

Diagnóstico e avaliação da alteração do pH gástrico causada pelo *Helicobacter* spp. Em cães naturalmente infectados

Diagnosis and assessment of change gastric pH caused by *Helicobacter* spp. in dogs naturally infected

¹Caique Augusto Ribeiro Gomes, caiqueargomes@gmail.com; ¹Thiago Pires Anacleto, tpanacleto@gmail.com; ²Luan Gavião Prado, luangprado@gmail.com

¹Centro Universitário de Itajubá – FEPI, Av. Dr. Antônio Braga Filho, nº 687, Porto Velho, Itajubá – Minas Gerais.

²Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Recebido: 26 de Outubro de 2017; Revisado: 20 de Novembro de 2017

Resumo

Helicobacter spp. são bactérias espiraladas, que colonizam o trato gastrointestinal de seres humanos e animais. A presença da bactéria é relacionada com afecções gástricas como as gastrites, úlceras gástricas e câncer gástrico, porém, os mecanismos fisiopatológicos das helicobactérias ainda não foram completamente elucidados. O presente trabalho teve como objetivo diagnosticar a infecção por *Helicobacter* spp. em cinco cães naturalmente infectados, sem alterações clínicas relacionadas a infecção pela bactéria, e avaliar as alterações de pH, através da comparação dos valores obtidos dos animais portadores, com os valores obtidos após tratamento e erradicação das bactérias, além das alterações histológicas associadas. Ao corte histológico as bactérias se apresentaram localizadas no muco, na superfície do epitélio gástrico, fundo das criptas e lúmen das glândulas gástricas, havendo moderada densidade de bactérias. A principal alteração histológica observada foi a presença de infiltrado inflamatório mononuclear discreto em lâmina própria. O tratamento com terapia tripla a base de amoxicilina, claritromicina e lansoprazol foi eficaz na erradicação das bactérias. Houve significativa alteração do pH gástrico dos animais quando na presença das bactérias, diferindo pelo teste T ($P < 0,001$).

Palavras-chave: Helicobactérias; Endoscopia; Terapia tripla; Gastrite; Cães.

Abstract

Helicobacter spp. bacteria have spiral shape and colonize gastrointestinal tract of humans and animals. Gastric distress such as gastritis, ulcer a gastric cancer are related to bacteria presence in the stomach, however, physiologic and pathologic paths that leads to this are not elucidated. This study aimed to diagnose *Helicobacter* spp. infection in five clinically healthy dogs and evaluate pH changes before and after antibiotic treatment, as well as all the histologic changes. Histologically, bacteria were seen at de mucus, on gastric epithelial surface, crypt bottom and inside gastric glands with mild to moderate quantity of bacteria. The major histological change was mild mononuclear inflammatory infiltrate in the lamina propria. Treatment consisted of a amoxicilin, claritomicin and lansoprazol and was efficient to kill all the bacteria from de stomach. There was difference in gastric pH before and after treatment, in the T test ($p < 0.001$)

Keywords: Helicobacteria; Endoscopy; Triple Therapy; Gastric pH; Dogs.

Introdução

Bactérias microaerófilas, espiraladas, medindo aproximadamente 0,1 a 0,5µm de largura por 3µm de comprimento, de superfície lisa e possuindo extremidades arredondadas acompanhadas de flagelos lofotríquios ou anfotríquios compõem o gênero *Helicobacter* (LADEIRA et al., 2003).

A infecção pelo *Helicobacter* spp. em animais de companhia é frequentemente descrita, com prevalência entre 67 a 86% em cães clinicamente saudáveis e 61 a 100% naqueles com sintomatologia gastrintestinal (POLANCO et al., 2011). As helicobactérias se distribuem ao longo da mucosa gástrica de maneira focal, segmentar ou difusa. Devido a sua morfologia em espiral associada à presença de flagelos, estes micro-organismos se movem facilmente, e assim atravessam a camada de muco protetor mantendo íntimo contato com o epitélio gástrico (LADEIRA et al., 2003).

Segundo Anacleto et al. (2011), nos cães as helicobactérias são encontradas com maior frequência no fundo e no corpo do estômago, se localizando no muco, superfície do epitélio gástrico, fundo das criptas e interior das glândulas gástricas. Lipases e proteases produzidas pelo *Helicobacter* spp. degradam o gel viscoelástico do muco protetor gástrico

facilitando sua progressão até encontrarem um local com pH neutro, se protegendo fisicamente da ação do ácido gástrico (LADEIRA et al., 2003). Além desta proteção física, as helicobactérias possuem um mecanismo químico que confere resistência ao ácido clorídrico, possibilitando uma longa vida parasitária. A enzima urease produzida pelas bactérias realiza hidrólise da uréia presente no suco gástrico, resultando em liberação de amônia, que atua retraindo íons H⁺, exercendo função alcalinizante e gerando neutralização do pH em seu interior e ao seu redor (WEEKS & SACHS, 2001).

O íntimo contato entre as helicobactérias e a mucosa gástrica estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, causando migração de células de defesa para o epitélio gástrico, caracterizando quadros de gastrite (LADEIRA et al., 2003; ISRAEL & PEEK, 2001).

Na espécie canina a infecção pelo *Helicobacter* spp. é caracterizada por gastrite linfocítica leve assintomática (EATON et al., 1996).

Vieira et al. (2012), realizando análise quantitativa em cães infectados pelas helicobactérias encontraram relação positiva entre a densidade de bactérias e células inflamatórias, demonstrando a associação da presença do *Helicobacter*

spp. com a gênese da gastrite, que variou de leve a moderada.

As formas oral-oral e fecal-oral são citadas como as principais formas de transmissão das bactérias. Segundo Anacleto et al. (2011), ambientes aglomerados associado ao contato íntimo com animais infectados é fator de risco na transmissão do *Helicobacter* spp. em cães.

De acordo com Guerra et al. (2013), atualmente ainda não existe um teste considerado padrão ouro para diagnóstico da infecção pelo *Helicobacter* spp. em cães, sendo recomendada a associação de mais de um método diagnóstico.

A endoscopia digestiva alta, considerado um método invasivo de diagnóstico, atualmente é o mais utilizado para diagnosticar a infecção por *Helicobacter* spp. em cães, neste são coletados fragmentos de mucosa gástrica que são empregados em diversos métodos, como o teste rápido da urease, histopatologia e citologia (POURAKBARI et al., 2013). O esquema terapêutico para erradicação do *Helicobacter pylori* preconizado para humanos, consiste em terapia tripla composta por um inibidor de secreção ácida associado a dois antibióticos (COELHO et al., 2004).

Diferentemente dos seres humanos, em cães o significado da infecção pelo

Helicobacter spp. ainda não está bem esclarecido, visto que a infecção é identificada não só em cães clinicamente saudáveis, mas também naqueles que apresentam sintomatologia gastrointestinal (COSTA et al., 2012).

Vieira et al. (2012), concluíram que são necessários estudos mais aprofundados para o esclarecimento da relação entre, sintomatologia, lesões e a presença da bactéria na mucosa gástrica dos cães, apesar da alta prevalência nesta espécie. Por essa razão, o presente trabalho objetivou diagnosticar a infecção por *Helicobacter* spp. em cães naturalmente infectados e sem alteração clínica relacionada a infecção pela bactéria, além de avaliar as alterações de pH e histopatológicas causada pelas helicobactérias.

Material e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá – FEPI, sob protocolo nº 003/2015.

Para execução do trabalho foram utilizados cinco cães (*Canis familiaris*), sem raça definida, dois machos e três fêmeas, com idade entre cinco e doze anos, pesando entre 18 e 30 Kg, clinicamente saudáveis, provindos do

Canil do Hospital Escola de Medicina Veterinária da FEPI.

Após jejum alimentar e hídrico por 12 horas, os animais foram submetidos a exame de endoscopia digestiva alta sob anestesia geral, o protocolo de indução anestésica consistiu em Cetamina 5 mg/Kg, Xilazina 1 mg/Kg, Fentanil 0,0025 mg/Kg e Atropina 0,022 mg/Kg por via intravenosa, e Isoflurano 1 v% por via inalatória para manutenção anestésica. No exame de endoscopia digestiva foram coletados suco gástrico, escovado de mucosa gástrica e biópsia, nesta ordem, coletados da região do corpo do estômago.

O suco gástrico foi coletado por sucção pelo canal do endoscópio, com auxílio de seringa descartável de 60 ml. Após coleta, a amostra foi acondicionada em coletor universal e levada ao laboratório de análises clínicas no qual foi transferida para tubo de ensaio para realização da pHmetria. A medição do pH foi feita em pHmetro digital de bancada, o aparelho foi calibrado antes de cada procedimento.

O escovado de mucosa gástrica foi realizado com auxílio de escova de citologia endoscópica reutilizável. Após escovação da mucosa o endoscópio foi retirado e a escova friccionada em

lâminas de vidro, as quais foram encaminhadas ao laboratório de análises clínicas para secagem, coloração pelo método de Romanowsky Modificado e observação em microscopia óptica.

A coleta das biópsias foi realizada com pinça de biópsia tipo fórceps reutilizável, sendo coletados dois fragmentos, um foi imediatamente colocado em solução padrão para o teste rápido da urease, e o outro acondicionado em microtubo tipo eppendorf contendo 2ml de formol a 10% para fixação e posterior realização de exame histopatológico.

Os animais, com resultado positivo em todos os métodos diagnósticos, iniciaram tratamento com terapia tríplice a base de Amoxicilina 30 mg/Kg, Claritromicina 5 mg/Kg e Lansoprazol 1 mg/Kg, manipulados em cápsulas e administrados por via oral a cada 12 horas durante sete dias. Durante o tratamento os animais foram isolados em canis individuais para que não houvesse contato com animais infectados.

Sete dias após o término do tratamento os animais foram submetidos novamente a jejum alimentar e hídrico por 12 horas e posteriormente a exame de endoscopia digestiva alta com coleta de escovado de mucosa gástrica e biópsia para confirmação da erradicação

da bactéria, e suco gástrico para pHmetria e comparação com os valores obtidos na primeira coleta.

Resultados e Discussão

O teste rápido da urease (Figura 1) apresentou variação no tempo de viragem de cor. As amostras que demonstraram maior densidade de bactérias ao corte histológico apresentaram viragem de cor mais

rápida. As amostras que demonstraram menor quantidade de bactérias apresentaram viragem de cor mais tardia. Não houve nenhum resultado falso positivo ou falso negativo no teste, sendo verificados através da visualização das bactérias no exame de citologia, que apresenta alta especificidade. Resultados que demonstram concordância com os obtidos por Costa et al. (2012).



Figura 1 – Teste rápido da urease com resultado positivo apresentando coloração rósea, e resultado negativo apresentando coloração amarela.

Ao exame de citologia o método Romanowsky Modificado se apresentou como excelente coloração para as helicobactérias, visto que a literatura recomenda a coloração pelo Giemsa. Foram observadas bactérias espiraladas com morfologias variáveis (Figura 2).

Todas as bactérias observadas se apresentaram morfologicamente diferentes ao *H. pilory* (MARSHAL & WARREN, 1984), estando de acordo com Neiger e Simpson (2000), que citam que cães não são infectados naturalmente pelo *H. pylori*.



Figura 2 – Fotomicroscopia de citologia de escovado de mucosa gástrica, demonstrando bactérias com morfologia em espiral evidente; Romanowsky Modificado, 1000x.

O exame histopatológico corado pelo Giemsa demonstrou bactérias se localizando no muco, na superfície do epitélio gástrico, no fundo das criptas e no lúmen das glândulas gástricas (Figura 3), condizendo com a descrição encontrada na literatura (COSTA et al., 2012). Utilizando

a escala visual para avaliação da densidade de colonização bacteriana na mucosa gástrica proposta por Happonen et al. (1998), a densidade de bactérias observada nas amostras foi moderada.

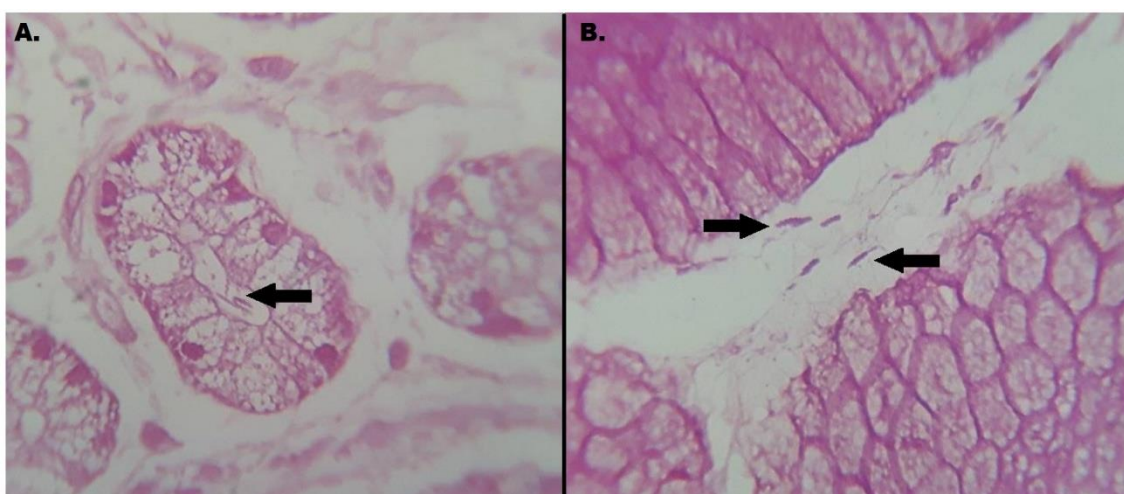


Figura 3 – Fotomicroscopia de corte histológico de mucosa gástrica, demonstrando helicobactérias (setas) no lúmen das glândulas gástricas (A) e no muco gástrico (B); Giemsa, 1000x.

A principal alteração histológica observada nos cortes corados pela Hematoxilina-Eosina foi a presença de infiltrado inflamatório mononuclear em lâmina própria, acompanhado de hiperemia e ocorrência de aglomerados linfoides, estando de acordo com o estabelecido por Costa et al. (2012). Utilizando a escala visual para avaliação da intensidade de infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa gástrica proposta por Happonen et al. (1998), o infiltrado inflamatório presente nas amostras foi classificado como discreto.

Amorim et al. (2015), realizaram um estudo com 69 cães no qual a helicobactéria prevalente foi o *Helicobacter heilmannii*. No presente trabalho a maioria das bactérias observadas apresentaram morfologia sugestiva de *Helicobacter heilmannii* (SOUZA et al., 2004).

Foi identificada uma significativa alteração no pH gástrico dos cães (Tabela 1) quando na presença das helicobactérias.

Tabela 1 – Comparação dos valores de pH obtidos na primeira e segunda coleta.

<i>Helicobacter</i> spp.	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)				
	Cão I	Cão II	Cão III	Cão IV	Cão V
POSITIVO (1ª Coleta)	5.8 ^A	3.9 ^A	4.6 ^A	5.1 ^A	5.9 ^A
NEGATIVO (2ª Coleta)	2.2 ^B	2.6 ^B	2.1 ^B	2.1 ^B	2.2 ^B

Valores seguidos de letra maiúscula diferem entre si pelo teste T (P< 0,001).

Neste estudo, os resultados obtidos em relação a prevalência do *Helicobacter* spp. em cães clinicamente saudáveis estão de acordo com a literatura consultada (MOUTINHO et al., 2007). Nenhum dos animais apresentou sintomatologia gastrointestinal durante o experimento, e não foram visualizadas alterações macroscópicas na mucosa gástrica dos cães avaliados.

Conclusões

Em cães, as helicobactérias se localizam preferencialmente no muco, e na superfície do epitélio gástrico. O *Helicobacter* spp. altera o pH gástrico dos cães, podendo contribuir para gênese de afecções que acometem o trato gastrointestinal da espécie. A terapia tripla a base de Amoxicilina 30 mg/Kg,

Clarithromicina 5 mg/Kg e Lansoprazol 1mg/Kg é eficaz na erradicação das

helicobactérias que colonizam o estômago dos cães.

Referências

AMORIM, I.; SMET, A.; ALVES, O.; TEIXEIRA, S.; SARAIVA, L. A.; TAULESCU, M.; REIS, C.; HAESEBROUCK, F.; GÄRTNER, F. Presence and significance of *Helicobacter* spp. in the gastric mucosa of Portuguese dogs. In: **Gut Pathogens**. v. 7, n. 12, 2015.

GUERRA, P. R.; TRINDADE, A. B.; DIAS, V.; CARDOSO, M. R. I. Espécies do gênero *Helicobacter* de importância em medicina veterinária: revisão de literatura. In: **Veterinária em Foco**. v.10, n.2, 2013, p. 229-243.

ANACLETO, T. P.; LOPES, L. R.; ANDREOLLO, N. A.; BERNIS, W. O.; RESCK, M. C. C.; MACEDO, A. Studies of distribution and recurrence of *Helicobacter* spp. gastric mucosa of dogs after triple therapy. In: **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 26, n. 2, 2011 [Internet] 2011, p. 82-87.

HAPPONEN, I.; LINDEN, J.; SAARI, S.; KARJALAINEN, M.; HÄNNINEN, M. L.; JALAVA, K.; WESTERMARCK, E. Detections and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. In: **JAVMA**. v. 213, n.12, 1998, p.1767-1774.

COELHO, L. G. V.; MATTOS, A. A.; FRANCISCONI, C. F. M.; CASTRO, L. P.; ANDRÉ, S. B. Eficácia do regime terapêutico empregando a associação de pantoprazol, claritromicina e amoxicilina, durante uma semana, na erradicação do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera péptica. In: **Arquivo Gastroenterologia**. v. 41, n. 1, 2004, p. 71-76.

ISRAEL, D. A.; PEEK, R. M. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation. In: **Aliment Pharmacology Therapy**. v. 15, n. 1, 2001, p. 1271-1290.

COSTA, M. C.; COSTA, P. R. S.; SILVA, J. C. P.; MAIA, N. E. R.; MOREIRA, L. C. J. Detecção de *Helicobacter* spp. em amostras de mucosa gástrica de cães assintomáticos e alterações histológicas associadas. In: **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**. v. 49, n. 4, 2012, p. 285-292.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADOR, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. In: **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 4, 2003, p. 335-342.

EATON, K. A.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B. E.; PAOLA, J.; SHERDING, N. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. In: **Journal Clinical Microbiology**. v. 34, n. 1, 1996, p. 3165-3170.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. In: **The Lancet**. v. 1, n. 1m 1984, p. 1311-1315.

MOUTINHO, F. Q.; THOMASSIAN, A.; WATANABE, M. J.; SUZANO, S. M. C.; SEQUEIRA, J. L. Prevalência de helicobactérias e alterações na mucosa gástrica de cães saudáveis. In: **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n. 4, 2007, p. 1080-1083

NEIGER, R.; SIMPSON, K. W. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. In: **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 14, n. 1, 2000, p. 125-133.

POLANCO, R.; SALAZAR, V.; REYES, N.; GARCÍA-AMADO, M. A.; MICHELANGI, F.; CONTRERAS, M. High prevalence of dna from non-H. pylori helicobacters in the gastric mucosa of venezuelan pet dogs and its histological alterations. In: **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 53, n. 1, 2011, p. 207-212.

POURAKBARI, B.; GHAZ, M.; MAHMOUDIL, S.; MAMISHIL, S.; HOSSEIN, A.; MEHRI, N.; BAHRAM, K.; Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests by invasive and noninvasive tests. In: **Brazilian Journal Microbiology**. v. 44, n. 3, 2013, p. 795-798.

SALAVATI, A.; MIRSALEHIAN, A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection

SOUZA, M. L.; KOBAYASI, S.; RODRIGUES, M. A. M.; SAAD-HOSSNE, R.; NARESSE, L. E. Prevalência de *Helicobacter* em cães oriundos do biotério central da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)-Botucatu. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 19, n. 5, 2004, p. 571-577.

VIEIRA, T. F.; SILVA, J. C. P.; VILORIA, M. I. V.; VIEIRA, T. M. PEREIRA, C. E. R. Frequência e distribuição de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de cães. In: **Revista Ceres.**, v. 59, n.1, 2012, p. 25-31.

WEEKS, D. L.; SACHS, G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. In: **Mol Microbiology**. v. 40, n. 6, 2001, 1249-1259.