicas e a proliferação celular foram avaliadas pelo método da hematoxilina-eosina e AgNOR, respectivamente. Em 20 gatos (87%) constatou-se a presença de *Helicobacter* spp. pelas técnicas de WS (20/23) e PCR (20/23). Não houve diferença significativa nos escores da densidade de colonização entre as diferentes regiões gástricas. *H. heilmannii* foi a espécie mais frequentemente identificada (17/20). *H. felis* foi identificado sempre em co-infecção (2/20). Um dos animais positivos para gênero *Helicobacter* foi negativo para as quatro espécies testadas pela técnica de PCR. As alterações mais frequentes foram: erosão do epitélio gástrico, degeneração glandular, infiltrado inflamatório mononuclear discreto e a presença de folículos linfóides. O antro pilórico foi a região que apresentou maior frequência de alterações gástricas. A associação entre infecção por *Helicobacter* spp. e presença de nódulos linfóides ($p = 0,04$) e proliferação celular em corpo ($p = 0,00008$) e fundo ($p = 0,00005$) gástricos foi significativa.

Palavras-chave: *Helicobacter* spp., lesões gástricas, gatos, proliferação celular

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the association of *Helicobacter* spp. infection and to establish the gastric lesions and cellular proliferation. 23 domiciled cats, of both sexes, with varied age and breeds were studied. Pyloric antrum, corpus and fundus fragments were collected by gastroscopy. The diagnosis of infection and density of bacteria colonization were determined by Warthin Starry (WS) method. The infecting species were determined by the PCR. The histological alterations and cellular proliferation were evaluated by hematoxylin-eosin and AgNOR, respectively. In twenty the cats (87%) the presence of *Helicobacter* spp. was confirmed spp. by the WS (20/23) and PCR (20/23) techniques. There was no significant difference in scores among the different gastric regions. *H. heilmannii* was the most frequently identified specie (17/20). *H. felis* was always identified in co-infection (2/23). One of the positive to genus *Helicobacter* spp. was negative to the four species tested by PCR technique. The most frequent observed alterations were erosion of gastric epithelium, glandular degeneration, mild mononuclear inflammatory infiltrate and the presence of lymphoid follicles. The pyloric antrum was the region that presented the more occurrences of gastric alterations. The relation between *Helicobacter* spp. and presence of lymphoid follicles ($p = 0,04$) and cellular proliferation in corpus ($p = 0,00008$) and fundus ($p = 0,00005$) gastric was meaningful.

Key words: *Helicobacter* spp., gastric lesions, cats, cellular proliferation

3.2.1 INTRODUÇÃO

Bactérias espiraladas têm sido observadas colonizando a mucosa gástrica de alguns mamíferos, incluindo o homem há mais de 100 anos (BIZZOZERO, 1893). Geralmente essas estruturas estão presentes na superfície da mucosa e fóvea (GEYER et al., 1993), na luz das glândulas fúndicas e no interior de células parietais (BIZZOZERO, 1893). Na espécie felina, a prevalência de *Helicobacter* spp. é alta e varia de 41 a 100% nos diferentes trabalhos existentes, dependendo dos meios diagnósticos utilizados, da metodologia de seleção da população estudada e, ainda, das características geográficas (LECOINDRE et al., 2000). Gatos muito jovens podem estar infectados, possivelmente pelo contato direto com a mãe (LEE et al., 1991). Já foram identificadas as seguintes espécies infectando a mucosa gástrica de gatos: *H. heilmannii* (JALAVA et al., 1998; PRIESTNALL et al., 2004), *H. felis* (NORRIS et al., 1999; SIMPSON et al., 2000; STRAUSS-AYALI et al., 2001), *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* (VAN DEN BULCK et al., 2005) e *H. pylori* (HANDT et al., 1994; SIMPSON et al., 2001; CAMARGO, 2002).

Em seres humanos, o *H. pylori* tem sido associado a gastrites, úlceras pépticas, adenocarcinomas e linfoma gástrico tipo MALT (WACK et al., 1997; YAMAZAKI et al., 2002). A infecção por *H. pylori* em pessoas causa aumento da proliferação celular e da apoptose, causando um desequilíbrio na homeostase da mucosa gástrica (DE FREITAS et al., 2004). O *H. heilmannii*, espécie comumente encontrado em animais (PRIESTNALL et al., 2004), apresenta ocorrência de 0,2 a 4,0% em pacientes humanos com gastrite (JALAVA et al., 2001) e já foi apontado como agente carcinogênico nos humanos (PRIESTNALL et al., 2004). Gatos naturalmente infectados com *H. pylori* oriundos de um gatil comercial apresentaram gastrite crônica, presença de nódulos linfóides, atrofia glandular e fibrose (SIMPSON et al., 2001). Camargo em 2002 relatou *H. pylori* em dois gatos com sinal clínico

gástrico, sendo um deles com infiltrado inflamatório mononuclear. Quando da inoculação de *H. felis* em gatos livres de patógenos específicos (*specific-pathogen-free* - SPF), houve desenvolvimento de hiperplasia folicular linfóide, gastrite discreta, porém com função gástrica secretora normal (SIMPSON et al., 2000).

Diferentemente dos seres humanos, a real patogenicidade das helicobacterioses gástricas em gatos não está bem elucidada, embora já tenham sido reportadas gastrite acompanhada de degeneração glandular e fibrose em gatos infectados (HERMANNNS et al., 1995; YAMASAKI et al., 1998). O objetivo deste estudo foi verificar as espécies mais comumente encontradas na mucosa gástrica de gatos e se há associação entre infecção por *Helicobacter* spp., alterações histológicas e proliferação de células epiteliais gástricas.

3.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.2.1 Local

Foram realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina/PR, as biópsias gástricas dos gatos. O trabalho foi desenvolvido junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP – UEL), nos laboratórios de Anatomia Patológica e de Virologia Animal.

3.2.2.2 Animais / Amostras

Foram utilizadas amostras de biópsia gástrica de 23 gatos domésticos domiciliados em Londrina-PR, sendo 13 machos e 10 fêmeas, com idade entre 8 meses a 13 anos. Dezoito

gatos eram assintomáticos e cinco apresentavam algum distúrbio gastrointestinal primário que, a partir de então, foram encaminhados para o Serviço de Endoscopia para serem submetidos à gastroscopia e biópsia gástrica. O procedimento foi realizado mediante o consentimento do proprietário, durante o período de 2002 a 2005. Nenhum dos animais foi submetido a tratamento por antibióticos, antiinflamatórios ou antiácidos nas quatro semanas precedentes à colheita. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

3.2.2.3 Endoscopia e colheita de fragmentos da mucosa gástrica

Sob jejum prévio os animais foram submetidos à anestesia geral intravenosa com propofol (5 mg/Kg). Com o paciente em decúbito lateral direito, foi realizada gastroscopia com gastroscópio pediátrico marca FIJINON[®], modelo UGI-7 acoplado a fonte de luz marca MICRONAL[®], modelo 0200. Utilizando pinça de biópsia endoscópica de 2,8 cm de diâmetro, marca OLYMPUS[®] devidamente esterilizada, foram colhidos três fragmentos do antro pilórico, corpo e fundo gástrico. Para o exame histológico, duas amostras de cada região foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas e posteriormente álcool 70%. Para realização da técnica da PCR, uma amostra de cada região foi agrupada e em microtubo livre de RNase e DNase, mantidos em freezer a -20°C até o momento do processamento.

3.2.2.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Previamente à extração de DNA, foi realizada digestão dos fragmentos gástricos utilizando 25 µL de proteinase K (20 mg/mL), adicionado de 200 µL de tampão de lise pH 8 (100 mM de cloreto de sódio, 100 mM de EDTA e 0,5% de dodecil sulfato de sódico), sendo

então agitado em aparelho vórtex e incubados em banho-maria a 56°C durante 3 horas. O DNA foi extraído a partir do de 500 µL do material resultante da digestão de acordo com Barreiros et al. (2004).

Para reação de amplificação todas as reações foram preparadas com volume final de 25 µL, sendo 5 µL de mix de DNA (1 µL do DNA extraído, 3,0 µL de água e 1 µL de cada primer a 20 pM) e 20 µL do mix da reação contendo 11,75 µL água, 0,4 mM de cada dNTP, 1X tampão de PCR (20 mM Tris –HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,25 U de *Taq platinum* DNA polimerase e 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen™ Life Technologies, USA). A seqüência dos *primers* e o tamanho dos produtos amplificados estão descritos no quadro 1 (CAMARGO et al., 2003). Todos os primers utilizados foram produzidos pela GIBCO BRL PRODUCTS – Life Technologies do Brasil Ltda. A reação de amplificação foi executada em termociclador modelo PTC-100™ (MJ Reserch INC) como descrito na quadro 2. Foi utilizado controle negativo da extração de DNA água ultra-pura estéril.

Quadro 1 – Agentes estudados, referências, seqüências dos *primers*, produtos amplificados [pares de base (pb)]. Londrina, 2007

ESPÉCIES	REFERÊNCIAS	PRIMERS	Produtos amplificados
<i>Helicobacter</i> spp. Gene 16S rRNA	GERMANI et al. (1997)	(f) 5' AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA 3' (r) 5' GTG CTT ATT CST NAG ATA CCG TCA T 3'	399 pb
<i>H. bizzozeronii</i> ou <i>H. salomonis</i> Gene ureB	NEIGER et al. (1999)	(f) 5' ACT AGG CGA TAC CAA CTT GAT TT 3' (r) 5' TTC TTC AGC TGC GCG GAG CAT GC 3'	499 pb
<i>H. felis</i> Genes ureA e ureB	GERMANI et al. (1997)	(f) 5' GTG AAG CGA CTA AAG ATA AAC AAT 3' (r) 5' GCA CCA AAT CTA ATT CAT AAG AGC 3'	241 pb
<i>H. heilmannii</i> Gene ureB	NEIGER et al. (1998)	(f) 5' GGG CGA TAA AGT GCG CTT G 3' (r) 5' CTG GTC AAT GAG AGC AGG 3'	580 pb
<i>H. pylori</i> Gene ureB	CLAYTON et al. (1992)	(f) 5' GCC AAT GGT AAA TTA GTT 3' (r) 5' CTC CTT AAT TGT TTT TAC 3'	411 pb

Fonte: CAMARGO et al., 2003

Quadro 2 – Condições de tempo e temperatura utilizadas nas PCRs para gênero *Helicobacter* e espécies de interesse do estudo. Londrina, 2007

Espécies testadas	Desnaturação	Temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão	Nº de ciclos e duração	Extensão final
<i>Helicobacter</i> spp.	95°C por 5 min	95°C, 65°C e 72°C	40 por 1 min	72°C / 10 min
<i>H. bizzozeronii</i> *	94°C por 5 min	94°C, 63°C e 72°C	40 por 1 min	72°C / 10 min
<i>H. heilmannii</i>	94°C por 3 min	94°C, 59°C e 72°C	35 por 1 min	72°C / 5 min
<i>H. felis</i>	94°C por 5 min	94°C, 62°C e 72°C	40 por 1 min	72°C / 10 min
<i>H. pylori</i>	95°C por 5 min	94°C, 45°C e 72°C	40 por 1 min	72°C / 10 min

*ou *H. salomonis*. Fonte: Modificado de CAMARGO et al., 2003

Amostras de todos os animais foram submetidas às reações de amplificação com os *primers* gênero-específico. Aquelas amostras em que as reações geraram produtos do tamanho esperado (399 pb), foram, posteriormente, testadas para as quatro espécies propostas neste estudo.

Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese de agarose a 2,5% com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão de TEB pH 8,4 (89 mM Tris HCl, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), submetidos à eletroforese, em voltagem constante 100 V por aproximadamente 40 minutos e visualizado em trans-iluminador sob luz ultravioleta. O registro fotográfico foi realizado utilizando sistema digital Kodak (cúpula Kodak EDAS e KODAK digital câmera DC290 ZOOM – EASTMAN KODAK COMPANY).

3.2.2.5 Exames Histológico e Histoquímico

Após as amostras terem sido fixadas, foram submetidas à desidratação em soluções de concentração crescente de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram corados pelos métodos de hematoxilina e eosina (HE) e Warthin Starry (WS) para exame histológico e pesquisa de bactérias espiraladas, respectivamente.

Histopatologia: A interpretação dos resultados histopatológicos foi baseada nos critérios de avaliação histológica propostos por Happonen et al. (1998), em que se avaliou o número de folículos linfóides, a intensidade do infiltrado inflamatório e o tipo de células presentes, utilizando-se as objetivas de 10 e 40x, respectivamente. As lâminas submetidas à impregnação argêntea (WS) foram avaliadas quanto à morfologia e contagem de bactérias sugestivas de *Helicobacter* spp. presentes em cada região do estômago, em três campos visuais escolhidos aleatoriamente e com objetiva de 100x, levando-se em conta também a distribuição na mucosa gástrica. A classificação da intensidade de colonização bacteriana seguiu o seguinte escore: (0) negativo ou ausência de bactéria; (1) colonização discreta, com presença de uma a 10 bactérias; (2) moderada, 11 a 30 bactérias; (3) intensa, 31 a 50 bactérias; e (4) acentuada, quando ultrapassava 50 bactérias por campo. A intensidade do infiltrado inflamatório em cada região do estômago foi graduada conferindo-se os escores: (0) quando presentes até 4 células inflamatórias; (1) de 5 a 15 células por campo; (2) de 16 a 25; (3) mais de 25 células por campo. A mucosa gástrica foi considerada normal quando da presença de 0 a 4 linfócitos esparsos e ausência ou presença de até 4 neutrófilos e/ou eosinófilos e ausência de folículos linfóides ou com folículos linfóides solitários e esparsos e sem alterações epiteliais. A gastrite foi classificada como discreta quando o infiltrado era composto por 5 a 14 células inflamatórias; moderada quando presente de 15 a 25 células inflamatórias e acentuada quando o infiltrado apresentava mais de 25 células e com três ou mais folículos linfóides. O diagnóstico de gastrite foi estabelecido quando o infiltrado inflamatório estava presente em pelo menos uma região gástrica. A gastrite foi considerada regional quando não estava presente em todas as regiões gástricas.

Histoquímica: Para a análise histoquímica foram selecionados oito gatos de ambos os sexos, de idades variadas, com raça e sem raça definida, determinando os grupos G1 (três animais negativos para *Helicobacter* spp.) e G2 (cinco infectados por *Helicobacter* spp.). A

proliferação celular foi avaliada utilizando método *Argyrophil Nucleolar Organizer Regions* (AgNOR). Cortes de 4 μm de espessura foram montadas em lâmina para posterior coloração de acordo com modificado de Crocker e Skilbeck (1987). A avaliação quantitativa foi realizada contando-se o número de NORs em um total de 100 células das regiões do colo e istmo das glândulas gástricas com a objetiva de 100x. O registro fotográfico foi realizado com câmera digital MOTICAM[®] 2000 2.0 M Pixel USB 2.0, e programa MOTIC[®] Images Plus 2.0 M.L. para mensuração da área (morfometria) de cada NOR contada.

3.2.2.6 Análise estatística

Para todas as análises foi utilizado o programa SAS – *Statistics Analysis Systems* V.8 for Windows.

Para verificar a intensidade da colonização bacteriana e do infiltrado inflamatório entre as regiões gástricas, e ainda associar a espécie infectante com o infiltrado inflamatório foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para observar se houve correlação entre densidade de colonização bacteriana e infiltrado celular foi realizado teste de Pearson.

O teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher foi utilizado para avaliar se a presença de *Helicobacter* spp. estava associada com gastrite, degeneração epitelial glandular, fibrose da lâmina própria e presença de folículos linfóides.

Para análise da associação entre presença e ausência de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de gatos e a proliferação celular, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA).

Considerando um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

3.2.3 RESULTADOS

3.2.3.1 Warthin Starry

Dos 23 gatos avaliados, 20 (87%) apresentaram estruturas bem espiraladas, sugestivas de grandes helicobactérias dispostas na superfície do muco, no interior da fóvea, das glândulas gástricas e intracelularmente (Figura 1). Os escores de intensidade de colonização bacteriana variaram de 0 a 4 como podem ser observados na tabela 1. Em três animais não foi possível avaliar a região de fundo. Oito animais apresentaram escores semelhantes nas três regiões, sendo três e cinco gatos com escores 1 e 2, respectivamente. Apenas um gato da população estudada apresentou escore 4 na região de antro pilórico. Não houve diferença significativa entre as regiões em relação à colonização bacteriana.

Em três amostras, sendo duas positivas, puderam ser observadas estruturas acastanhadas, semelhantes a bacilos, dispostas sobre a mucosa, não estando presente nos mesmos locais que as helicobactérias.

Tabela 1 – Frequência de escores de intensidade de colonização bacteriana na mucosa gástrica de gatos, de acordo com as regiões gástricas. Londrina, 2007

Escores	Antro (n=23)	Corpo (n=23)	Fundo (n=20)
0	4	4	5
1	10	6	5
2	6	11	10
3	2	2	1
4	1	0	0

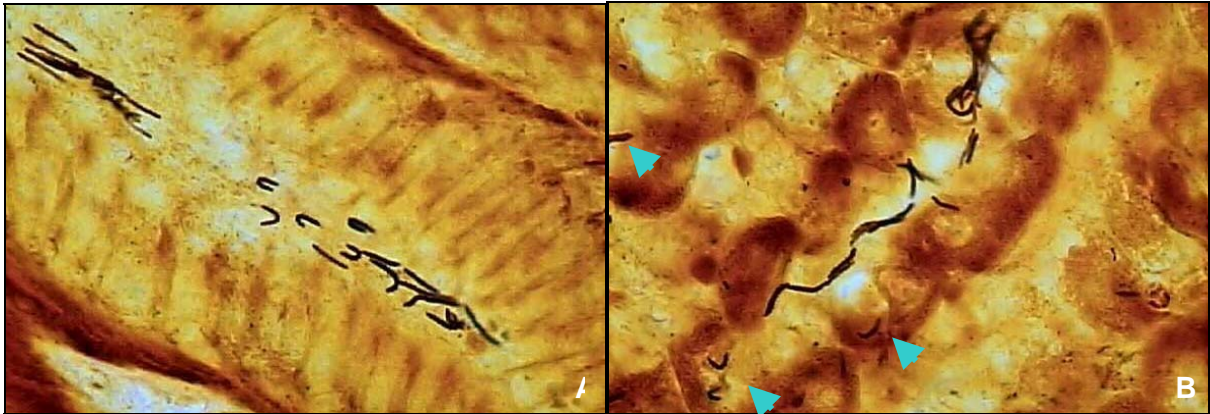


Figura 1 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato. A) Helicobactérias localizadas no interior de fóvea gástrica. B) Helicobactérias localizadas no interior de glândula gástrica e intracelular (setas). WS. Objetiva 100x (original). Londrina, 2007

3.2.3.2 PCR

Vinte dos 23 gatos foram positivos para gênero (Tabela 2 e figura 2), 19 foram positivos para *H. heilmannii* (Figura 3), dois com infecção mista com *H. felis* (Figura 4), e um negativo para as quatro espécies de interesse do estudo. Nenhum animal foi positivo para *H. pylori* ou *H. bizzozeronii* ou *H. salomonis* (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultado das PCRs de *Helicobacter* spp. da mucosa gástrica de gatos. Londrina, 2007

Resultados das PCRs	Frequência
Reações positivas para gênero e negativas para as espécies testadas	1
<i>H. heilmannii</i>	17
<i>H. heilmannii</i> e <i>H. felis</i>	2
Negativos	3

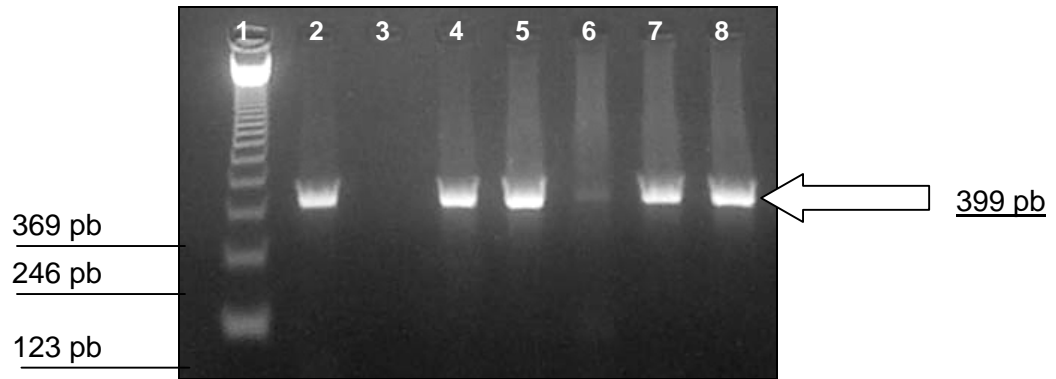


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA de *Helicobacter* spp. (399 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de gato. Canaleta 1: padrão molecular de 123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 a 8: amostras provenientes de gatos. Londrina, 2007.

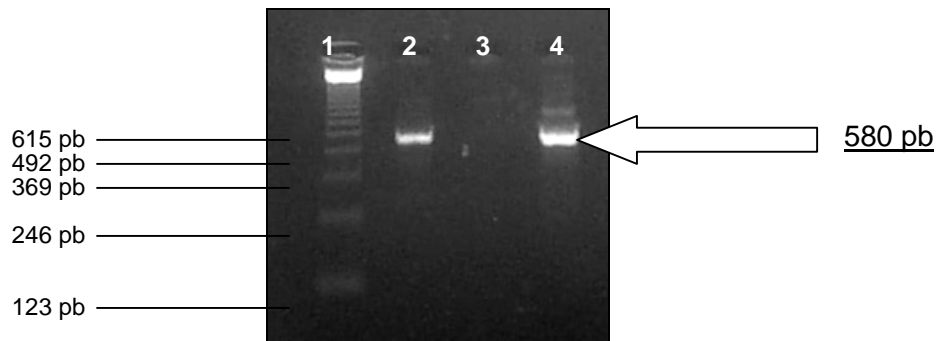


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação do gene ureB de *Helicobacter heilmannii* (580 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de gato. Canaleta 1: padrão molecular de 123 pb; canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; canaleta 4: amostra proveniente de gato. Londrina, 2007.

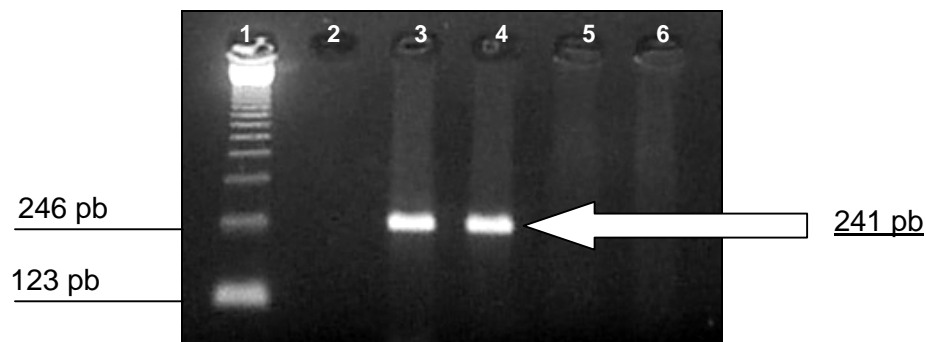


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%, corada com brometo de etídio, dos produtos de amplificação dos genes ureA e ureB de *Helicobacter felis* (241 pb) obtidos pela técnica de PCR realizada com fragmentos de mucosa gástrica de cão. Canaleta 1: padrão molecular de 123 pb; canaleta 2: controle negativo; canaletas 3 a 6: amostras provenientes de gatos. Londrina, 2007.

3.2.3.3 Alterações histológicas

O antro pilórico foi a região com maior frequência de alterações histológicas. Alterações no epitélio gástrico, na lâmina própria e a presença de folículos linfóides foram observadas. Cinco animais apresentaram a mucosa normal (Tabela 3).

Infiltrado inflamatório mononuclear foi constatado em 78% (18/23) dos gatos, em pelo menos uma região gástrica (Tabela 4). Dos animais positivos, 16 apresentaram gastrite discreta crônica em pelo menos uma região do estômago, e um, gastrite moderada na região do antro. Oito animais apresentaram infiltrado inflamatório nas três regiões, um deles pertencente ao grupo negativo. Não houve correlação entre intensidade de colonização bacteriana e intensidade de infiltrado inflamatório ($p > 0,05$). Embora a região de antro tenha apresentado uma maior frequência de células inflamatórias, não houve diferença estatística. De acordo com os resultados obtidos, não houve relação entre espécie infectante e intensidade do infiltrado celular ($p = 0,14$).

Quatorze gatos, todos positivos para *Helicobacter* spp., apresentaram pelo menos um e não mais que cinco folículos linfóides. (Figura 5); sendo a região de antro a com maior ocorrência de folículos (Tabela 3). Quatro animais apresentaram folículos linfóides em antro e fundo. Todas as regiões afetadas estavam colonizadas por bactéria. Apenas um gato apresentou agregado linfocitário sem a presença de infiltrado inflamatório. Dois animais apresentavam três agregados em antro, com escores de colonização bacteriana 1 e 2, respectivamente, e um deles com gastrite moderada crônica na região afetada. Outros dois apresentaram 4 e 5 agregados em antro pilórico, com intensidades de colonização máxima e moderada, respectivamente. Houve significância estatística entre presença de *Helicobacter* spp. e a presença de nódulos linfóides ($p = 0,04$).

Em quatro animais infectados observou-se erosão do epitélio superficial da mucosa gástrica (Figura 6), sendo que em três na região fúndica. Dos três animais negativos, dois apresentaram fibrose discreta nas regiões de antro e fundo. Em relação à fibrose, independentemente da intensidade, em 85% (17/20) dos animais com *Helicobacter* spp. constatou-se essa alteração em pelo menos uma região (Tabela 3). Quatro gatos apresentaram fibrose nas três regiões avaliadas. Fibrose acentuada foi vista em um animal com escore 4 de colonização bacteriana e com infiltrado inflamatório mononuclear discreto.

Doze gatos apresentavam degeneração glandular em pelo menos uma região do estômago; sendo que um apresentou essa lesão nas três áreas. Em dois animais observou-se degeneração glandular acentuada na região de antro, acompanhada de colonização bacteriana e infiltrado inflamatório discreto. As lesões de fibrose e degeneração glandular ocasionalmente estavam acompanhadas de infiltrado celular inflamatório (Figura 7). Não houve associação entre presença de *Helicobacter* spp. e presença de gastrite ($p = 0,54$), degeneração glandular ($p = 0,09$) e fibrose da lâmina própria ($p = 0,45$).

Tabela 3 – Lesões gástricas histológicas e sua frequência de acordo com as regiões de biópsia gástrica em gatos. Londrina, 2007

Achado histopatológico	Frequência das regiões gástricas afetadas					
	Gatos Positivos (n=20)			Gatos Negativos (n=03)		
	Antro	Corpo	Fundo*	Antro	Corpo	Fundo
Superfície epitelial gástrica						
Erosão	0	1	3	0	0	0
Lâmina própria						
Nódulo linfóide	12	2	5	0	0	0
Infiltrado mononuclear grau 1	13	10	9	1	2	2
Infiltrado mononuclear grau 2	1	0	0	0	0	0
Fibrose discreta	11	7	7	1	0	1
Fibrose acentuada	4	0	0	0	0	0
Edema	1	0	0	0	0	0
Glândulas gástricas						
Degeneração glandular discreta	7	2	8	0	0	0
Degeneração glandular acentuada	2	0	0	0	0	0

*Considerar n=17

Tabela 4 – Frequência das lesões gástricas histológicas em gatos de acordo com presença ou ausência de infecção por *Helicobacter* spp. Londrina, 2007

Lesão gástrica	Total (n=23)	Positivos (n=20)	Negativos (n=9)	Valor de p
Gastrite discreta crônica	17	15	2	-
Gastrite moderada crônica	1	1	0	0,54
Nódulos linfóides	14*	14*	0*	0,04
Erosão	4	4	0	-
Degeneração glandular	12	12	0	0,09
Fibrose da lâmina própria	19	17	2	0,45
Edema	1	1	0	-

Teste Exato de Fisher: significância quando $p \leq 0,05$. * Diferença significativa

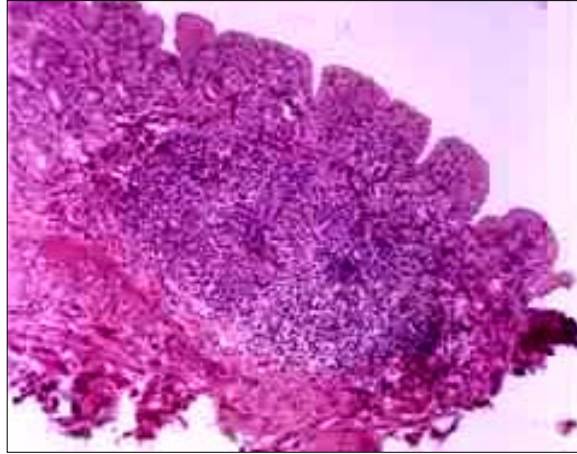


Figura 5 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato infectado por *Helicobacter* spp. Nódulo linfóide. H.E. Objetiva 10x (original). Londrina, 2007.

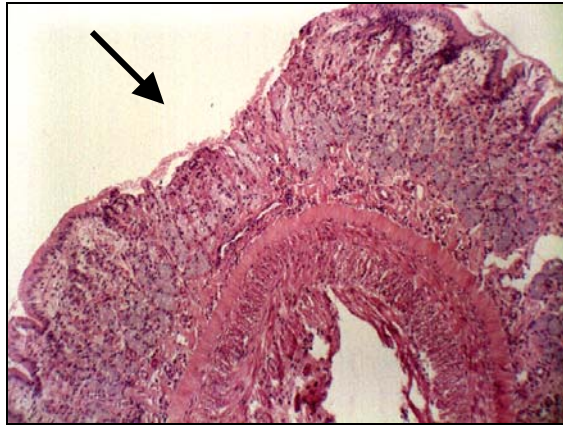


Figura 6 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato infectado por *Helicobacter* spp. Erosão epitelial gástrica (seta). H.E. Objetiva 20x (original). Londrina, 2007.

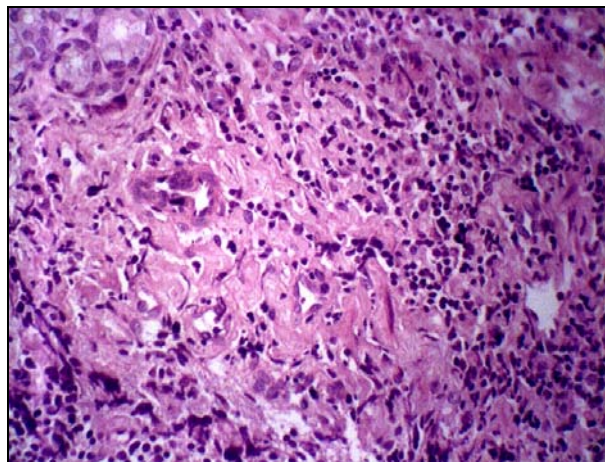


Figura 7 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato infectado por *Helicobacter* spp. Infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração glandular e fibrose discreta em lâmina própria. H.E. Objetiva 40x (original). Londrina, 2007.

3.2.3.4 Histoquímica: proliferação celular

Os valores obtidos estão dispostos na tabela 5. A proliferação celular foi mensurada contando-se os pontos representativos das NORs (Figura 8) e medindo a área destas regiões (μm^2).

Não houve diferença significativa em relação ao número ($p = 0,417$) e área das NORs ($p = 0,43$) nas três regiões gástricas avaliadas dos animais do G1. Já no G2, houve diferença significativa entre as regiões gástricas de antro e corpo ($p = 0,002$) e antro e fundo ($p = 0,041$). Na comparação entre os animais negativos e positivos, constatou-se diferença significativa no número de NORs nas regiões de corpo ($p < 0,001$) e fundo ($p < 0,001$).

Quanto à área das NORs, no G2 a região de corpo apresentou área significativamente maior que antro ($p = 0,0002$) e fundo ($p = 0,044$). Na comparação entre os negativos e positivos, verificou-se diferença significativa somente na região de corpo ($p = 0,0001$).

Tabela 5 – Valores de média (\pm desvio padrão) da quantificação da proliferação celular de mucosa gástrica de cães negativos e positivos para *Helicobacter* spp., das regiões de antro, corpo e fundo, utilizando método histoquímico de AgNOR. Londrina, 2007

Parâmetro	Valores de média (\pm desvio padrão) de proliferação celular					
	G1 - Negativos			G2 - Positivos		
	Antro	Corpo	Fundo	Antro	Corpo	Fundo
Nº NORs	1,16 \pm 0,36	1,12 \pm 0,33 ^e	1,13 \pm 0,34 ^f	1,34 \pm 0,54 ^{a,b}	1,24 \pm 0,47 ^{a,e}	1,27 \pm 0,52 ^{b,f}
Morfometria (μm^2)	1,38 \pm 0,77	1,32 \pm 0,56 ^g	1,35 \pm 0,59	1,06 \pm 0,55 ^c	1,17 \pm 0,57 ^{c,d,g}	1,11 \pm 0,50 ^d

ANOVA: letras iguais, significância estatística. a) $p = 0,003$; b) $p = 0,041$; c) $p = 0,0002$; d) $p = 0,044$; e) $p = 0,00008$; f) $p = 0,00005$; g) $p = 0,00015$

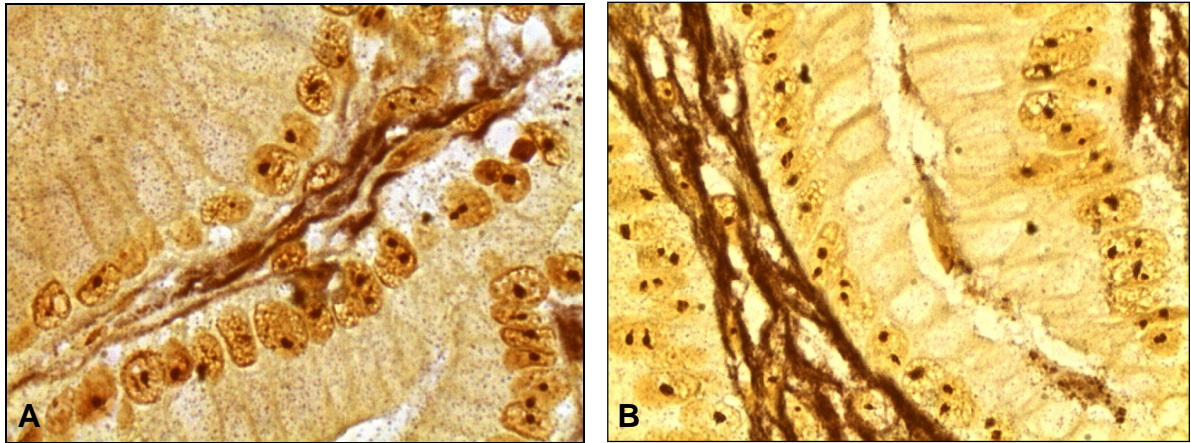


Figura 8 – Fotomicrografia de mucosa gástrica de gato. A) Gato negativo para *Helicobacter* spp. B) Gato positivo para *Helicobacter* spp. AgNOR. Objetiva de 100x (Original). Londrina, 2007

3.2.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, *Helicobacter* spp. estava presente na mucosa gástrica de 20/23 (87%) dos animais. Esse resultado está de acordo com a alta prevalência relatada em outros países como Alemanha (GEYER et al., 1993; HERMANNNS et al., 1995), Finlândia (HAPPONEN, et al., 1996a), Reino Unido (PAPASOULIOTIS et al., 1997), Suíça (NEIGER et al., 1998), Japão (YAMASAKI et al., 1998), Estados Unidos da América (EUA) (NORRIS et al., 1999; STRAUSS-AYALI et al., 2001; VAN DEN BULCK et al., 2005) e inclusive no Brasil (CAMARGO, 2002), portanto a infecção nessa espécie animal é bastante comum. A ocorrência de helicobactérias varia de acordo com a distribuição geográfica e ainda condição clínica do paciente. Com esse intuito, vários autores avaliaram gatos aparentemente saudáveis e com algum sinal clínico gástrico primário, e obtiveram taxas de infecção que variaram de 41 a 100% e 56 a 100%, respectivamente (GEYER et al., 1993; HERMANNNS et al., 1995; HAPPONEN, et al., 1996a; PAPASOULIOTIS et al., 1997; NEIGER et al., 1998; YAMASAKI et al., 1998; STRAUSS-AYALI et al., 2001; CAMARGO, 2002). Otto et al.

(1994), avaliando a mucosa gástrica de gatos jovens e adultos observaram uma ocorrência de 70 e 97%, respectivamente.

Tanto a técnica de WS quanto a PCR forneceram o mesmo resultado, em se tratando da ocorrência de *Helicobacter* spp. infectando estômago de felinos domésticos, demonstrando alta sensibilidade dos testes. Happonen et al. (1996b) e Neiger et al. (1998) compararam testes de diagnóstico para *Helicobacter* spp. e observaram uma variação entre as taxas de infecção conforme o método utilizado. Dessa forma, a associação de exames diagnósticos para confirmação da infecção por helicobactérias gástricas se torna importante.

Por meio da impregnação argêntea, foi possível verificar ainda que as estruturas sugestivas de *Helicobacter* spp. não eram da espécie *H. pylori* e proceder a contagem para graduar a intensidade de colonização. Essa técnica possibilitou ainda determinar a localização das bactérias que predominaram no muco da superfície epitelial, sendo também observadas no interior de fóveas, glândulas e intracelularmente. A técnica de PCR apresenta um custo mais elevado em relação ao método de WS, mas apresenta como vantagem a identificação das espécies infectantes com uso de *primers* espécie-específicos.

Yamasaki et al. (1998) notaram uma colonização bacteriana mais intensa na região de fundo do que no antro pilórico. No entanto, foi observado neste trabalho que os escores de densidade bacteriana mostraram-se semelhantes, sugerindo colonização homogênea nas três regiões gástricas avaliadas, como relatado previamente (HAPPONEN et al., 1996a; NORRIS et al., 1999; STRAUSS-AYALI et al., 2001; CAMARGO, 2002).

Gatos podem apresentar infecção por diferentes espécies de *Helicobacter* e também infecção mista. Porém, somente com a PCR é possível a identificação da espécie infectante. Embora já tenham sido identificadas na mucosa gástrica de gatos as espécies *H. pylori* (HANDT et al., 1994; CAMARGO, 2002), *H. bizzozeronii* ou *H. salomonis* (CAMARGO, 2002), e *H. salomonis* (VAN DEN BULCK et al., 2005), nenhum dos animais

deste estudo apresentou infecção por essas espécies. Neiger et al. (1998) e Strauss-Ayali et al. (2001) obtiveram resultados negativos na tentativa de se identificar *H. pylori* em felinos. Recentemente foi identificado colonizando a mucosa gástrica de felinos o “*Candidatus Helicobacter suis*” (VAN DEN BULCK et al., 2005).

A alta taxa de infecção pela espécie *H. heilmannii* vai de encontro com o achado de Neiger et al. (1998), quando relataram uma frequência de 78%, e ainda afirmaram que gatos são frequentemente infectados por esta espécie. No Brasil, Camargo (2002) observou uma taxa de infecção por *H. heilmannii* de 64%, superior a 38% de Strauss-Ayali et al. (2001) nos EUA. A espécie *H. felis* também foi identificada nos gatos, tanto em infecções únicas (JALAVA et al., 1998), como em co-infecções (STRAUSS-AYALI et al., 2001; CAMARGO, 2002; VAN DEN BULCK et al., 2005). A espécie infectante pode variar de acordo com a localização geográfica e ainda características dos grupos de animais utilizados no estudo (GEYER et al., 1993; PRIESTNALL et al., 2004).

Sabe-se que humanos podem estar infectados com as grandes helicobactérias, isto é, as não-*H. pylori*, comumente encontradas na mucosa gástrica dos animais (PRIESTNALL et al., 2004; DE GROOTE et al., 2005; VAN DEN BULCK et al., 2005). Supõe-se que a alta taxa de *H. heilmannii* em gatos, cães e suínos tenha implicações na saúde pública, já que é uma espécie comprovadamente patogênica para o humano (DIETERICH et al., 1998). Porém, um estudo, realizado com cães e gatos oriundos dos EUA e Alemanha, demonstrou que quando infectados por *H. heilmannii* oferecem um risco zoonótico pequeno, já que os subtipos mais envolvidos nos mesmos seriam 2 e 4, e que os suínos representam um risco maior, por geralmente apresentarem o subtipo 1, mais comumente encontrado em seres humanos (PRIESTNALL et al., 2004). De acordo com os resultados obtidos por De Groote et al. (2005) e Van den Bulck et al. (2005) o contato com cães, gatos e suínos pode ser considerado um fator de risco para os humanos na aquisição de infecção por *H. não-pylori*.

A ausência de *H. pylori* nesses gatos domiciliados e de outros estudos (HAPPONEN et al., 1998; JALAVA et al., 1998; NEIGER et al., 1998; NORRIS et al., 1999) sugere que esta espécie animal não seja reservatório para humanos, embora Handt et al. (1994) e Camargo (2002) terem relatado *H. pylori* infectando a mucosa gástrica de gatos de gatis.

Apenas um animal positivo foi negativo para todas as espécies testadas, taxa inferior à relatada por Strauss-Ayali et al. (2001) e Camargo (2002). Isso demonstra que outra espécie de *Helicobacter* estava envolvida, e que haveria necessidade do uso de outros *primers* espécie-específicos.

A presença de infiltrado inflamatório discreto a moderado na maioria dos animais está de acordo com outros relatos (GEYER et al., 1993; HAPPONEN et al., 1996a; NORRIS et al., 1999; SIMPSON et al., 2000; CAMARGO, 2002; STRAUBINGER et al., 2003). O infiltrado inflamatório teve frequência semelhante em todas as regiões gástricas, diferentemente do observado por Yamasaki et al. (1998) que observaram maior ocorrência na região fúndica dos animais positivos e antro dos negativos. Já Straubinger et al. (2003) detectaram o infiltrado inflamatório mais frequentemente na região do cárdia dos positivos do que dos negativos. Em relação à ausência de associação entre intensidade de colonização e infiltrado inflamatório, os resultados são concordantes aos de Papisoulitis et al. (1997) e Neiger et al. (1998), diferindo dos de Hermanns et al. (1995) e Happonen et al. (1996a).

Neste estudo não se observou associação significativa entre espécie infectante e infiltrado inflamatório, no entanto, Eaton et al. (1996) e Neiger et al. (1998) demonstraram que a colonização por *H. heilmannii* na mucosa gástrica de gatos está relacionada à gastrite discreta a moderada. Em estudo realizado com gerbils, os autores demonstraram que a espécie *H. felis* apresenta uma maior patogenicidade do que *H. bizzozeronii* após inoculação experimental por via oral (DE BOCK et al., 2006).

Simpson et al. (2000) ao avaliarem o efeito do *H. felis* na mucosa gástrica de gatos, constataram o desenvolvimento de hiperplasia folicular linfóide e gastrite discreta, mas com função secretora gástrica normal. Dos dois animais acometidos por essa espécie no presente trabalho, um apresentou os mesmos tipos de alterações na mucosa gástrica.

A presença de nódulos linfóides em gatos infectados por *Helicobacter* spp. já foi reportada por Otto et al. (1994); Hermanns et al. (1995); Happonen et al. (1996a), Simpson et al. (2000) e Straubinger et al. (2003). Embora Strauss-Ayali et al. (2001) tenham detectado essas estruturas em suas amostras, não observaram correlação com a infecção por helicobactérias. Já foi sugerido que a presença de nódulos linfóides na mucosa gástrica de gatos seria uma resposta aos antígenos do *Helicobacter* spp. (OTTO et al., 1994; STRAUBINGER et al., 2003), o que corrobora com os resultados deste estudo que indicaram associação significativa entre estas variáveis.

Foram identificadas alterações gástricas como erosão epitelial, fibrose da lâmina própria e degeneração glandular. Alterações mínimas foram observadas nos gatos não infectados, de modo semelhante aos achados de Simpson et al. (2001). Já havia sido observado que a região de antro pilórico é mais acometida por lesões do que as outras (SIMPSON et al., 2001), e embora não tenha sido feita essa análise no presente estudo, verificou-se uma maior frequência de lesões nesta região. Happonen et al. (1996a) não reportaram alterações teciduais gástricas com exceção do infiltrado celular inflamatório.

Fibrose na lâmina própria foi observada de forma focal ou difusa de modo semelhante a outros estudos (HERMANNNS et al., 1995; YAMASAKI et al., 1998; STRAUBINGER et al., 2003), porém com uma frequência maior à observada por Hermanns et al. (1995) e Yamasaki et al. (1998) quando da avaliação das regiões de antro e fundo de gatos aparentemente sadios e doentes. Os autores, apesar da descrição da lesão, também não a relacionaram com a presença de *Helicobacter* spp.

Degeneração glandular foi freqüentemente observada, assim como outros autores já haviam relatado (GEYER et al., 1993; YAMASAKI et al., 1998); além disso, Hermanns et al. (1995) observaram a existência de correlação positiva entre densidade de colonização por helicobactérias e degeneração glandular, embora não esclarecessem a patogenia. Ocasionalmente, todo o segmento glandular estava afetado e a presença de vacúolos nas células parietais foi observada com relativa freqüência, principalmente quando da infecção intracelular (HERMANNNS et al., 1995; YAMASAKI et al., 1998). Os autores observaram a presença de erosão e edema na lâmina própria em alguns casos, quando da pesquisa de *Helicobacter* spp., enquanto Geyer et al. (1993) relatou apenas erosão nas suas amostras.

O *H. pylori* causa inflamação persistente no estômago de alguns pacientes humanos que pode evoluir para um processo neoplásico (PEEK e BLASER, 1997). As alterações nas condições hiperplásicas e neoplásicas podem ser avaliadas obtendo-se informações quanto à estrutura e atividade nucleolar nessas situações com técnicas para avaliação da proliferação celular, como a técnica histoquímica AgNOR (WALKER, 1988). Pelo conhecimento dos autores, não há estudo na literatura a respeito de proliferação celular na mucosa gástrica de gatos em associação à infecção por *Helicobacter* spp.

Preziosi et al. (2000) avaliaram por meio da técnica de AgNOR a patogênese das lesões da *pars esophagea* em suínos e concluíram que a proliferação celular foi um evento prévio nas lesões de degeneração e ulceração dessa região, ocorrendo dessa forma um desequilíbrio entre a proliferação e apoptose celular. Experimentalmente demonstrou-se que infecções por *H. felis*, *H. pylori* e *H. bizzozeronii* em gerbils ou ratos estão associadas a um aumento na proliferação celular (COURT et al., 2002; DE BOCK et al., 2006). No presente trabalho, a presença de *Helicobacter* spp. teve relação com aumento na proliferação celular nas regiões de corpo e fundo gástricos, à semelhança do que foi descrito em pacientes humanos infectados por *H. pylori* (STEININGER et al., 1995; MISRA et al., 2000; DE

FREITAS et al., 2004). Sabe-se ainda que determinados subtipos de *H. pylori* induzem maior proliferação celular (ROKKAS et al., 1999; DE FREITAS et al., 2004).

Em relação à morfometria, constatou-se que gatos negativos apresentaram área das NORs numericamente maior que os infectados por *Helicobacter* spp., embora só houvesse correlação estatística na região de corpo, como foi reportado também por De Freitas et al. (2004). A análise qualitativa (parâmetros morfométricos e morfológicos) das NORs, demonstra que em lesões malignas, além de maior número, as áreas das NORs estão diminuídas de tamanho, dispersas pelo núcleo e com forma e contornos irregulares, representando uma alteração do mecanismo de proliferação e diferenciação, juntamente com a síntese de proteínas oncogênicas presentes em carcinomas (CABRINI et al., 1992).

Pode ser observado neste trabalho que os nódulos linfóides encontrados na mucosa gástrica de gatos e que o aumento do índice de proliferação celular estavam associados à infecção por *Helicobacter* spp., eventos estes observados também em humanos infectados por *H. pylori*. É possível ainda observar co-infecções por *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica dessa espécie animal, sem estar relacionadas com achados como infiltrado inflamatório, e lesões histológicas de degeneração glandular e fibrose da lâmina própria, assim como sinais clínicos gástricos primários. Diante disso, o gato pode servir de modelo experimental para estudos de patogenicidade relacionados à *Helicobacter* não-*pylori*.

AGRADECIMENTO

À Profa. Dra. Patrícia Tholon, pelas análises estatísticas contidas nesse trabalho, por toda sua paciência e dedicação.

REFERÊNCIAS

- Barreiros, M.A., Alfieri, A.F., Medici, K.C., Leite, J.P., Alfieri, A.A., 2004. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* v.51, 104-109.
- Bizzozero G. Sulla presenza di batteri nelle ghiandole gastriche del cane (in Italian), 1893. *Atti della Reale Accademia delle Scienze di Torino* 28, 249.
- Cabrini R.L., Schwint A.E., Mendez A., Femopase F., Lanfranchi H., Itoiz M.E., 1992. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology Medicine* 21, 275-279.
- Camargo P.L. Identificação das espécies de *Helicobacter* spp. presentes na mucosa gástrica de cães, gatos e seres humanos, e sua correlação com as alterações da mucosa. 112 f. Tese (Clínica Médica) - Clínica Veterinária. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- Camargo, P.L., Alfieri, A.A., Bracarense, A.P.F.R.L., Menoli, R., Spinosa, S.R., Hagiwara, M.K., 2003. Use of polymerase chain reaction and enzymatic cleavage in the identification of *Helicobacter* spp. in gastric mucosa of human beings from North Paraná, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 265-68.
- Clayton C.L., Kleanthous H., Coates P.J., Morgan D.D., Tabaqchali S., 1992. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 192-200.
- Court M., Robinson P.A., Dixon M.F., Crabtree J.E., 2002. Gastric *Helicobacter* species infection in murine and gerbil models: comparative analysis of effects of *H. pylori* and *H. felis* on gastric epithelial cell proliferation. *The Journal of Infectious Diseases* 186, 1348-1352.
- Crocker J., Skilbeck N., 1987. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *Journal of Clinical Pathology* 40, 885-889.

- De Bock M., D'Herde K., Duchateau L., Hellemans A., Decostere A., Haesebrouck F., Ducatelle R., 2006. The effect of *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii* on the gastric mucosa in mongolian gerbils : a sequential pathological study. *Journal of Comparative Pathology* 135, 226-236.
- De Freitas D., Urbano M., Goulao M.H., Donato M.M., Baldaia C., Martins M.I., Souto P., Gregorito C., Figueiredo P., Gouveia H., Romaozinho J.M., 2004. The effects of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. *Hepatogastroenterology* 51, 876-882.
- De Groote D., Van Doorn L.-J., Van den Bulck K., Bañadme P., Vieth M., Stolte M., Debongnie J.-C., Burette A., Haesebrouck F., Ducatelle R., 2005. Detection of non-pylori *Helicobacter* species in "*Helicobacter heilmannii*"-infected humans. *Helicobacter* 10, 398-406.
- Dieterich C., Wiesel P., Neiger R., Blum A., Corthésy-Theulaz I., 1998. Presence of multiple "*Helicobacter heilmannii*" strains in an individual suffering from ulcers and in his two cats. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1366-1370.
- Eaton K.A., Dewhirst F.E., Paster B.J., Tzellas N., Coleman B.E., Paola J., Sherding R., 1996. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 165-3170.
- Germani Y., Dauga C., Duval P., Huerre M., Levy M., Pialoux G., Sansonetti P., Grimont P.A.D., 1997. Strategy for detection of helicobacter species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in human gastric biopsy. *Research in Microbiology* 148, 315-326.
- Geyer C., Colbatzky F., Lechner J., Hermanns W., 1993. Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. *The Veterinary Record* 133, 18-19.

Handt L.K., Fox J.G., Dewhirst F.E., Fraser G.J., Paster B.J., Yan L.L., Rozmiarek H., Rufo R., Stalis I.H., 1994. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infection and Immunity* 62, 2367-2374.

Happonen I., Saari S., Castren L., Tyni O., Hänninen M.-L., Westermarck E., 1996a. Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. *Journal of Veterinary Medicine* 43, 305-315.

Happonen I., Saari S., Castren L., Tyni O., Hänninen M.-L., Westermarck E. 1996b. Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology* 115, 117-127.

Happonen I., Linden J., Saari S., Karjalainen M., Hänninen M.-L., Jalava, K., Westermarck E., 1998. Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213, 1767-1773.

Hermanns W., Kregel, K., Breuer, W., Lechner, J., 1995. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology* 112, 307-18.

Jalava K., On S.L.W., Vandamme P.A.R., Happonen I., Sukura A., Hänninen M.-L., 1998. Isolation and identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosa. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3998-4006.

Jalava K., On S.L., Harrington C.S., Andersen L.P., Hänninen M.-L., Vandamme P., 2001. A cultured strain of “*Helicobacter heilmannii*”, a human gastric pathogen, identified as *H. bizzozeronii*: evidence for zoonotic potential of *Helicobacter*. *Emerging Infectious Disease* 7, 1036-1038.

Lecoindre P., Chevallier M., Peyrol S., Boude M., Ferrero R.L., Labigne A., 2000. Gastric helicobacters in cats (Review). *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2, 19-27.

- Lee A., Fox J.G., Otto G., Dick E.H., Krakowka S., 1991. Transmission of *Helicobacter* spp. A challenge to the dogma of faecal-oral spread. *Epidemiology and Infection* 107, 99-109.
- Misra V., Bisht D., Misra S.P., Dwivedi M., Bhatia R., 2000. Argyrophilic nucleolar organizer regions in *Helicobacter pylori*-associated gastric lesions. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 108, 448-452.
- Neiger R., Dieterich C., Burnens A., Waldvogel A., Corthésy-Theulaz I., Halter F., Lauterburg B., Schmassmann A., 1998. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 634-637.
- Neiger R., Tschudi M.E., Burnens A., Göke B., Schmassmann A., 1999. Diagnosis and identification of gastric *Helicobacter* species by polymerase chain reaction in dogs. *Microbial Ecology in Health and Disease* 11, 234-240.
- Norris C.R., Marks S.L., Eaton K.A., Torabian S.Z., Munn R.J., Solnick J.V., 1999. Healthy cats are commonly colonized with "*Helicobacter heilmannii*" that is associated with minimal gastritis. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 189-194.
- Otto G., Hazell S.H., Fox J.G., Howlett C.R., Murphy J.C., O'Rourke J.L., Lee A., 1994. Animal and public health implications of gastric colonization of cats by *Helicobacter*-like organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1043-1049.
- Papasouliotis K., Gruffydd-Jones T.J., Werrett G., Brown P.J., Pearson G.R., 1997. Occurrence of 'gastric *Helicobacter*-like organisms' in cats. *The Veterinary Record* 140, 369-370.
- Peek R.M. Jr, Blaser M.J., 1997. Pathophysiology of *Helicobacter pylori*-induced gastritis and peptic ulcer disease. *The American Journal of Medicine* 102, 200-207.
- Preziosi R., Sarli G., Marcato P.S., 2000. Cell proliferation and apoptosis in the pathogenesis of oesophagogastric lesions in pigs. *Research in Veterinary Science* 68, 189-196.

- Priestnall, S.L., Wiinberg, B., Spohr, A., Neuhaus, B., Kuffer, M., Wiedmann, M., Simpson, K.W., 2004. Evaluation of “*Helicobacter heilmannii*” subtypes in the gastric mucosas of cats and dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2144-2151.
- Rokkas T., Ladas S., Liasos C., Petridou E., Papatheodorou G., Theocharis S., Karameris A., Raptis S., 1999. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Digestive Diseases and Sciences* 44, 487-493.
- Simpson K.W., Strauss-Ayali D., Scanziani E., Straubinger R.K., McDonough P.L., Straubinger A.F., Chang Y.-F., Domeneghini C., Arebi N., Calam J., 2000. *Helicobacter felis* infection is associated with lymphoid follicular hyperplasia and mild gastritis but normal secretory function in cats. *Infection and Immunity* 68, 779-790.
- Simpson K.W., Strauss-Ayali D., Straubinger R.K., Scanziani E., McDonough P.L., Straubinger A.F., Chang Y.-F., Esteves M.I., Fox J.G., Domeneghini C., Arebi N., Calam J., 2001. *Helicobacter pylori* infection in the cat: evaluation of gastric colonization, inflammation and function. *Helicobacter* 6, 1-14.
- Steininger H., Streitberg U.v., Wunder I., Faller G., Kirchner T., 1995. Inflammatory, preneoplastic, and neoplastic changes of the gastric mucosa. *General and Diagnostic Pathology* 141, 15-19.
- Straubinger R.K., Greiter A., McDonough S.P., Gerold A., Scanziani E., Soldati S., Dailidienne D., Dailide G., Berg D.E., Simpson K.W., 2003. Quantitative evaluation of inflammatory and immune responses in the early stages of chronic *Helicobacter pylori* infection. *Infection and Immunity* 71, 2693-2703.
- Strauss-Ayali D., Scanziani E., Deng D., Simpson K.W., 2001. *Helicobacter* spp. Infection in cats: evaluation of the humoral immune response and prevalence of gastric *Helicobacter* spp. *Veterinary Microbiology* 79, 253-265.

- Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Driessen A., Debongnie J.-C., Buret A., Stolte M., Ducatelle R., Haesebrouck F., 2005. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 2256-2260.
- Wack, R.F.; Eaton, K.A.; Kramer, L.W., 1997. Treatment of gastritis in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28, 260-266.
- Walker R.A. The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins, 1988. *Histopathology* 12, 221-223.
- Yamasaki K., Suematsu, H., Takahashi, T., 1998. Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. *Journal of American Veterinary Medical Association* 212, 529-533.
- Yamazaki, Y.; Aono I., Ohya T., Shibahara T., Kadota K., 2002. Gastroduodenal adenocarcinomas and rectal adenoma in a cougar (*Felis concolor*) infected with *Helicobacter*-like organisms and spirochetes. *Journal of Veterinary Medicine Science* 64, 149-153.

4 CONCLUSÕES

- ◆ Com os métodos aqui utilizados for obtido uma ocorrência elevada de *Helicobacter* spp. gástrica em cães e gatos e, ainda foi possível determinar infecções mistas com duas ou três espécies diferentes utilizando a PCR, o que não seria possível por meio apenas da microscopia óptica;
- ◆ Foram identificadas as espécies *H. heilmannii*, *H. bizzozeronii* ou *H. salomonis* e *H. felis*; e *H. heilmannii* e *H. felis* na mucosa gástrica de cães e gatos, respectivamente;
- ◆ Há necessidade do uso de outros *primers* espécie-específicos para identificação das espécies não identificadas;
- ◆ Cães e gatos não representam importante potencial zoonótico para *H. pylori*;
- ◆ Não foi possível estabelecer associação entre infecção gástrica por *Helicobacter* spp. e infiltrado inflamatório, bem como degeneração do epitélio glandular e fibrose da lâmina própria em cães e gatos;
- ◆ *Helicobacter* spp. gástrico está associado com a presença de folículos linfóides na mucosa gástrica de gatos;
- ◆ Cães e gatos infectados por helicobactéria gástrica de cães e gatos tem uma maior taxa de proliferação celular do que aqueles não infectados.

Cães positivos para *Helicobacter* spp.

	WS	A			PCR	HE	A			C				F							
		A	C	F			Erosão	DG	FB	Edema	Erosão	DG	FB	Edema	Erosão	DG	FB	Edema			
1	C06	Positivo	1	2	1	H.spp	GDC	0	0	1					x				x	x	
2	C09	Positivo	1	2	1	H.spp	Normal	0	0	0		x	x			x			x		
3	C14	Positivo	2	2	2	H.spp	GDC	1	1	1		x	x		x	x	x		x	xx	
4	C29	Positivo	0	1	1	H.spp	GDC	1	1	1		x	x							x	
5	C32	Positivo	2	1	1	H.spp	GDC	0	1	1											
6	C33	Positivo	2	1	1	H.spp	GDC	1	1	0		x	xx						xx	x	
7	C37	Positivo	1	1	1	H.spp	GDC	1	1	1				x	x	x				x	
8	C38	Positivo	1	1	1	H.spp	GDC	1	0	0		x	x			x	x				x
9	C42	Positivo	0	2	1	H.spp	GDC	1	0	1		x	x			x				x	
10	C45	Positivo	1	1	0	H.spp	GDC	1	1	0			x								
11	C48	Positivo	0	1	1	H.spp	GDC	1	1	1		x	x				x			xx	
12	C52	Positivo	1	1	2	H.spp	GDC	0	0	1											
13	C57	Positivo	0	1	1	H.spp	Normal	0	0	0			x								
14	C16	Positivo	1	1	1	Hh	GDC	1	1	1		x	xx						x	x	
15	C17	Positivo	1	1	1	Hh	GDC	1	1	0			xx				x				
16	C18	Positivo	2	2	1	Hh	GDC	1	1	0		x	x	x					x	xx	
17	C08	Positivo	0	1	1	Hb	GDC	0	1	0			x					x	x		
18	C19	Positivo	1	2	2	Hb	GDC	1	1	0		x	xx		x		x		x	x	x
19	C35	Positivo	1	1	1	Hb	Normal	0	0	0		x	x								
20	C49	Positivo	1	1	1	Hb	GDC	1	1	0		x	x			x	x			x	x
21	C53	Positivo	1	1	0	Hf	GDC	0	1	0		x	x							x	x
22	C43	Positivo	2	1	1	Hb, Hf	GDC	0	1	0			x								
23	C44	Positivo	1	1	1	Hb, Hf	GDC	1	0	0											
24	C46	Positivo	1	1	1	Hb, Hf	Normal	0	0	0						x	x			x	x
25	C47	Positivo	1	1	1	Hb, Hf	GDC	1	0	1		x	x								x
26	C27	Positivo	2	1	1	Hh, Hb, Hf	GDC	1	1	0											x
27	C40	Positivo	2	1	1	Hh, Hb, Hf	GDC	1	0	0		x	x								
28	C41	Positivo	1	1	1	Negativo	Normal	0	0	0											

ANEXO A – Lista de Reagentes

1. 2-Mercaptoetanol ($C_2H_6O_5$) P.M. 78,13 (Fluka[®])
2. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
3. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
4. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83
5. Ácido cítrico P.A. – Anidro (Reagen[®])
6. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
7. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
8. Ácido fórmico P.A. / ACS (Reatec[®])
9. Agarose (Gibco BRL[®])
10. Álcool etílico absoluto (C_2H_5OH) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
11. Álcool isoamílico ($(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$) P.M. 88,15 (Synth[®])
12. Azul de bromofenol (Sigma[®])
13. Bicarbonato de sódio P.A. ($NaHCO_3$) P.M. 84,01 (Biotec[®])
14. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
15. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
16. Clorofórmio, P.A. ($CHCl_3$) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
17. Didhiothreitol – DTT (Invitrogen Life Technologies[™])
18. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies[™])
19. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μ L; 25 μ mol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[™])
20. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) P.M. 288,38 (Synth[®])
21. Eosina (Nuclear[®])
22. Ethidium bromide ($C_{21}H_{20}N_3Br$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
23. Formaldeído P.A. (Vetec[®])
24. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
25. Fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
26. Gelatina U.S.P. (Synth[®])
27. Glicina, P.A. (Nuclear[®])
28. Glicose

29. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
30. Hidroquinona (Nuclear[®])
31. Hematoxilina (Nuclear[®])
32. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
33. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
34. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
35. M-MLV Reverse Transcriptase - 200 units/μL (Invitrogen Life Technologies[®])
36. Nitrato de Prata (Synth[®])
37. PCR-buffer (10X) (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[®])
38. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies[®])
39. Proteinase K (Invitrogen Life Technologies[™])
40. RT-Buffer (5X) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[™])
41. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen[®])
42. Silicon dioxide (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma[®])
43. TripLE[™] Express Stable Trypsin-like Enzyme (Gibco[®])
44. Triton X-100 (Synth[®])
45. Xileno P.A. (Nuclear[®])

ANEXO B – Soluções e Tampões

- **Solução de água acidulada (Técnica de Warthin Starry)**
 - Preparar uma solução de ácido cítrico a 1%, utilizando água destilada
 - Diluir 0,7 mL da solução a 1% em 500 mL de água destilada
 - Ajustar para pH 4,0

- **PBS**
 - Misturar 1,98 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 500 mL de água MilliQ[®]
 - Acrescentar 0,36 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 8.17 g de NaCl
 - Adicionar água MilliQ[®] q.s.p. 1.000 mL
 - Ajustar solução para pH 7,2

- **Triton X -100 a 0.5%**
 - Acrescentar 0,5 mL de Triton X -100 em 99,5 mL de PBS

- **Solução A – Solução Colóide (Técnica de AgNOR)**
 - Aquecer 50 mL de água deionizada a 60°C
 - Dissolver 1 g de gelatina
 - Quando solução à temperatura ambiente, adicionar 0,5 mL de ácido fórmico

- **Solução B – Solução de Prata (Técnica de AgNOR)**
 - Dissolver 50 g de nitrato de prata em 100 mL de água destilada

- **Hidratação da sílica**
 - 60 g de sílica (SIGMA[®])
 - Adicionar 500 mL de água MilliQ[®] autoclavada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
 - Adicionar 600 µL de HCl (32% w/v) para ajustar pH para 2,0

- Aliquotar e autoclavar

- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 g de Triton x 100

- **Solução L2**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de Amostra**
 - Azul de bromofenol 0,25%
 - Sacarose – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%

- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**
 - 24 mL fenol saturado
 - 24 mL clorofórmio
 - 1 mL álcool isoamílico

ANEXO C – Protocolo de Técnicas

- **Warthin Starry (para até 20 lâminas)**
 - Desparafinizar as lâminas à temperatura de 80°C
 - Reidratar a partir de xilol a álcool 70° GL
 - Lavar em água corrente por 5 min
 - Manter as lâminas mergulhadas em água destilada até que as soluções estejam prontas
 - Solução impregnadora: dissolver 1 g de nitrato de prata em 100 mL de água acidulada
 - Solução I: dissolver 0,42 g de nitrato de prata em 24,5 mL de água acidulada
 - Solução II: dissolver 2,62 g de gelatina em 56 mL de água acidulada
 - Solução III: dissolver 0,04 g de hidroquinona em 31,5 mL de água acidulada
 - Manter as soluções I, II e III em estufa a 56°C
 - Dispor as lâminas em cuba com tampa, cobri-las com a solução impregnadora
 - Manter em estufa a 56°C por 30 min
 - Retirar todo o conteúdo da cuba
 - Misturar as soluções reveladoras I, II e III, nessa ordem e homogeneizar
 - Cobrir as lâminas com a solução reveladora e levar à estufa a 56°C
 - A revelação dos cortes ocorre nos primeiros 5 min (coloração levemente acastanhada)
 - Lavar rapidamente com água destilada aquecida a 60°C
 - Secar e montar

- **AgNOR**
 - Desparafinizar a lâmina à temperatura de 80°C
 - Reidratar a partir de xilol a álcool 70° GL
 - Descanso em água destilada por 10 min
 - Colocar em imersão na solução de Triton X 100 a 0.5% por 15 min
 - Lavar em água corrente por 20 min
 - Colocar a lâmina invertida no laminário
 - Preparar solução de A+B na proporção de 1A:2B
 - Para cada lâmina, 3 mL da solução A+B
 - Estufa a 37°C por 25 min
 - Lavar em água corrente por 20 min
 - Secar e montar

- **Extração do DNA**

- Acrescentar 250 μ L de água estéril em cada amostra de biópsia gástrica
- Adicionar 250 μ L de solução TENP
- Misturar em vórtex
- Agitar por 10 min
- Acrescentar 50 μ L de SDS 10% e 25 μ L de Proteinase K
- Misturar em vórtex
- Banho-maria à 56°C durante 2 h
- Agitar em vórtex
- Adicionar 500 μ L de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico
- Banho-maria à 56°C durante 15 min
- Centrifugar a 10.000 g durante 10 min
- Recolher sobrenadante em outro microtubo
- Adicionar 500 μ L de solução L6
- Adicionar 30 μ L de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar durante 30 min em temperatura ambiente
- Centrifugar a 10.000 g durante 30 s
- Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 30 s
- Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Repetir 1 vez os quatro últimos passos
- Adicionar 1 mL de etanol a 70%
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 30 s
- Desprezar sobrenadante
- Repetir 1 vez os quatro últimos passos
- Adicionar 1 mL de acetona P.A.
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 1 min
- Desprezar sobrenadante
- Secar o *pellet* em termo bloco a 60° C durante 2 min

- Adicionar 50 µL de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria à 56° C durante 15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 2 min
- Recolher sobrenadante em microtubos de 500 µL
- Estocar a -20°C

- **Primers**

Helicobacter spp. (forward): 5' AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA 3'

Helicobacter spp. (reverse): 5' GTG CTT ATT CST NAG ATA CCG TCA T 3'

H. bizzozeronii ou *H. salomonis* (forward): 5' ACT AGG CGA TAC CAA CTT GAT TT 3'

H. bizzozeronii ou *H. salomonis* (reverse): 5' TTC TTC AGC TGC GCG GAG CAT GC 3'

H. felis (forward): 5' GTG AAG CGA CTA AAG ATA AAC AAT 3'

H. felis (reverse): 5' GCA CCA AAT CTA ATT CAT AAG AGC 3'

H. heilmannii (forward): 5' GGG CGA TAA AGT GCG CTT G 3'

H. heilmannii (reverse): 5' CTG GTC AAT GAG AGC AGG 3'

H. pylori (forward): 5'GCC AAT GGT AAA TTA GTT 3'

H. pylori (reverse): 5'CTC CTT AAT TGT TTT TAC 3'

Fragmentos: Gênero *Helicobacter* 399 pb

H. bizzozeronii ou *H. salomonis* 499 pb

H. felis 241 pb

H. heilmannii 580 pb

H. pylori 411 pb

- **PCR-MIX (para uma reação)**

Buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM]: 2,5 µL

MgCl₂ (50 mM): 1,5 µL

dNTP (0,1 mM): 4,0 µL

primer forward (20 pmol): 0,5 µL

primer reverse (20 pmol): 0,5 µL

Platinum[®] Taq DNA Polymerase (5 U/µL): 0,25 µL

Água estéril q.s.p. 24 µL

Amotra: 1 µL

- **PCR**

- Gênero *Helicobacter*: ciclo inicial de desnaturação de 95°C por 5 min, 40 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturação), 65°C (anelamento) e 72°C (extensão), ciclo de extensão final de 72°C por 10 min, repouso a 4°C.

- *H. bizzozeronii* ou *H. salomonis*: ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 min, 40 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturação), 63°C (anelamento) e 72°C (extensão), ciclo de extensão final de 72°C por 10 min, repouso a 4°C.

- *H. felis*: ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 min, 40 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturação), 62°C (anelamento) e 72°C (extensão), ciclo de extensão final de 72°C por 10 min, repouso a 4°C.

- *H. heilmannii*: ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 3 min, 35 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturação), 59°C (anelamento) e 72°C (extensão), ciclo de extensão final de 72°C por 5 min, repouso a 4°C.

- *H. pylori*: ciclo inicial de desnaturação de 95°C por 5 min, 40 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturação), 45°C (anelamento) e 72°C (extensão), ciclo de extensão final de 72°C por 10 min, repouso a 4°C.

- **Eletroforese (Gel de agarose a 2%)**

- 1 g de agarose

- 50 mL TEB buffer (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4

- 30 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

Amostra: 7,0 µL do *amplicom* e 3,0 µL tampão de amostra

Corrida por aproximadamente 45 minutos a 100 V e 80 A

Visualização em transiluminador de luz ultravioleta