

**MANUELLA CARVALHO DA COSTA**

**UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS, DO ÓLEO DE ALHO E DA  
TERAPIA TRIPLA NO CONTROLE DO *Helicobacter* spp. EM CÃES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2005**

**MANUELLA CARVALHO DA COSTA**

**UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS, DO ÓLEO DE ALHO E DA  
TERAPIA TRIPLA NO CONTROLE DO *Helicobacter spp.* EM CÃES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”

APROVADA: 22 de dezembro de 2005.

---

Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Marlene Isabel Vargas Vitoria  
(Conselheira)

---

Prof. Aloísio da Silva Pinto

---

Prof. José Antônio Viana

---

Prof. João Carlos Pereira da Silva  
(Orientador)

Aos meus pais, Manoel Quaresma da Costa (*in memoriam*), que muito contribuiu para a minha formação profissional, e a Edna Marques de Carvalho da Costa que tem me ajudado a superar os momentos difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que traçou meus caminhos até aqui;

À minha família, principalmente aos meus pais; e a minha irmã Mariana, que mesmo de longe torceram pelo meu sucesso;

Ao professor orientador João Carlos Pereira da Silva, pelo apoio, pela paciência, incentivo e oportunidade de amadurecimento científico e pessoal, e orientação durante o curso;

Ao professor Paulo Renato dos Santos Costa, pela paciência, compreensão, amizade, e ajuda nas endoscopias. Sem você teria sido impossível;

À tia Ray pelo apoio, amizade, compreensão e pela orientação farmacológica e fornecimento das cápsulas de alho;

Aos professores do DVT, especialmente a professora Marlene, Zé Antônio e Gonzaga pela amizade, ensinamentos e orientação profissional;

Ao médico patologista José do Carmo, pela ajuda preciosa na confecção e leitura das lâminas de histopatologias;

Ao Renner pela amizade e ajuda importantíssima nas anestésias, endoscopias, e cuidados clínicos dos animais;

As amigas de república, Paloma, Claudinha e Lú, pelo apoio incondicional nos momentos difíceis;

À Andrestone, Bixcoitão, Cris (Capivara), Dona Onça, Rosy e Jamaicano pela amizade tão especial e pelos muitos momentos vividos; Nunca vou esquecer de vocês (Toca Árvoreeee....)!

À Wal pela amizade, compreensão e ajuda nos momentos difíceis;

Ao Cláudio e ao Adão, pelo preparo das lâminas de histologia;

Ao professor Eduardo Paulino pela ajuda com a análise estatística;

Aos amigos do curso de Pós-Graduação pela amizade, apoio e companheirismo;

Ao DVT, por todos estes anos de aprendizado, alegrias e crescimento pessoal e profissional;

A todos os funcionários do DVT, especialmente Camilo, Maninha, Tatinha, Lucinda, Alex, Aécio, Paulo, Cláudio, Etelvina, Ponte Nova, Didi e Rose, pois foram muito importantes no dia a dia e me ajudaram muito;

Aos animais que possibilitaram a realização desse estudo e que são a razão da minha profissão;

À Universidade Federal de Viçosa pelo acolhimento;

À todas as outras pessoas que me ajudaram durante o experimento e que porventura eu tenha esquecido de citar;

## CONTEÚDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Microbiologia	3
2.2. Fontes de transmissão	3
2.3. Potencial zoonótico	4
2.4. Patogênese.	6
2.5. Sinais clínicos	9
2.6. Alterações histopatológicas em cães	10
2.7. Métodos de diagnóstico	12
2.8. Tratamento	15
2.8.1. Terapia Tripla	16
2.8.2 Utilização da Própolis	17
2.8.2.1. Propriedades da própolis	18
2.8.2.2. Efeitos biológicos	18
2.8.3. Utilização do alho	19
2.8.3.1. Propriedades do alho	19
2.8.3.2. Efeitos biológicos	19

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Animais utilizados	21
3.2. Endoscopia e biópsia da mucosa gástrica	21
3.3. Preparo do material e avaliação histopatológica	22
3.4. Tratamento dos animais	23
3.5. Análise estatística	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Avaliação endoscópica da mucosa gástrica	25
4.2. Teste da urease	25
4.3. Exame histopatológico	26
4.4. Tratamento	27
4.4.1. Grupo controle	27
4.4.2. Óleo de alho	28
4.4.3. Extrato de Própolis	28
4.4.4. Terapia Tripla	29
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Representação para escores do o grau de inflamação, (a) escore 0, (b) escore 1, (c) escore 2 e (d) escore 3 (H&E – 200 X)	35
Figura 2 – Representação para escores do grau de colonização do <i>Helicobacter spp.</i> , (a) escore 0, (b) escore 1, (c) escore 2 e (d) escore 3 (Carbol-Fucsina – 400 X) (setas)	36
Figura 3 – Teste da urease em 4 animais: resultado positivo antes do tratamento (a) e negativo após o tratamento com a Terapia Tripla (b)	37
Figura 4 – Corte histológico de mucosa gástrica com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (escore 1) antes (a) e após o tratamento (b) no mesmo animal (H&E – 400 X)	37
Figura 5 – Corte histológico de mucosa gástrica com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (escore 2) (a) e presença de aglomerado linfóide (b) no mesmo animal (H&E – 200 X e 100 X) (seta)	38
Figura 6 – Corte histológico de mucosa gástrica antes (escore 3) (a) e após o tratamento com a Terapia Tripla (b) no mesmo animal (Carbol-Fucsina– 1000 X) (setas)	38

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de acordo com a densidade de bactérias espiraladas, intensidade do infiltrado inflamatório, número de agregados linfóides e degenerações glandulares.	24
Tabela 2- Escore do grau de inflamação e grau de colonização de <i>Helicobacter spp.</i> no grupo controle, antes e após o tratamento.	31
Tabela 3- Escore do grau de inflamação e grau de colonização de <i>Helicobacter spp.</i> no grupo tratado com óleo de alho, antes e após o tratamento.	32
Tabela 4- Escore do grau de inflamação e grau de colonização de <i>Helicobacter spp.</i> no grupo tratado com extrato de própolis, antes e após o tratamento.	33
Tabela 5- Escore de grau de inflamação e grau de colonização de <i>Helicobacter spp.</i> no grupo tratado com a terapia tripla, antes e após o tratamento.	34

## RESUMO

COSTA, Manuella Carvalho da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2005.

**Utilização do extrato de própolis, do óleo de alho e da terapia tripla no controle do *Helicobacter spp.* em cães.** Orientador: João Carlos Pereira da Silva. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilória e Sérgio Luis Pinto da Matta.

O *Helicobacter spp.* coloniza o estômago do homem e de animais. Em medicina humana é uma das principais causas de gastrite. A resistência do *Helicobacter pylori* ao tratamento convencional, é um dos principais problemas encontrados. Desta forma, vários tratamentos alternativos tem sido propostos como a utilização do própolis e do alho, que por meio de estudos “in vitro” tem demonstrado sua atividade anti-*H. pylori*. Os objetivos desse estudo foram determinar se os graus de colonização pelos organismos semelhantes ao *Helicobacter* são sensíveis ao emprego do extrato de própolis e do óleo de alho como bacteriostáticos naturais, diminuindo assim, a colonização e densidade de *Helicobacter* na mucosa gástrica de cães, bem como avaliar as alterações inflamatórias causadas por este patógeno. Para tanto, foram selecionados 28 cães com *Helicobacter spp.* e alterações histológicas presentes nas biopsias endoscópicas coradas por Hematoxilina-eosina e Carbol-fucsina, e resultado positivo para o teste de urease nas primeiras 3 horas. Esses animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos de 7 componentes cada. O grupo 1 foi o controle e recebeu cápsulas placebo (vazias). O grupo 2 recebeu 20 gotas de extrato de própolis a 30% e o grupo 3 recebeu 500mg de óleo de alho em cápsulas, ambos a cada 24 horas durante 30 dias. O grupo 4 recebeu tratamento convencional para *Helicobacter*, consistindo em Amoxicilina, Metronidazol e Omeprazol, na dose de 20mg/Kg a cada 12 horas, 25mg/Kg e 20mg/Kg a cada 24 horas, respectivamente durante 15 dias. Ao final do tratamento os cães foram submetidos a novas endoscopias e biopsias da mucosa gástrica. Para análise histológica foram atribuídos escores de 0 a 3, considerando a média por campo (400x) para o número de bactérias espiraladas e para o número de células inflamatórias e alterações degenerativas glandulares. A prevalência de *Helicobacter spp.* identificado pela histologia (Hematoxilina-eosina e Carbol-Fucsina) e positividade no teste da urease, foi de 100%, antes dos tratamentos. Ao exame histopatológico a maior parte das amostras

apresentou leve infiltrado inflamatório (escore 1), e severa densidade de *Helicobacter spp.* (escore 3) antes do tratamento. Dos animais tratados aqueles que apresentaram melhores resultados, foi os que receberam a terapia tripla, apresentando erradicação total do *Helicobacter spp.* tanto na região fúndica quanto na região pilórica. Sendo confirmado na prática devido à ausência da bactéria ao exame histopatológico e resultado negativo ao teste rápido de urease. Entretanto não foi observado correlação significativa em nenhuma das variáveis analisadas neste estudo após o tratamento. Desta forma, a densidade de bactérias não está significativamente correlacionado com o número de células inflamatórias, bem como o agregado linfóide e degeneração glândular. O tratamento com óleo de alho na dose utilizada foi eficaz em reduzir a degeneração glândular tanto na região fúndica quanto na pilórica. Entretanto não foi eficaz em erradicar o *Helicobacter spp.* em cães, apenas diminuindo a sua colonização em alguns dos animais tratados. O tratamento com extrato de própolis na dose utilizada não foi eficaz em reduzir ou até mesmo erradicar o *Helicobacter spp.* em cães;

## ABSTRACT

COSTA, Manuella Carvalho da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, december, 2005.

**Use of propolis extract, garlic oil and triple therapy in the control of *Helicobacter spp.* in dogs.** Adviser: João Carlos Pereira da Silva. Committee Members: Marlene Isabel Vargas Vilória and Sérgio Luis Pinto da Matta.

The *Helicobacter spp.* inhabits men's stomach and animals. In human medicine it is one of the principal gastritis causes. The resistance of the *Helicobacter pylori* to the conventional treatment is one of the main problems that are found. This way, several alternative treatments have been proposed, as the use of propolis and garlic, that has been demonstrating its activity anti-*H. pylori* through studies "in vitro". The aim of this study was to determine if the colonization degrees for organisms similar to *Helicobacter* are sensitive to the employment of propolis extract and of garlic oil as natural bacteriostatics, decreasing thus the colonization and density of *Helicobacter* in the gastric mucous membrane of dogs, as well as the inflammatory alterations caused by this pathogen. For so much, 28 dogs were selected with *Helicobacter spp.* and histologic alterations present in the endoscopic biopsies red-faced for Hematoxilin-eosin and Carbol-fucsina, and positive result for the urease test in the first 3 hours. Those animals were randomly separate in 4 groups of 7 components each. Group 1 was the control and received placebo capsules (empty), group 2 received 20 drops of propolis extract 30%, group 3 received 500mg of garlic oil in capsules every 24 hours for 30 days, and group 4 received conventional treatment for *Helicobacter*, consisting of Amoxicilin, Metronidazole and Omeprazol, in the dose of 20mg/Kg every 12 hours, 25mg/Kg and 20mg/Kg every 24 hours, for 15 days. At the end of the treatment the dogs new endoscopies and biopsies of the gastric mucous membrane were submitted to. For histologic analysis scores from 0 to 3 were attributed considering the average per field (400x) of spiraled bacteria and inflammatory number cells and glandular degenerative alterations. The prevalency of *Helicobacter spp.* identified for the histology (Hematoxilina-eosina and Carbol-Fucsina) and positivity in the urease test, was 100%, before the treatments. For the histopathologic examination most of the samples presented light infiltrated inflammatory (score 1), and severe density of *Helicobacter spp.* (score 3) before the treatment. From the treated animals that presented better results, it was

accomplished with the triple therapy, presenting total eradication of *Helicobacter spp.* so much in the fundus as in the pylorus regions, being confirmed in practice due to the absence of the bacteria to the histopathologic examination and negative result to the fast urease test. However significant correlation was not observed in none of the variables analyzed in this study after the treatment. This way, the density of bacterias is not significantly correlated with the number of inflammatory cells, as well as the lymphoid nodules and glandular degeneration. The treatment with garlic oil in the used dose was effective in reducing the degeneration glandular in the fundic region as in the pilorus. However it was not effective in eradicating the *Helicobacter spp.* in dogs, it just reduced its colonization in some of the treated animals. The treatment with propolis extract in the used dose was not effective in reducing or even eradicating the *Helicobacter spp.* in dogs.

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1983, Marshal e Warren reportaram um novo fator patogênico relacionado com a gastrite crônica em atividade ao isolarem, pela primeira vez, bactérias espiraladas em biópsias gástricas de pacientes com processo inflamatório (BULKHOL et al., 2002). Essa bactéria, denominada *Helicobacter pylori* é reconhecida como a mais importante causa de gastrite crônica em humanos e, é também implicada como determinante etiológico de úlceras pépticas, sobretudo as duodenais (CANIZARES et al., 2002). As espécies de *Helicobacter* são bactérias gram negativa com relativa capacidade de se multiplicar no estômago, graças à produção e importante atividade da enzima urease (BELLI et al., 2003).

Em medicina veterinária, várias espécies desta bactéria têm sido relacionadas com inflamação da mucosa gastrointestinal em diferentes espécies, embora a correlação entre colonização e manifestações clínicas ainda não esteja bem esclarecida (BELLI et al., 2003; BAILLON & MARSHAL-JONES, 2004;).

Segundo JENKINS & BASSETT (1997) e NEIGER & SIMPSON (2000), há relatos de infecção gástrica por espécies de *Helicobacter* em gatos, cães, ratos, suínos, bovinos, ferrets, raposas, felinos selvagens e primatas não humanos.

Cães e gatos têm demonstrado ser infectados por diferentes espécies de *Helicobacter*, incluindo: *Helicobacter felis*, *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter bitis*, *Helicobacter salomonis* e *Helicobacter rappini*. A prevalência de animais portadores com essas bactérias se situa entre 70 e 100% (HAPPONEN et al., 1998; BAILLON & MARSHAL-JONES, 2004).

O potencial zoonótico dessas bactérias justifica o crescente e renovado interesse nesse campo da medicina veterinária, em especial, no estabelecimento da incidência e significado clínico desta bactéria gástrica nos animais domésticos, sobretudo em cães e gatos, já que microrganismos com morfologias semelhantes ao *H. pylori* foram observados no estômago de animais com gastrite (HANDT et al., 1995).

MARTIN & ERNST (2003) relataram que a erradicação do *Helicobacter pylori* pode ser difícil com o uso da antibioticoterapia convencional, requerendo a combinação de dois antibióticos associados a um inibidor da bomba de prótons, para diminuir a produção de ácido clorídrico existente no suco gástrico. Entretanto, segundo O'GARA et al. (2000), a

resistência da bactéria reportada aos antibióticos utilizados é um dos principais problemas encontrados. Desta forma, vários tratamentos alternativos têm sido propostos, tais como a utilização da própolis e do alho, que por meio de estudos “in vitro” têm demonstrado sua atividade anti-*H. pylori* (CELLINI et al., 1996; SIVAM et al., 1997; BOYANOVA et al. , 2003; CANIZARES et al., 2004).

O presente estudo teve por objetivo determinar se os graus de colonização pelos organismos semelhantes ao *Helicobacter* são sensíveis ao emprego do extrato de própolis e do óleo de alho como bacteriostáticos naturais. Além disso, considerando a escassez de pesquisa envolvendo o tratamento de bactérias espiraladas gástricas em cães pretendeu-se avaliar a eficácia da terapia tripla no controle da colonização por *Helicobacter* e a eventual redução das alterações inflamatórias causadas por este patógeno.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Microbiologia**

O gênero *Helicobacter* é representado por bacilos gram negativos, curvo ou helicoidal, medindo dois a quatro milímetros de comprimento por 0,5 a 1 mm de largura, com formato espiralado em S ou U, móveis, unipolares e poliflagelados com quatro a seis flagelos e com extremidades arredondadas e rombas. Seu crescimento ocorre em uma atmosfera com microaerofilia (5 a 15% de oxigênio), com adição de gás carbônico e temperatura ideal de 37°C. Tem capacidade de aderir à mucosa gástrica e provocar inflamação (gastrite), colonizar focos de metaplasia gástrica no duodeno promovendo inflamação (duodenites), e em decorrência disso, facilitar a ulceração da mucosa duodenal (OLIVEIRA, 2000 e BELLI et al., 2003).

### **2.2. Fontes de Transmissão**

As formas de transmissão ainda não se encontram totalmente elucidadas, mas as principais formas propostas são a fecal-oral e a oral-oral, incluindo como possíveis fontes de contaminação a água, as fezes e a saliva (HANDT et al., 1995; JENKINS & BASSETT, 1997; ARAUJO & FERREIRA, 2002; FLATLAND, 2002).

A via de transmissão fecal – oral foi primeiramente sugerida, devido ao sucesso obtido no isolamento do agente por meio da cultura de fezes (GEYER et al., 1993; STRAUSS-AYALY & SIMPSON, 1999). Além disto, notou-se aumento do risco de transmissão, principalmente de *H. heilmannii*, de animais para o homem, devido à exposição a fezes destes (MEINING et al., 1998). Neste contexto, LECOINDRE et al., (1997) afirmaram que a infecção por Helicobactérias em cães pode chegar a 100% dos animais que vivem em coletividade (canil, abrigos), ao passo que em animais de companhia a infecção varia de 45 a 80%.

SIMPSON et al., (1999), citaram ainda que essa alta prevalência pode ser estar presente em 61-80% dos cães com sintomatologia de vômitos, 67-86% em cães saudáveis e em 100% de cães experimentais de laboratório.

A via oral – oral foi indicada após isolamento de *H. pylori* na saliva de pessoas infectadas e na saliva e secreção gástrica de carnívoros domésticos (STRAUSS-AYALI & SIMPSON, 1999). O hábito destes animais lamberem sua pelagem, a ocorrência freqüente de vômitos e o íntimo contato com seus proprietários e/ou com outros da mesma espécie aumentam a incidência da transmissão por esta via (LECOINDRE et al., 1997; ARAÚJO & FERREIRA, 2002).

Existem relatos de que a transmissão possa também ocorrer pela forma iatrogênica, por meio do uso de endoscópios e sondas contaminados por DNA de *H. pylori* (GOODMAM & CORREA, 1995).

Além da possibilidade de transmissão por vetores, é aventada ainda a possibilidade de transmissão zoonótica de cães e gatos para o homem ou vice-versa (ARAÚJO & FERREIRA, 2002).

### **2.3. Potencial zoonótico**

Evidências consideram o potencial de alguns animais, principalmente os domésticos, serem a fonte da infecção zoonótica das Helicobactérias, já que microrganismos com morfologias semelhantes ao *H. pylori* foram observados no estômago de humanos com gastrite (HANDT et al., 1995). Contudo, HAPPONEN et al., (1998), afirmaram que o *Helicobacter pylori* tem sido isolado apenas de gato e não de cães.

Segundo JENKINS & BASSETT (1997), nem todas as espécies de *Helicobacter* são patogênicas, e nem todas parecem induzir o mesmo grau ou tipo de patologia no trato gastrointestinal. O *H. heilmannii* e o *H. felis* são as duas espécies mais comumente encontradas em cães e gatos. Entretanto, o maior patogênico em seres humanos é o *H. pylori* e o *H. heilmannii*, tendo sido identificado numa baixa percentagem de pacientes humanos com úlcera e estando associado na patogênese de gastrite crônica, câncer gástrico e linfoma de MALT em adultos (JENKINS & BASSETT, 1997; JALAVA et al., 2001; CANIZARES et al., 2002; KATO et al., 2004; PRIESTNALL et al., 2004).

Corroborando com os autores acima, DIETERICH et al. (1998) assinalaram que em cães e gatos a colonização está associada com leve a moderada gastrite enquanto que em humanos ela causa gastrite branda. Entretanto, pessoas com *H. heilmannii* também pode desenvolver úlceras e eventualmente o câncer gástrico.

Nesse mesmo contexto, PRIESTNALL et al. (2004) asseveram que o *Helicobacter heilmannii* é encontrado no estômago de 0,2 a 4% de pacientes com gastrite. Assim, a possibilidade de transmissão zoonótica deve ser considerada. Três espécies diferentes do *H. heilmannii* podem ser isoladas de cães e gatos, conhecida como *H. felis*, *H. bizzozeronii* e *H. salomonis* (DIETERICH et al., 1998; JAVALA et al., 1998; JAVALA et al., 2001).

FLATLAND (2002) tem sugerido que a infecção por *Helicobacter* pode ser zoonótica devido ao grande contato com cães e gatos ter sido correlacionado a infecção por *H. heilmannii* em humanos. No entanto, os humanos são comumente colonizados pelo *H. heilmannii* tipo 1, e os subtipos de *H. heilmannii* presentes nos cães e gatos não tem sido determinado, além do que o potencial zoonótico não haver sido avaliado (PRIESTNALL et al., 2004).

A frequência aparentemente alta de *Helicobactérias* em cães e gatos, e particularmente a presença de *Helicobacter pylori* em um grupo de gatos de laboratório, demonstram a possibilidade dos animais de companhia servir como reservatório para a transmissão de *Helicobactérias* para humanos (SIMPSON & BURROWS, 1997).

Num estudo em cães da raça Beagle clinicamente sadios, a taxa de infecção foi de 100% (SIMPSON & BURROWS, 1997)

Grande atenção deve ser dada a esse fato, visto que aproximadamente 40% da população mundial possuem animais de estimação em casa, além do elevado contato com outras espécies animais estabelecidos pelo homem, principalmente em áreas rurais (MCISAAC & LEUNG, 1999).

Segundo DORE et al., (1999), vários estudos epidemiológicos sugeriram que os animais podem estar relacionados com a origem da infecção, uma vez que foi demonstrada a elevada prevalência de anticorpos contra *H. pylori* em funcionários de frigoríficos (abatedouros), veterinários e açougueiros quando comparados com indivíduos que não tinham contato direto com os animais, sugerindo que o *H. pylori* pode ser transmitido de animais ao homem. Relataram ainda, como resultado de seu estudo, que a prevalência de *H.*

*pylori* estaria diretamente relacionada com o contato direto de pessoas com ovelhas ou cães pastores.

#### **2.4. Patogênese**

A capacidade do *Helicobacter pylori* em provocar lesões na mucosa gastroduodenal está intimamente relacionada à sua capacidade de adaptar-se ao ambiente inóspito, que é o ambiente gástrico, o qual tem inúmeros mecanismos que dificultam a colonização de qualquer organismo. Desta forma, a inflamação da mucosa gastroduodenal é o resultado final do desequilíbrio entre os fatores citoprotetores da mucosa e os agentes lesivos. O grau de desequilíbrio entre estes, determina a gravidade da lesão, desde discreta inflamação até a potente ulceração da mucosa (OLIVEIRA, 2000 e BULKOOOL et al., 2002 ).

No estômago, a secreção mucosa, que se constitui na primeira linha de defesa contra agentes agressores, encontra-se preservada não havendo evidências que sugiram anormalidades na quantidade ou qualidade da mesma em pacientes com doença gastroduodenal. O muco é secretado pelo epitélio gástrico e células cervicais das glândulas gástricas e encontra-se revestindo o epitélio gástrico. O bicarbonato, secretado pelas células epiteliais, é retido proximamente ao epitélio, junto à camada de muco, agindo como uma barreira de proteção mucosa adicional aos danos causados pelo ácido e pepsina (OLIVEIRA, 2000).

Dentre outros fatores de proteção da mucosa gastroduodenal, podem-se citar a adequada microcirculação, a renovação celular, os radicais sulfidrilas, a prostaglandina E<sub>2</sub> que inibe a secreção gástrica de ácido e as imunoglobulinas IgG e IgA (OLIVEIRA, 2000).

Os fatores de virulência podem ser agrupados naqueles que são comuns a todas as cepas para sua adaptação ao ambiente gástrico, e naqueles que estão presentes apenas em algumas, conferindo-lhes maior agressividade e determinando diferentes padrões clínicos da doença. As adesinas, as flagelinas e a produção de urease são características comuns a todas as cepas e parecem ser os instrumentos de colonização do *Helicobacter pylori* no hospedeiro. Sua capacidade de adesão por meio das adesinas é um mecanismo importante para que a bactéria não seja eliminada pelo peristaltismo gástrico. A produção de uma enzima denominada de urease, a qual hidrolisa a uréia em amônia, promove elevação do pH

tornando-o levemente alcalino em torno da bactéria, permitindo assim sua sobrevivência no ambiente gástrico, e a penetração segura da bactéria no ácido clorídrico e na camada de muco. A urease ainda é responsável por estimular a produção de citotoxinas e lesar as células epiteliais da mucosa gástrica através de íons hidróxido. Portanto, atua como fator de virulência e mantenedor da infecção (JENKINS & BASSETT, 1997; VANDENPLAS & BADRIUL, 1999; OLIVEIRA, 2000 e BULKOOOL et al., 2002 ). Além disso, a amônia é diretamente tóxica para as células epiteliais gástricas (FLATLAND, 2002).

A sua morfologia em espiral e seus flagelos constituem-se em fatores que aumentam a sua virulência e patogenicidade, conferindo-lhe maior capacidade de mover-se ativamente através do suco gástrico e da camada de muco e se alojar na superfície das células de revestimento (VANDENPLAS & BADRIUL, 1999; OLIVEIRA, 2000; BULKOOOL et al., 2002).

O *Helicobacter pylori* também exerce sua patogenicidade por meio da produção de citotoxinas vacuolizantes, da produção de amônia que é lesiva à célula epitelial, da liberação de fosfolipases e de agentes pró-inflamatórios como lipopolissacaridases e do fator ativador das plaquetas (FAP)(JENKINS & BASSETT, 1997; OLIVEIRA, 2000 e BULKOOOL et al., 2002).

Duas citotoxinas são responsabilizadas por promoverem a vacuolização celular. A primeira, representada por uma proteína de 94 Kd denominada VacA que está ligada ao gene VacA e a outra de 128 Kd denominada CagA, que está ligada ao gene CagA. As amostras que não possuem o CagA não são consideradas toxigênicas. Recentemente, alguns autores observaram maior frequência de amostras toxigênicas em pacientes com gastrite atrófica, metaplasia intestinal e câncer gástrico. Entretanto, apesar da presença destes genes estar associada com inflamação mais grave, a natureza da doença clínica é determinada por fatores ambientais e do hospedeiro (OLIVEIRA, 2000; BULKOOOL et al., 2002).

Os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na maioria das bactérias estimulam várias atividades biológicas como ativação de complemento, febre, produção de citocinas e recrutamento de células inflamatórias, entre outras. Os LPS do *Helicobacter pylori*, entretanto, possuem baixa atividade biológica, o que resulta em boa adaptação do microrganismo à mucosa gástrica. Assim, outras substâncias estimulam mais o hospedeiro

que o LPS na infecção pelo *Helicobacter pylori* (OLIVEIRA, 2000 e BULKOOOL et al., 2002).

A presença do *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica associada à lesão da célula epitelial evoca resposta inflamatória que consiste na liberação de citocinas, dentre elas;

- interleucina 1 (IL1); IL2; IL6 e fator de necrose tumoral (TNF) pelas células inflamatórias;

- prostaglandinas, leucotrienos e agentes pró-inflamatórios (como as fosfolipases e Fator Ativador das Plaquetas (FAP));

- radicais livres de oxigênio.

O possível mecanismo para explicar a relação do *Helicobacter pylori* na patogênese dessas doenças tem sido a produção e circulação de citocinas acarretando reação imunomediada. Demonstrou-se recentemente que a infecção pelo *Helicobacter pylori* aumenta os níveis de TNF- alfa. A resposta inflamatória persistente mantida pela liberação de citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, TNF-alfa, interferon gama), prostaglandinas e leucotrienos, em resposta à infecção, seria um dos possíveis mecanismos implicados (OLIVEIRA, 2000; BULKOOOL et al., 2002).

A produção de catalases e superóxido dismutase conferem proteção à bactéria contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares, impedindo desta forma uma resposta eficaz do hospedeiro (OLIVEIRA, 2000 e BULKOOOL et al., 2002).

Ao contrário do que acontece com a infecção por *H. pylori* no homem, o significado da infecção por bactérias do gênero *Helicobacter* em cães ainda não está totalmente esclarecido, sendo necessários mais estudos para determinar se as patologias gástricas dos cães podem ser atribuídas a estas bactérias, apesar da alta frequência de infecção (SIMPSON & BURROWS,1997; JALAVA et al,1998).

Segundo FLATLAND (2002), em humanos a infecção por *H. pylori* está associada com o aumento da secreção gástrica (hiperacidez), o qual causa inflamação gástrica na região do antro (gastrite) e ulceração duodenal. Tem sido proposto que a hiperacidez ocorrida é causada por hipergastrinemia resultante da inibição da secreção celular de somatostatina (a somatostatina inibe a secreção de gastrina).

A infecção por *H. pylori* pode estar associada também com a redução da acidez gástrica (acloridria). Isso provavelmente ocorre quando o *H. pylori* causa atrofia da mucosa

do corpo e fundo gástrico ou inibição do funcionamento das células parietais. Inflamação crônica gástrica pode progredir para atrofia crônica e metaplasia intestinal, as quais são condições pré-cancerígenas (FLATLAND, 2002).

Parece que a infecção por *Helicobacter* não altera a secreção ácida gástrica em cães (FLATLAND, 2002). Contudo, PERKINS et al. (1996) disponibilizaram informações afirmando que furões naturalmente infectados com *H. mustaelae* estavam associados com hipergastrinemia, além de citarem que a erradicação do microorganismo levou à resolução da mesma.

Num estudo realizado com Beagles infectados com *H. felis* e *H. bizzozeronii* SIMPSON et al. (2000) concluíram que a presença da bactéria não interferia na secreção ácida e que o tratamento temporário suprimia mas não erradicava a mesma. Cães infectados apresentaram manifestações histológicas de gastrite leve antes e após o tratamento (leve inflamação gástrica também foi observada nos cães não infectados, do grupo controle do estudo).

## **2.5. Sinais clínicos**

Segundo JENKINS & BASSETT (1997), muitos seres humanos e animais com infecção por *Helicobacter* não apresentam sintomas clínicos. Alguns humanos entretanto, apresentam desconforto pós prandial, dor epigástrica.

De acordo com BAILLON & MARSHAL -JONES (2004), ainda não está bem claro se o *Helicobacter spp.* consegue induzir gastrite em cães e gatos. A opinião atual é de que os animais portadores são freqüentemente assintomáticos, embora sinais clínicos como vômitos crônicos, diarreia, febre, dor abdominal, eructação, dispepsia, enterocolite, anorexia, possam ser causados por estes organismos. Hematemese ou melena pode ser observado caso haja ocorrência de úlcera (JENKINS & BASSETT, 1997).

Em seres humanos, o *Helicobacter pylori* provoca gastrite aguda que, em poucos dias, se torna crônica. Esta gastrite crônica raramente manifesta sintomas, e em cerca de 20% dos infectados, progridem para doença ulcerosa. Existem evidências de que a maior parte das úlceras cura definitivamente se o *Helicobacter pylori* for erradicado. Entretanto, alguns casos podem evoluir para adenocarcinoma ou linfoma, dependendo da

susceptibilidade do hospedeiro, virulência da bactéria, idade de aquisição da infecção, fatores genéticos e ambientais e possivelmente outros fatores ainda desconhecidos (OLIVEIRA, 2000; BULKOOOL et al., 2002; BAILLON & MARSHALL- JONES, 2004).

Há evidências indicando que aproximadamente 95% das pessoas com úlceras duodenais estão infectadas com *H. pylori* (SIMPSON & BURROWS, 1997).

A ocorrência de organismos semelhantes ao *Helicobacter* tem sido estudada em cães e gatos clinicamente saudáveis e com sintomas gastrointestinais (GEYER et al., 1993; HAPPONEN et al., 1996). A alta prevalência destas bactérias sugere que as mesmas não apresentam potencial patogênico para os animais domésticos (SIMPSON et al., 2000). Desta forma WIINBERG et al. (2005) citaram uma prevalência de 67% a 100% em animais saudáveis e 74 a 90% em cães com vômitos, e em 100% em Beagles de laboratório.

Segundo JALAVA et al. (1998), uma infecção experimental de Beagles com *Helicobacter felis* causou gastrite nestes animais. LEE et al. (1992) verificaram que a inoculação de *Helicobacter pylori* em porcos e cães induziu gastrite crônica similar à gastrite associada com *Helicobacter pylori* em crianças. De acordo com HERMANNNS et al. (1995), sinais clínicos não são usualmente observados em animais infectados com bactérias do gênero *Helicobacter*. Entretanto GEYER et al. (1993) observaram que em casos isolados, vômito e alterações histopatológicas da mucosa podem estar associadas à infecção por bactéria gástrica.

## **2.6. Alterações histopatológicas em cães**

Segundo YAMASAKI et al. (1998), a relação entre as helicobactérias e sua manifestação clínica não tem sido identificada em cães e gatos, porque as mesmas tem sido encontradas em cães e gatos clinicamente saudáveis e doentes.

Organismos semelhantes ao *Helicobacter* em cães e gatos têm sido descritos em todas as regiões gástricas (HAPPONEN et al., 1996; EATON et al., 1996), sendo mais freqüente no fundo e corpo (HANDT et al., 1995; HAPPONEN et al., 1998; VIEIRA, 2004). Entretanto, YAMASAKI et al. (1998) ressaltaram que organismos espiralados gástricos foram detectados em 70% da região fúndica e 45% do piloro dos cães examinados em seu estudo.

Segundo FLATLAND (2002), estudos em cães e gatos naturalmente infectados, têm mostrado que o *Helicobacter* coloniza predominantemente a região gástrica do fundo e cárdia, e está associado com leve a moderada inflamação com predomínio de células mononucleadas.

Já LEE et al. (1992) salientaram que, anatomicamente, as bactérias podem ser vistas na região do cárdia e na junção do fundo com o piloro, e a sua presença está correlacionada com hiperplasia linfóide nessas áreas, sugerindo uma relação de causa e efeito.

Ao exame histopatológico as bactérias podem ser encontradas principalmente na superfície do muco, nas criptas gástricas, nas glândulas gástricas e nas células parietais (EATON et al., 1996; CATOLLI et al., 1999; JENKINS & BASSETT, 1997; HAPONEN et al., 1998; SIMPSON et al., 1999; HWANG et al., 2002).

O diagnóstico de gastrite leve a moderada é achado freqüente em cães sadios e naqueles com doença gástrica, independente do grau de colonização gástrica pela bactéria (HERMANNNS et al., 1995; HAPONEN et al., 1998; CATOLLI et al., 1999; HWANG et al., 2002). Desta forma, WIINBERG et al. (2005) relataram que a gastrite é um achado comum em cães, sendo observado em 35% de cães investigados com vômito crônico e em 26 a 48% dos cães assintomáticos.

Não foi observada correlação entre o grau de inflamação e o de colonização por *Helicobacter* (FLATLAND, 2002). Contudo, HAPONEN et al. (1998) afirmaram que alterações histológicas como inflamação, aglomerados linfóides e mudanças degenerativas nas células parietais, tem assumido um indicativo de patogenicidade das helicobactérias.

Num estudo realizado por YAMASAKI et al. (1998), a prevalência de organismos semelhantes ao *Helicobacter* foi de 60% em cães com 1 ano ou menos, e 80% em cães com 5 anos ou mais. Entretanto, segundo VIEIRA (2004), não há correlação entre o grau de colonização pelo *Helicobacter* e a faixa etária dos cães acometidos.

WIINBERG et al. (2005) citaram que durante a avaliação histopatológica pode ser observado o tipo e o número de infiltrado celular, onde predominam linfócitos, plasmócitos, células mononucleadas, eosinófilos e neutrófilos, além da presença de atrofia, hipertrofia, metaplasia, fibrose, edema e aglomerados linfóides.

De acordo com WIINBERG et al. (2005), a infecção crônica por *H. pylori* em humanos adultos é caracterizada pela infiltração de células polimorfonucleadas e

mononucleadas. Neste mesmo contexto, BAILLON & MARSHAL-JONES (2004), ressaltaram que as infecções crônicas em gatos com *H. pylori* podem apresentar as mesmas características da infecção por longo prazo com *H. pylori* em seres humanos, incluindo o desenvolvimento de processos paraneoplásicos.

Corroborando com os autores acima, WIINBERG et al. (2005), afirmaram que a gastrite em cães geralmente é caracterizada pela presença de leve a moderado infiltrado superficial linfoplasmocitário, com atrofia e fibrose sendo relativamente incomum.

Segundo HANDT et al. (1995), o desenvolvimento de nódulos linfóides na mucosa gástrica tem sido associados à presença de organismos semelhantes ao *Helicobacter* em cães e gatos, podendo estar relacionado principalmente à infecção crônica.

HAPPONEN et al. (1998), observaram a presença de aglomerados linfóides tanto em cães que apresentavam *Helicobacter* com sintomatologia de gastrite quanto em cães saudáveis, sendo observado mais comumente na região do corpo gástrico e do fundo respectivamente destes animais.

## **2.7. Métodos de diagnóstico**

O diagnóstico da infecção por organismos semelhantes ao *Helicobacter* pode ser feito por métodos invasivos e não invasivos. Os métodos invasivos requerem a realização de endoscopia para a coleta de fragmentos de mucosa gástrica e incluem teste rápido de urease, citologia, histopatologia, cultura e PCR. Os métodos não invasivos detectam a presença de *Helicobacter* indiretamente, e compreendem o teste respiratório com uréia marcada e sorologia (NEIGER et al., 1998). Em medicina veterinária, os métodos de diagnóstico mais utilizados são o teste da urease, a citologia, o exame histopatológico e a cultura (ARAÚJO & FERREIRA, 2002).

O teste da urease, de fácil realização, é rápido e barato, e revela a urease produzida pelos organismos gástricos semelhantes ao *Helicobacter*. O teste rápido de urease é muito usado como método de diagnóstico porque as helicobactérias são potentes produtoras de urease. O procedimento envolve a incubação da amostra com uréia a 10% em água destilada e vermelho fenol como indicador de pH. A cor muda quando a urease hidrolisa a uréia em amônia e bicarbonato, o qual eleva o pH, assumindo uma coloração de tonalidade

rosa (STRAUSS-AYALI & SIMPSON, 1999). A rápida mudança de pH pode ser proporcional a densidade de helicobactérias (BELLI et al., 2003), tendo como principal vantagem a rapidez que o teste é obtido (com a frequência de 1 hora ou menos), sendo usado geralmente em conjunto com o exame histopatológico (JENKINS & BASSETT, 1997; GEMI, 2001). Atualmente existem “kits” comerciais que contêm uma combinação de uréia e um indicador de pH (STRAUSS-AYALI & SIMPSON, 1999).

Falso-negativo pode ocorrer após o tratamento devido ao baixo número de bactérias encontradas na amostra gástrica e também nos casos em que se usaram drogas anti-secretórias. Falso-positivo pode resultar do aumento de pH devido à contaminação da amostra com sangue ou a produção de urease por bactérias da cavidade oral (FLATLAND, 2002). Outras bactérias gástricas produtoras de urease, como o *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, também podem ocasionar falso-positivo (HAPPONEN et al., 1996).

A sensibilidade e especificidade do teste rápido de urease tem sido muito bem reportada (88-100%), exceto em pacientes com sangramento de úlceras duodenais (FLATLAND, 2002).

A citologia é um método sensível, pouco invasivo, de procedimento fácil e rápido diagnóstico, na qual as helicobactérias podem ser visualizadas facilmente através da coloração de Gram (STRAUSS-AYALI & SIMPSON, 1999).

A cultura do microorganismo é um método menos sensível do diagnóstico da infecção por *Helicobacter*, devido ao fato do *H. pylori* ser de difícil cultivo em meio de cultura e o *H. heilmannii* ainda não ter sido cultivado com sucesso (NEIGER et al., 1998; SOLNICK, 2003). Contudo, CATTOLI et al. (1999) ressaltaram que há, no estômago de cães, três espécies diferentes de helicobactérias que têm sido cultivadas com sucesso: *H. felis*, *H. bizzozeronii* e *H. salomonis*. A vantagem da cultura é que permite, a diferenciação das colônias e a determinação da sensibilidade antimicrobiana (FLATLAND, 2002).

O *H. pylori* cresce em meio de cultura com morfologia idêntica ao do *H. heilmannii* (PRIESTNALL et al., 2004).

Dos métodos invasivos, a cultura de amostras de biópsias gástricas é considerada um excelente método de diagnóstico. Entretanto, as helicobactérias apresentam características que dificultam a realização da cultura podendo ocorrer, resultados falso-

negativo podem ocorrer devido a baixa viabilidade da bactéria na amostra, não conseguindo ser cultivada (com 6 a 24 horas, dependendo da temperatura, além do ambiente de microaerofilia necessário) FLATLAND (2002)).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica que amplifica o segmento de material genético de organismos como o *Helicobacter*, permite definir e identificar as espécies de *Helicobacter* e pode ser realizado usando-se biópsia gástrica, suco gástrico, placa dentária ou fezes. A sensibilidade varia com o primer usado, contudo é considerada alta (FLATLAND, 2002). Entretanto, sua disponibilidade limitada e seu custo elevado restringem o emprego desse método (STRAUSS-AYALI & SIMPSON, 1999).

O exame histopatológico é o melhor método de diagnóstico, pois tem a vantagem de permitir a avaliação das alterações teciduais, a presença de células inflamatórias e a localização das bactérias na mucosa gástrica. No entanto, múltiplas biópsias devem ser obtidas de cada área do estômago devido à distribuição desigual das bactérias (STRAUSS – AYALI & SIMPSON, 1999; FLATLAND, 2002).

Segundo JENKINS & BASSETT (1997), a maior vantagem na avaliação microscópica do tecido gástrico é que se pode determinar a extensão e severidade das alterações inflamatórias do trato gastrointestinal.

Pode-se usar a histopatologia por meio de coloração de hematoxilina e eosina (H-E) para demonstrar organismos espiralados grandes sobre o muco gástrico. Métodos especiais como coloração pela prata (Warthin-Starry e Steiner Modificado) ou Carbol-Fucsina (Fucsina fenicada) facilitam a detecção de um número menor de bactérias do que pela H-E, e são facilmente distinguidas na mucosa, especialmente nas glândulas parietais (STRAUSS-AYALI & SIMPSON, 1999; FLATLAND, 2002)

O exame histopatológico não permite a identificação definitiva de diferentes espécies de *Helicobacter* (JENKINS & BASSETT, 1997). O diagnóstico é feito por meio de sua morfologia em espiral, comparado com o *H. pylori*. Entretanto, grande variedade de organismos alongados, espiralados como o *H. felis*, *H. salomonis*, e *H. bizzozeronii* são indistinguíveis do *H. heilmannii* na rotina por microscópio de luz (JALAVA et al., 1998; PRIESTNALL et al., 2004). Contudo, diferenças morfológicas entre *H. heilmannii* e o *H. pylori* podem ser observadas histologicamente (JENKINS & BASSETT, 1997). Enquanto o *H. pylori* é menor (2-4 µm) e pode estar presente na forma de coco, o *H. heilmannii* é mais

alongado e espiralado (7-10 mm) com 6 a 8 espirais por célula e 12 flagelos em cada extremidade (EATON et al., 1996; SIMPSON & BURROWS, 1997; SIMPSON et al., 1999; KATO et al., 2004).

De acordo com FLATLAND (2002), o *H. pylori* geralmente não pode ser visualizado comumente pela coloração de hematoxilina e eosina, a não ser quando a incidência é muito alta.

A especificidade da histopatologia é 100% e uma sensibilidade maior que 90% tem sido descrita (FLATLAND, 2002).

A detecção de anticorpos circulantes (IgG) à *H. pylori* é uma forma sensível e não específica de diagnóstico não invasivo da infecção do *Helicobacter* em humanos e é facilitada pela investigação dos fatores de risco para a infecção. A sorologia tem valor limitado na avaliação da resposta da infecção ao tratamento com antibióticos e antiácidos, já que os títulos de anticorpos podem diminuir lentamente depois da erradicação do microrganismo. A sorologia pode ser pouco confiável em pacientes cuja a resposta imunitária é inadequada, como em indivíduos imunodeficientes, ou pacientes muito jovens e muito velhos (SIMPSON & BURROWS, 1997).

Anticorpos de *H. pylori* pode ser detectado na saliva, porém este método apresenta menor sensibilidade e especificidade (81% e 73%, respectivamente) que o teste sorológico (90% sensibilidade e 78% especificidade) como foi observado num estudo recente com 213 pacientes com dispepsia (FLATLAND, 2002), porém não é comumente usado em medicina veterinária.

## **2.8. Tratamento**

Segundo FLATLAND (2002), o tratamento para a infecção por *Helicobacter* em cães e gatos é bastante controverso. Quando o tratamento se faz necessário e a droga a ser utilizada ainda não está claro. A eficácia do tratamento é desconhecida e a resistência às drogas ainda é um problema para os pacientes veterinários.

### 2.8.1. Terapia Tripla

O tratamento ideal para o combate ao *Helicobacter pylori* é o da na terapia com três componentes (terapia tripla) que consiste na utilização de dois antibióticos como a amoxicilina ou tetraciclina e o metronidazol, associados a uma substância para diminuir a produção de ácido clorídrico existente no suco gástrico. Como por exemplo o uso de inibidores da bomba de prótons (IBP), sendo mais utilizado o omeprazol (MÉGRAUD & DOERMANN, 1998; HAPPONEN et al., 2000; O’GARA et al., 2000, MCNULTY et al., 2001; IIMURO et al., 2002; SOLNICK, 2003). Compostos à base de bismuto são freqüentemente incluídos no tratamento em conjunto com a antibioticoterapia. (JENKINS & BASSETT, 1997). A duração do tratamento é de 1 a 2 semanas (FLATLAND, 2002).

Segundo FLATLAND (2002), a clássica terapia tripla em humanos consiste de bismuto, metronidazol e tetraciclina. Novas terapias triplas preferem a combinação de antibióticos e inibidores da bomba de próton. Quádrupla terapia refere-se à clássica terapia tripla, sendo modificada pelo aumento na dose de metronidazol e adicionando o inibidor da bomba de próton.

Segundo O’GARA et al., (2000) e MCNULTY et al., (2001), um dos principais problemas encontrados em relação a terapia combinada com antibióticos para *Helicobacter pylori* é a resistência à certas drogas, como o metronidazol, claritromicina, amoxicilina e tetraciclina.

Para BAILLON & MARSHAL-JONES, (2004), a maior parte dos estudos terapêuticos não conseguiram demonstrar a erradicação a longo prazo do *Helicobacter spp* e atualmente ainda não está perfeitamente esclarecido se resulta de reinfecção ou recrudescência. Contudo, HAPPONEN et al. (2000) citaram que a reinfecção com *H. pylori* é rara após uma erradicação com sucesso. Podendo ser confirmada com quatro a oito semanas após o término do tratamento (JENKINS & BASSETT, 1997). Entretanto, este mesmo autor, observando o efeito da terapia tripla para erradicação das helicobactérias em cães, constatou recorrência em 4 dos 9 cães tratados, 3 meses após aplicação do tratamento.

De acordo com SIMPSON & BURROWS (1997) e MCNULTY et al. (2001), nenhum medicamento antimicrobiano, por si só, tem conseguido uma taxa de erradicação

adequada. E corroborando esses autores, os mesmos afirmaram que a combinação de antimicrobianos e agentes antissecretores gástricos (como a ranitidina e o omeprazol) tem apresentado as taxas de erradicação mais altas (80-90%). Tanto antagonistas dos receptores H<sub>2</sub>, quanto inibidores da bomba de próton podem ser usados como terapia anti-secretora. Porém, os inibidores da bomba de próton são mais utilizados porque eles suprimem a produção de ácido mais rapidamente, possibilitando uma melhora e cura mais rápida das úlceras, além de apresentar atividade anti-*H. pylori* “in vitro” (FLATLAND, 2002).

Os efeitos sobre a erradicação de *Helicobacter* em cães com gastrite não está bem esclarecido. Contudo, estudos preliminares indicam uma resposta clínica de 26% dos cães afetados (WIINBERG et al., 2005).

Segundo KATO et al. (2004), parece que o *H. heilmannii* é mais fácil de se erradicar que o *H. pylori*. Em um estudo onde o *H. heilmannii* foi cultivado, o organismo mostrou-se sensível à tetraciclina, amoxicilina e eritromicina, porém foi resistente ao metronidazol. Entretanto, na população pediátrica o *H. heilmannii* é erradicado com sucesso em tratamento com amoxicilina associado com metronidazol ou claritromicina.

É importante a investigação do *Helicobacter* depois do tratamento para assegurar que a erradicação foi realizada com êxito. A realização de novas biópsias endoscópicas 30 dias depois de completar o tratamento antimicrobiano são as únicas formas definitivas capazes de assegurar que a infecção tenha sido erradicada (SIMPSON & BURROWS, 1997).

### **2.8.2. Utilização da própolis**

A própolis é uma substância resinosa, balsâmica, de consistência viscosa e cor variando entre o verde pardo e castanho escuro ou outras tonalidades, dependendo de sua origem botânica. É elaborado pelas abelhas a partir de resinas de broto e de outras partes do tecido vegetal, consistindo ainda de uma mistura de enzimas salivares, cera, pólen e materiais inorgânicos (BOYANOVA et al., 2003).

A própolis desempenha, dentre outras, duas funções básicas: atua como bacteriostático, esterilizando a colméia e impedindo a propagação de bactérias e fungos, e também age como isolante térmico, revestindo e envernizando internamente a colméia. Sua

utilização como tratamento adjuvante de processos inflamatórios se, mantém ao longo dos anos e, nos dias atuais, grande número de investigações científicas são realizadas, envolvendo o emprego de preparados com própolis nos campos da biologia, medicina humana e veterinária (BANSKOTA et al., 2001).

#### **2.8.2.1. Propriedades da própolis**

A própolis bruta encontra-se no estado sólido, sendo dura a 15°C, tornando-se pastosa ou semi-fluida à partir dos 30°C. Suas propriedades físicas, como cor, odor e faixa de fusão (60° - 70°C) variam de amostra para amostra. Devido à grande diversidade de espécies vegetais brasileiras polinizadas pelas abelhas, ocorre elevada variação de seus princípios ativos. Sua composição química é extremamente complexa e varia de acordo com a sua origem botânica, tendo sido isolados mais de 300 componentes químicos. Assim, tem sido demonstrado que os principais componentes da própolis com propriedades biológicas pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, que explicam, em parte, a grande variedade das propriedades terapêuticas relatadas por diversos pesquisadores. É constituída de modo geral, por 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de compostos voláteis e 5% de pólen e outros compostos inorgânicos (BANSKOTA et al., 2001; BOYANOVA et al., 2003).

#### **2.8.2.2. Efeitos biológicos**

Dentre as principais atividades biológicas atribuídas a própolis, BANSKOTA et al. (2001) destacam as seguintes: antimicrobiana (bacteriana, micótica e viral), antiparasitária (Giárdia e Trichomonas), antiinflamatória (cicatrizante e de regeneração tecidual), antioxidante (prevenindo o envelhecimento precoce), antitumoral, vasoprotetora, imunomoduladora (estimula a produção de anticorpos) e broncodilatadora (permitindo a eliminação de secreções).

### **2.8.3. Utilização do alho**

O alho (*Allium sativum*) é um vegetal da família Liliaceae, sendo encontrado na forma de raiz. Seu bulbo, vulgarmente conhecido como cabeça, é constituído por vários nódulos (dentes), os quais são empregados como condimento culinário e como medicamento, há centenas de anos, em todo o mundo (HEINERMAN, 1997; SATO & MIYATA, 2000) Nesse último contexto, o extrato de alho na dosagem de 2 g/l tem sido utilizado e se revelado efetivo para inibir o crescimento de vários microorganismos, dentre eles o *Helicobacter pylory*.

#### **2.8.3.1. Propriedades do alho**

Grande número de pesquisas científicas foram realizadas visando estabelecer as principais propriedades terapêuticas do alho. Depois de inúmeras análises químicas, verificou-se que a grande riqueza do alho se encontra nos seus mais de 30 componentes isolados, especialmente nos derivados de enxofre (sulfatados). Entre eles, o mais importante é, sem dúvida, a alicina (di-propenyl tiosulfonato), responsável pela maioria das propriedades farmacológicas da planta, incluindo a sua atividade antimicrobiana. A alicina é um líquido de coloração amarelada, responsável também pelo odor característico da planta, que só aparece quando o alho é mastigado ou cortado, rompendo-se as células do bulbo (HEINERMAN, 1997; SATO & MIYATA, 2000; SIVAM, 2001; MARTIN & ERNST, 2003; CANIZARES et al., 2004).

#### **2.8.3.2. Efeitos biológicos**

Assim como vários outros pesquisadores, HEINERMAN (1997) e SATO & MIYATA (2000) atribuem ao alho várias propriedades biológicas, destacando dentre elas as suas ações anti-bacteriana, anti-inflamatória, analgésica, anti-térmica, antiparasitária, anti-séptica, anti-oxidante, estimulante circulatório, diurética, hipotensora, purificadora do sangue, antitumoral, imunomoduladora e hipocolesterolêmica (SIVAM et al., 1997; CANIZARES et al., 2004).

Além disso, outros trabalhos têm demonstrado as ações bactericidas do alho, e os resultados têm sido bastante promissores.

Um estudo realizado com gerbils da Mongólia, nos quais foi inoculado *Helicobacter pylori* e tratados com extrato de alho a 1, 2 e 4% na sua dieta durante 6 semanas, mostrou ser dose dependente, no qual as lesões gástricas diminuíram de acordo com a dose, sendo significativa a 4%. A quantidade de petéquias e hemorragias reduziram. Entretanto, não houve diferenças significativa no número de bactérias viáveis no estômago, mostrando-se similar tanto no grupo controle quanto naqueles tratados com extrato de alho (IIMURO et al., 2002).

Num estudo epidemiológico realizado por YOU et al. (1998), foi reportado a prevalência de câncer de estômago, correlacionando-o com a presença de *Helicobacter pylori* e o consumo de alho, no qual ficou constatado que a redução da incidência de câncer gástrico estava relacionado ao consumo de alho.

Segundo O’GARA et al. (2000), há relatos de irritação gástrica em certos pacientes, logo a alicina deve ser usada com cautela especial em pacientes com lesão na mucosa gástrica ou inflamação. O uso excessivo de extrato ou cápsulas de alho pode causar irritação gástrica, algumas vezes com febre, cólicas intestinais, cistite e vômitos.

GRAHAM et al., (1999) observaram efeitos colaterais como diarreia, flatulência, hálito de alho, bem como odor de alho pelo corpo, em pacientes tratados.

Efeito sinérgico do extrato de alho com omeprazol “in vitro” sugere, que o uso com o inibidor da bomba de prótons pode ser usado com sucesso (CELLINI et al., 1996; O’GARA et al., 2000).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais utilizados**

Foram utilizados 28 cães adultos, clinicamente sadios, sem raça definida, oito machos e 20 fêmeas, com peso variando entre 6 e 25 Kg, provenientes do canil experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Após vermifugação, os animais foram alojados em baias coletivas, com quatro animais em cada uma, onde recebiam água e ração à vontade.

#### **3.2. Endoscopia e biópsia da mucosa gástrica**

Antes da realização das endoscopias e biópsias gástricas todos os cães foram submetidos a um jejum sólido de 12 horas e hídrico de duas horas. Os animais receberam acepromazina<sup>1</sup> 1% como medicação pré-anestésica na dose de 0,1 mg/Kg pela via intravenosa. Cerca de 10 minutos depois, a anestesia geral foi induzida com tiopental sódico<sup>2</sup> na dose de 12,5 mg/Kg, por essa mesma via, para permitir a intubação endotraqueal e endoscopia. Após atingir o plano anestésico, caracterizado por movimentos respiratórios regulares e ausência de reflexos motores, foi iniciada a endoscopia e posteriormente as biópsias. A manutenção da anestesia foi realizada com dose suplementar do anestésico, quando necessário.

Os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo, possibilitando a introdução de um gastroscópio, modelo Olympus CV-1, com 9,5 mm de diâmetro. No intervalo entre a realização de cada procedimento, todo o equipamento e instrumental era esterilizado utilizando imersão em solução de glutaraldeído 2%, evitando desta forma, a transmissão de eventuais doenças pela forma iatrogênica, por meio do uso de endoscópios e sondas contaminados.

<sup>1</sup> Acepram® Univet S.A., São Paulo, Brasil

<sup>2</sup> Thiopentax® Cristalia S. A., São Paulo, Brasil

Nos cães utilizados no presente experimento e submetidos ao exame endoscópico do estômago, procederam-se os exames da integridade da mucosa observando sua coloração, da presença de lesões pré-ulcerativas e ou ulcerativas, de alterações circulatórias, da presença de parasitas e outras alterações em sua superfície.

Após a endoscopia foram colhidos fragmentos da mucosa gástrica obedecendo a um mapeamento realizado previamente e correspondendo às regiões do corpo e do antro gástricos. Esses fragmentos foram submetidos a exames citológicos, histopatológico e ao teste de urease.

Após a realização dos procedimentos descritos acima os animais retornaram para as suas respectivas baias, onde permaneceram até o final do tratamento para posterior realização de um novo exame endoscópico e novas biópsias.

Para o teste rápido de urease, foram colhidos fragmentos da mucosa da região do corpo gástrico que eram colocados em “kit” comercial, para detectar *Helicobacter pylori*, contendo uréia e indicador de pH vermelho fenol. O teste era considerado positivo quando a solução adquiria uma coloração de tonalidade rosa, indicando presença da bactéria devido à liberação de amônia. Registra-se que o teste é baseado na produção de urease que hidrolisa a uréia em amônia, aumentando o pH local. A reação foi considerada fortemente positiva naqueles casos em que a viragem do meio ocorreu entre uma e três horas, ou fracamente positiva nas amostras em que a reação ocorreu após quatro horas.

### **3.3. Preparo do material para avaliação histopatológica**

Os fragmentos de mucosa gástrica foram fixados em formol neutro tamponado a 10%, por 24 horas, desidratados em concentrações crescentes de álcool, clareados em xilol e incluídos em parafina, seguindo-se a técnica preconizada para utilização na rotina em histopatologia.

Os cortes com espessura de 4 µm foram corados e analisados em microscopia de luz, sendo os resultados expressos em diferentes graus, utilizando para tal os seguintes parâmetros: infiltração inflamatória, degenerações glandulares, número de aglomerados linfóides e concentração de bactérias espiraladas, por campo microscópico de 400 vezes.

A coloração pela Carbol-Fucsina foi utilizada visando à identificação de bactérias espiraladas do gênero *Helicobacter* e a quantificação do grau de colonização.

A coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE) foi usada para realizar a descrição histológica adequada, incluindo a identificação de eventuais alterações inflamatórias, a natureza e o número de infiltrado celular, degeneração glandular e a presença de aglomerados linfóides na mucosa gástrica. O grau de gastrite foi estimado com base na quantidade de infiltrado de linfócitos, plasmócitos ou polimorfonucleares na lâmina própria.

### **3.4. Tratamento dos animais**

Os animais utilizados foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com sete animais cada: o Grupo 1 receberam cápsulas controle (vazias); o Grupo 2 receberam 20 gotas de extrato de própolis a 30% a cada 24 horas, o Grupo 3 receberam 500mg de óleo de alho em cápsulas diariamente, ambos durante 30 dias e o Grupo 4 receberam tratamento consistindo de Amoxicilina<sup>3</sup>, Metronidazol<sup>4</sup> e Omeprazol<sup>5</sup>, na dose de 20mg/Kg a cada 12 horas, 25mg/Kg e 20mg/Kg a cada 24 horas respectivamente, durante 15 dias consecutivos. Após este período, os animais foram submetidos a um novo exame endoscópico e colheita de fragmentos das regiões contra-laterais da mucosa fúndica e antral do estômago.

<sup>3</sup> Amoxicilina 500mg® Rambaxy S.A., São Paulo, Brasil

<sup>4</sup> Polibiotic 250mg® Prati S.A., São Paulo, Brasil

<sup>5</sup> Petprazol 10® Vetnil S.A., São Paulo, Brasil

### 3.5. Análise estatística

Após processamento e análise histológica e mensuração da densidade de bactérias, os resultados foram submetidos a procedimentos estatísticos, visando a comparação de médias por meio do Teste de Wilcoxon, ao nível de significância de 5%, além do teste de Coeficiente de Correlação Pearson. Os dados obtidos no experimento foram processados, utilizando-se o sistema SAEG 4.0 (Sistema para análises estatísticas e genéticas)

Para análise histológica foi realizada avaliação qualitativa, onde foram atribuídos escores, considerando a densidade de bactérias espiraladas por campo (400x), a presença de células inflamatórias, o número de agregados linfóides e a existência de alterações degenerativas glandulares (HAPPONEN et al., 1998; IIMURO et al., 2002), conforme o disposto na Tabela 1.

**Tabela 1. Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de acordo com a densidade de bactérias espiraladas, intensidade do infiltrado inflamatório, número de agregados linfóides e degenerações glandulares.**

<b>Graus</b>	<b>DENSIDADE DE BACTÉRIAS ESPIRALADAS</b>	<b>INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO</b>	<b>AGREGADOS LINFÓIDES</b>	<b>DEGENERAÇÕES GLANDULARES</b>
<b>0</b>	ausente	normal	nenhum	nenhuma
<b>1</b>	leve	leve	1 agregado	menos do que 20% das glândulas com degeneração
<b>2</b>	moderada	moderada	2 agregados	de 20 a 50% das glândulas com degeneração
<b>3</b>	severa	severa	3 ou mais agregados	> 50% glândulas com degeneração

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação endoscópica da mucosa gástrica

Na maioria dos cães, a avaliação endoscópica do estômago se revelou aparentemente normal. 12 animais apresentaram alterações macroscópicas como erosões na mucosa (sete cães) e hemorragias petequiais (cinco animais). Alguns animais apresentaram alterações de forma simultânea (três cães). O histórico dos animais não era conhecido, pois os mesmos eram provenientes do canil experimental da UFV. Sabe-se contudo, que os animais não apresentavam sinais clínicos relacionados com as alterações macroscópicas observadas. Praticamente todos os cães apresentavam estrias avermelhadas na região do antro, sugerindo ser esse aspecto um achado usual em animais infectados por *Helicobacter* nessa região.

### 4.2. Teste da urease

O teste da urease e o exame histopatológico revelaram a presença de *Helicobacter* em todos os cães que se constituíram em amostras para o experimento em tela.

Durante a realização do teste de urease, houve variação no tempo de mudança de coloração do meio indicador.

Em 28,57% das amostras, a mudança de coloração ocorreu após 4 horas (prova fracamente positiva) e, em 71,42% das amostras, a viragem do meio ocorreu em até três horas (prova fortemente positiva), indicando que todos os animais da amostra, embora com diferentes intensidades, conviviam com a bactéria.

Houve correlação positiva entre o teste de urease e a densidade de bactérias, revelando que quanto maior a densidade de bactérias nas regiões gástricas pesquisadas maior a positividade do teste de urease.

O presente estudo não demonstrou a ocorrência de falsos positivos e de falsos negativos no teste de urease verificada por meio da correlação dos resultados deste teste com a visualização da bactéria nos fragmentos de mucosa corados pela Carbol-Fucsina.

Após os tratamentos, os testes de urease apresentaram-se negativo nos animais tratados com a terapia tripla e praticamente inalterado no grupo controle e naqueles em que foram utilizados extrato de própolis e óleo de alho.

#### **4.3. Exame histopatológico**

As alterações mais freqüentemente observadas ao exame histopatológico em cortes corados pela Hematoxilina-Eosina, foram infiltrados celulares predominantemente de mononucleares (linfócitos e plasmócitos) presentes na grande maioria dos fragmentos de mucosa examinados, ocorrência de aglomerados linfóides, hiperemia e degenerações glandulares.

Os infiltrados de células inflamatórias eram difusos, na maioria dos casos e a maior fração das amostras apresentou leve infiltrado inflamatório (escore 1), ocorrendo predominantemente na região fúndica em relação à região antral. Apenas algumas amostras não apresentaram infiltrado inflamatório (escore 0) ou exsudação celular em grau muito intenso (escore 3).

As degenerações glandulares, de pequena a média intensidade ocorreram de forma equivalente nas duas regiões da mucosa gástrica que foram submetidas à análise.

Já os aglomerados linfóides foram de menor ocorrência e se faziam mais freqüentes na mucosa fúndica quando comparada com a mucosa antral.

As preparações coradas pela Carbol-Fucsina permitiram a visualização das bactérias espiraladas, quantificadas nas regiões do corpo e antro gástrico. As bactérias possuíam coloração avermelhada e, em todos os casos, apresentavam-se grandes, alongadas, espiraladas, morfológicamente semelhantes ao *Helicobacter heilmannii*. Encontravam-se presentes, ora na superfície epitelial junto ao muco, ora nas criptas gástricas e ainda nas glândulas gástricas. Bactérias morfológicamente semelhantes ao *H. pylori* não foram observadas em nenhum animal.

## **4.4. Tratamentos**

### **4.4.1. Grupo Controle**

Neste grupo observou-se que cinco cães apresentavam infiltrado inflamatório na região do corpo gástrico antes do tratamento, sendo que em cinco casos a reação inflamatória mostrou-se inalterada, em um animal houve redução, enquanto o outro cão exibiu aumento do exsudato celular. No antro, a reação flogística estava presente em seis animais, havendo redução após aplicação do controle em dois animais, mantendo-se inalterada em quatro situações e aumentando em um animal.

A degeneração glandular presente na região do corpo gástrico de quatro animais aumentou após administração do placebo em três casos, diminuiu em dois e manteve-se inalterada em dois cães. Na região do antro, esse aspecto que estava presente em quatro animais sofreu elevação em quatro cães, manteve-se inalterada em duas e diminuiu em um cão.

Em apenas uma ocasião foi verificada a presença de agregados linfóides na região do corpo gástrico antes do tratamento, e após administração do controle o número de aglomerados linfóides encontrados no corpo gástrico aumentou em três animais, e manteve-se inalterado em um cão. Na região do antro foi observada a presença de aglomerado linfóide em apenas uma ocasião antes do tratamento, situação essa que não persistiu após o tratamento.

Quanto ao grau de colonização, as bactérias espiraladas se faziam presentes em todos os fragmentos de mucosa fúndica e antral examinados, verificando-se no grupo controle a persistência dos mesmos graus de colonização bacteriana em cinco fragmentos da mucosa fúndica estudados, havendo redução em apenas um caso e aumento da colonização em outro. No antro, a colonização se revelou inalterada em seis ocasiões, havendo aumento em um animal.

Os resultados que expressam todos os parâmetros analisados no grupo controle encontram-se resumidos na Tabela 2.

A análise estatística envolvendo o tratamento realizado com o grupo controle não revelou diferença significativa em nenhuma das variáveis analisadas.

#### **4.4.2. Óleo de alho**

No tratamento à base do óleo de alho verificou-se que dos sete animais que constituíam o grupo experimental cinco cães apresentavam infiltrado inflamatório na região do corpo gástrico antes do tratamento sendo que desses, quatro animais apresentaram redução da exsudação celular. No antro, a reação flogística estava presente em dois animais, havendo redução após o tratamento em um cão e mantendo-se inalterada em outro animal.

Em quatro animais foram observadas degenerações glandulares na região do corpo e em dois cães na região do antro, que após a administração do óleo de alho, não mais se faziam presentes nas mucosas analisadas.

Em dois cães foram notadas as presenças de aglomerados linfóides na mucosa fúndica que, também desapareceram após o tratamento.

Quanto ao grau de colonização, as bactérias espiraladas se faziam presentes em todos os fragmentos de mucosa fúndica e antral examinados e, após aplicação do óleo de alho, verificou-se que, embora persistisse a presença de bactérias, houve redução do grau de colonização em cinco animais na região do corpo e em quatro cães na região do antro.

Os resultados envolvendo todos os parâmetros estudados antes e após o tratamento com óleo de alho encontram-se sumarizados na Tabela 3.

De acordo como o teste de Wilcoxon, foi observado que animais tratados com o óleo de alho apresentaram redução significativa do infiltrado inflamatório e da densidade de *Helicobacter spp.* na região do corpo gástrico. As análises também revelaram que nesse tratamento, os animais apresentaram redução significativa da degeneração glandular tanto da região fúndica quanto da região antral.

#### **4.4.3. Extrato de própolis**

Observou-se que os sete cães que constituíam esse grupo apresentavam infiltrado inflamatório na região do corpo antes do tratamento, sendo que desses, três animais apresentaram redução, dois cães exibiram aumento e em outros dois animais a reação inflamatória mostrou-se inalterada. No antro, a reação flogística estava presente em seis

animais, havendo redução após o tratamento com própolis em dois cães e mantendo-se inalteradas nos outros quatro animais.

A degeneração glandular presente na região do corpo gástrico de quatro animais sofreu redução após administração de própolis em três casos. Na região do antro, esse aspecto, que estava presente em três ocasiões, sofreu redução em duas, manteve-se inalterada em quatro e aumentou em um cão.

Após o tratamento com extrato de própolis, o número de agregados linfóides do corpo gástrico aumentou em três animais, diminuiu em dois e revelou-se inalterado em dois cães. Na região do antro, não foi observada a presença de aglomerado linfóide, nem antes e nem após o tratamento.

Quanto ao grau de colonização, as bactérias espiraladas se faziam presentes em todos os fragmentos de mucosa oxíntica e antral examinados e, após aplicação da própolis, verificou-se a persistência dos mesmos graus de colonização bacteriana em seis fragmentos da mucosa fúndica estudados, havendo redução em apenas um caso. No antro, a colonização se revelou inalterada em quatro ocasiões, aumentou em duas e diminuiu em apenas um animal.

Os resultados que expressam todos os parâmetros analisados antes e após o tratamento com extrato de própolis encontram-se dispostos na Tabela 4.

A análise estatística envolvendo o tratamento realizado com o extrato de própolis não revelou diferença significativa nas variáveis analisadas.

#### **4.4.4. Terapia Tripla**

Neste grupo, diagnosticou-se infiltrado inflamatório na região do corpo em seis cães antes do tratamento, sendo que em cinco casos a reação inflamatória mostrou-se inalterada, em um animal houve redução, enquanto o outro cão exibiu aumento da exsudação de células inflamatórias. No antro, a reação flogística estava presente em todos os animais, havendo redução após aplicação da terapia tripla em três animais, mantendo-se inalterada em dois e aumentando em dois outros.

A degeneração glandular presente na região do corpo e do antro gástrico de todos os animais, após a terapia, diminuiu em um caso e manteve-se inalterada no restante.

Não foi verificada a presença de agregados linfóides na região do corpo gástrico antes do tratamento, e após administração da terapia evidenciou-se a ocorrência de agregados linfóides em um animal. No antro, ocorreu o inverso, ou seja, em apenas um cão foi constatada a presença de aglomerados linfóides antes do tratamento, situação essa que não persistiu após o tratamento.

Resultados expressivos foram observados após a administração da terapia tripla que influenciou sensivelmente o grau de colonização por bactérias espiraladas. Registra-se que esses microrganismos foram observados em graus variados em todos os fragmentos de mucosa fúndica e antral examinados e, após o tratamento com a terapia tripla observou-se completa ausência dessas bactérias em todas as amostras de mucosas fúndica e antral submetidas ao exame histológico em preparações coradas pela Carbol-fucsina.

Por conseguinte, as análises estatísticas expressaram, nos animais tratados com a terapia tripla, redução significativa da densidade de *Helicobacter spp.*, tanto na região fúndica quanto na região antral.

Os resultados envolvendo todos os parâmetros analisados após a terapia tripla encontram-se resumidos na Tabela 5.

Aplicando a Correlação de Pearson nos animais tratados com a terapia tripla, verificou-se que a densidade de bactérias não está significativamente correlacionada com o número de células inflamatórias, e tampouco com o agregado linfóide e com a degeneração glandular.

**Tabela 2** – Escore do grau de inflamação e do grau de colonização de *Helicobacter spp.* no grupo controle, antes e após o tratamento.

Controle	Grau de inflamação												Grau de colonização			
	Região do Corpo						Região do Antro						Corpo		Antro	
	Antes			Depois			Antes			Depois			Antes	Depois	Antes	Depois
Animal	EI	AL	DG	EI	AL	DG	EI	AL	DG	EI	AL	DG	HE	HE	HE	HE
CA	0	0	1	1	0	0	1	0	1	2	0	0	3	2	3	3
CB	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	3	3	3	3
CC	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	2	2	3	3
CD	2	2	1	2	2	1	2	0	1	2	0	1	3	3	2	3
CE	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2	3	3
CF	2	0	1	2	3	1	2	0	1	1	0	1	2	2	2	2
CG	1	0	0	0	1	1	1	3	0	0	0	0	2	3	3	3

**Legenda:** EI - Escore de Infiltrado Inflamatório; AL – Aglomerado Linfóide; DG – Degeneração Glandular; EH – Escore da Colonização por *Helicobacter*

**Tabela 3** – Escore do grau de inflamação e do grau de colonização de *Helicobacter spp.* no grupo tratado com óleo de alho, antes e após o tratamento.

Alho	Grau de inflamação												Grau de colonização			
	Região do Corpo						Região do Antro						Corpo		Antro	
	Antes			Depois			Antes			Depois			Antes	Depois	Antes	Depois
Animal	EI	AL	DG	EI	AL	DG	EI	AL	DG	EI	AL	DG	HE	HE	HE	HE
AA	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	3	2	3	3
AB	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1
AC	2	1	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3	3	3	2
AD	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3
AE	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	1	2	0
AF	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	2	3	3
AG	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3	2

**Legenda:** EI - Escore de Infiltrado Inflamatório; AL – Aglomerado Linfóide; DG – Degeneração Glandular; EH – Escore da Colonização por *Helicobacter*.

**Tabela 4** – Escore do grau de inflamação e do grau de colonização de *Helicobacter spp.* no grupo tratado com extrato de própolis, antes e após o tratamento.

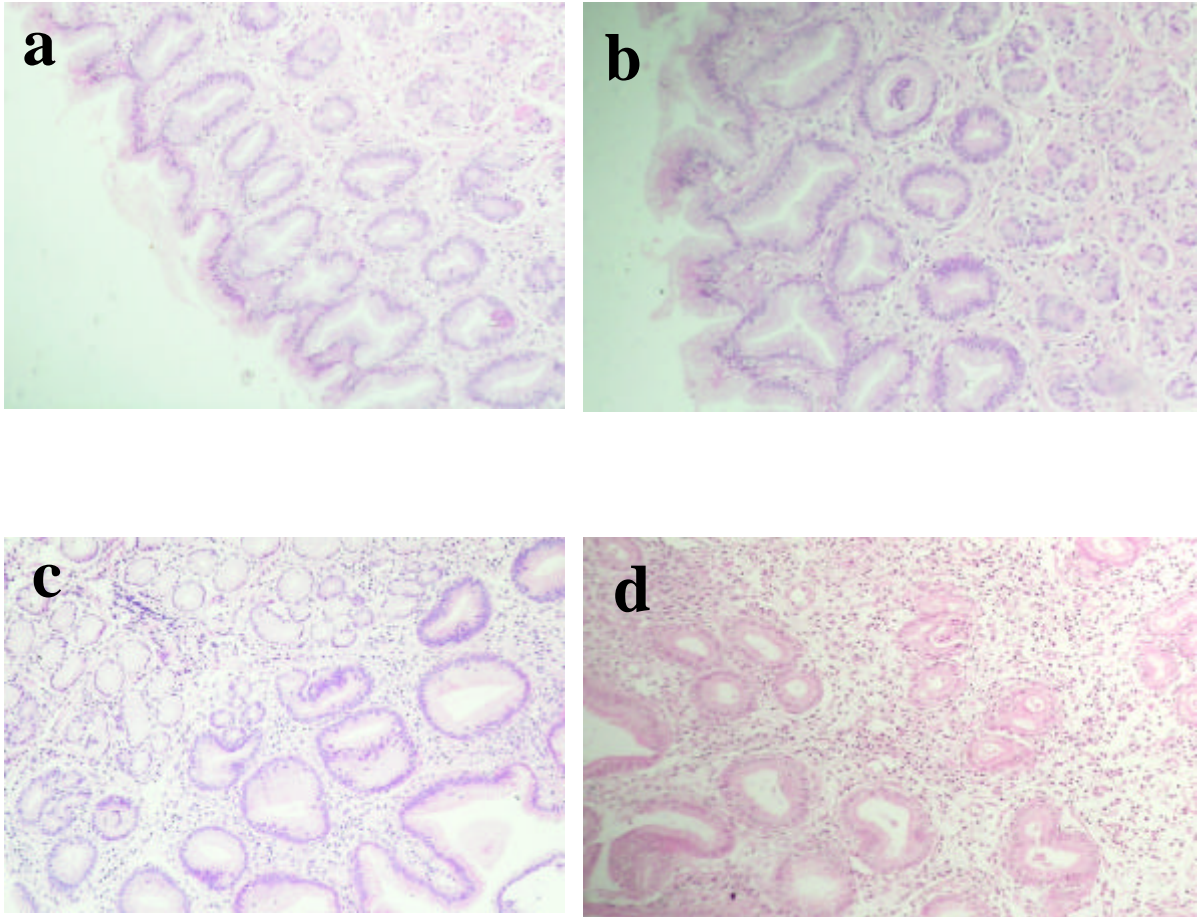
Própolis	Grau de inflamação												Grau de colonização			
	Região do Corpo						Região do Antro						Corpo		Antro	
	Antes			Depois			Antes			Depois			Antes	Depois	Antes	Depois
Animal	EI	AL	DG	EI	AL	DG	EI	AL	DG	EI	AL	DG	HE	HE	HE	HE
PA	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	1	3	1
PB	1	0	0	1	3	0	1	0	0	1	0	0	3	3	3	3
PC	2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2	2	2
PD	2	1	2	1	2	0	2	0	1	1	0	0	2	2	1	2
PE	1	0	1	2	0	1	1	0	0	1	0	0	2	2	2	3
PF	1	1	2	2	0	1	1	0	1	1	0	1	3	3	3	3
PG	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	3	3	3	3

**Legenda:** EI - Escore de Infiltrado Inflamatório; AL – Aglomerado Linfóide; DG – Degeneração Glandular; EH – Escore da Colonização por *Helicobacter*.

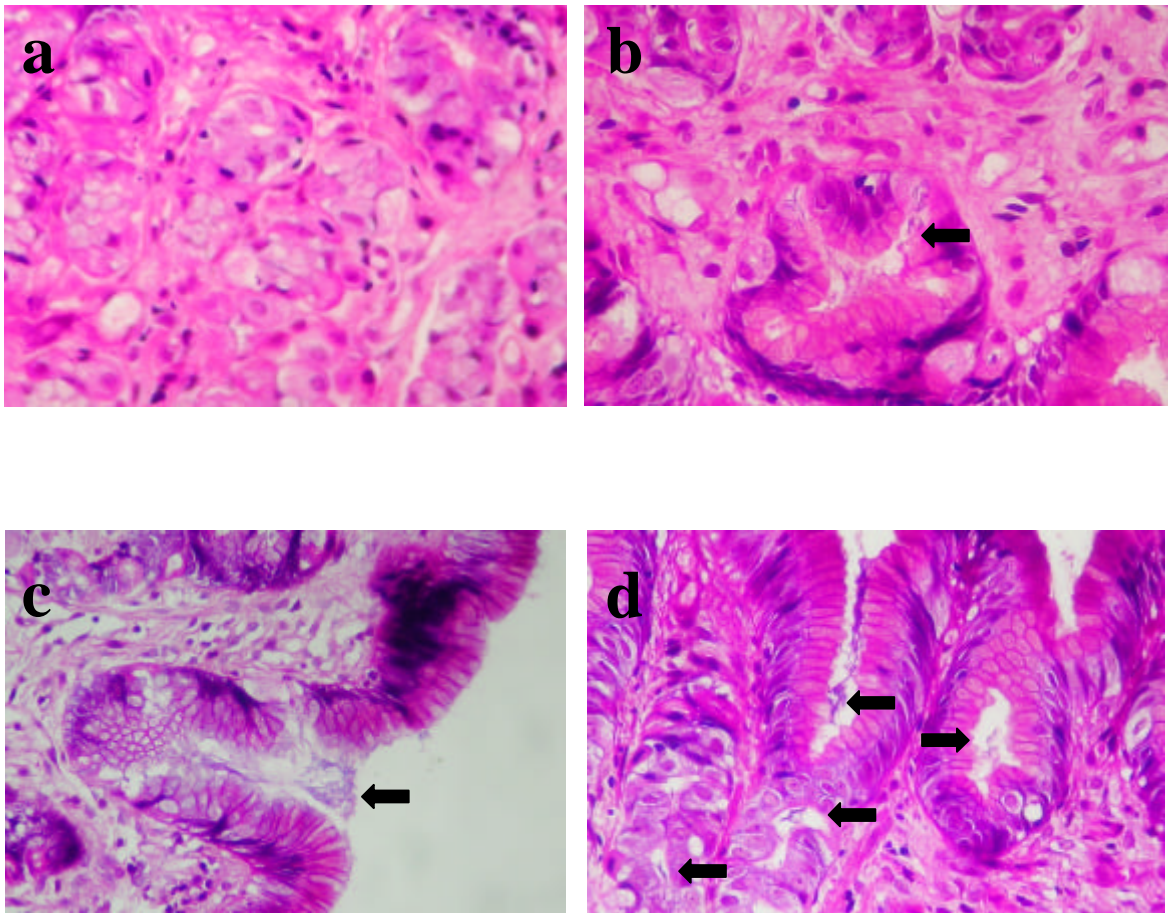
**Tabela 5** – Escore do grau de inflamação e do grau de colonização de *Helicobacter spp.* no grupo tratado com a terapia tripla, antes e após o tratamento.

Terapia Tripla	Grau de inflamação												Grau de colonização			
	Região do Corpo						Região do Antro						Corpo		Antro	
	Antes			Depois			Antes			Depois			Antes	Depois	Antes	Depois
Animal	EI	AL	DG	EI	AL	DG	EI	AL	DG	EI	AL	DG	HE	HE	HE	HE
TA	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	3	0	3	0
TB	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	2	0
TC	1	0	1	1	1	1	2	0	1	1	0	1	3	0	3	0
TD	1	0	1	1	0	1	1	0	1	2	0	1	3	0	2	0
TE	0	0	1	1	0	1	1	0	1	2	0	1	3	0	3	0
TF	1	0	1	1	0	1	2	0	1	1	0	1	2	0	2	0
TG	1	0	2	0	0	1	2	2	2	1	0	1	3	0	3	0

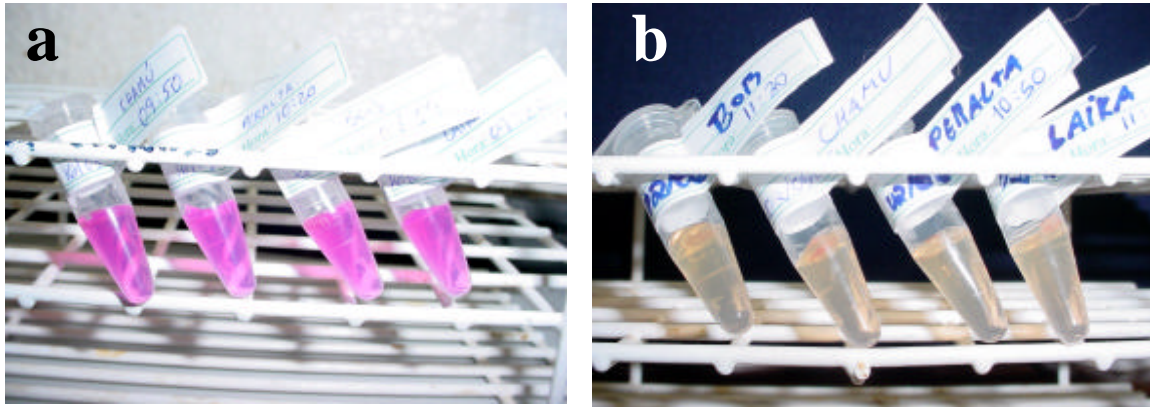
**Legenda:** EI - Escore de Infiltrado Inflamatório; AL – Aglomerado Linfóide; DG – Degeneração Glandular; EH – Escore da Colonização por *Helicobacter*.



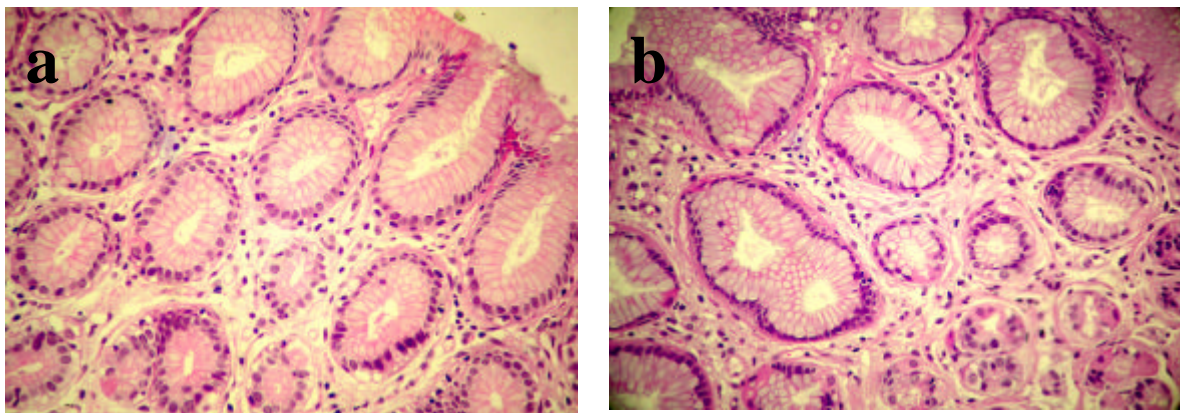
**Figura 1 – Representação para escores do o grau de inflamação, (a) escore 0, (b) escore 1, (c) escore 2 e (d) escore 3 (H&E – 200 X)**



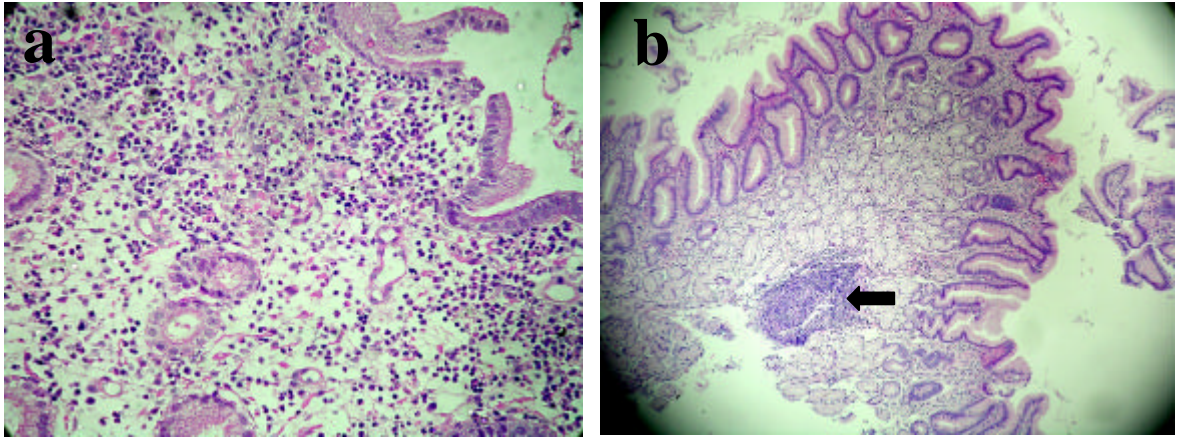
**Figura 2 – Representação para escores do grau de colonização do *Helicobacter spp.*, (a) escore 0, (b) escore 1, (c) escore 2 e (d) escore 3 (Carbol-Fucsina – 400 X) (setas)**



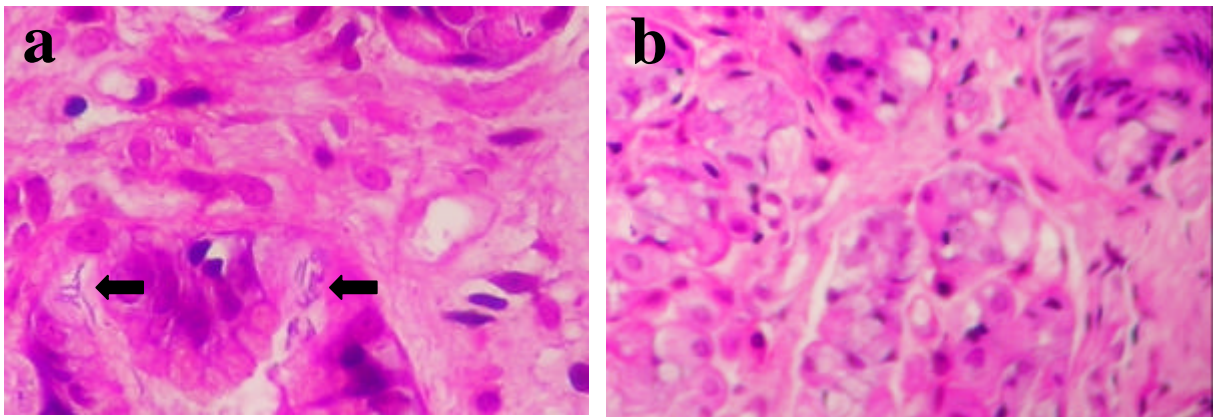
**Figura 3 - Teste da urease em 4 animais: resultado positivo antes do tratamento (a) e negativo após o tratamento com a Terapia Tripla (b)**



**Figura 4 - Corte histológico de mucosa gástrica com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (escore 1) antes (a) e após o tratamento (b) com a Terapia Tripla, no mesmo animal (H&E - 400 X)**



**Figura 5 – Corte histológico de mucosa gástrica com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (escore 2) (a) e presença de aglomerado linfóide (b) no mesmo animal (H&E – 200 X e 100 X) (seta)**



**Figura 6 – Corte histológico de mucosa gástrica antes (escore 3) (a) e após o tratamento com a Terapia Tripla (b) no mesmo animal (Carbol-Fucsina– 1000 X) (setas)**

## 5. DISCUSSÃO

O diagnóstico da infecção por organismos semelhantes ao *Helicobacter* pode ser realizado por métodos invasivos e não invasivos. Os métodos invasivos requerem a realização de endoscopia para a coleta de fragmentos de mucosa gástrica e incluem teste rápido de urease, citologia, histopatologia, cultura e “Polymerase Chain Reaction” (PCR) (JENKINS & BASSET, 1997; STRAUSS – AYALI & SIMPSON, 1999; NEIGER & SIMPSON, 2000; ARAÚJO & FERREIRA, 2002). No presente experimento o método de obtenção de biópsias da mucosa gástrica em cães por endoscopia foi utilizado para se estabelecer o diagnóstico da infecção por *Helicobacter*, bem como para quantificar o grau de colonização das bactérias, devido ao seu baixo custo operacional, facilidade de execução e especificidade da técnica.

Devido à similaridade anatômica entre os estômagos humano e canino, é possível realizar endoscopia digestiva alta e baixa utilizando endoscópio de diâmetro similar àqueles utilizados nos seres humanos. Desta forma, no presente estudo, foi utilizado um gastroscópio humano modelo Olympus CV-1, com 9,5 mm de diâmetro, que pode ser usado tanto em cães de pequeno quanto de grande porte, com peso variando entre 6 a 25 Kg, não acarretando qualquer tipo de dificuldade na realização da técnica.

A análise histopatológica das biópsias gástricas coradas pela Carbol-Fucsina revelou a presença da bactéria em todos os animais (100%) não submetidos ao tratamento, o que de certa forma, condiz com os dados reportados na literatura que relatam a colonização de cães com *Helicobacter spp.* variando de 61 a 100% dos animais, independente do estado clínico dos mesmos (JENKINS & BASSETT, 1997; STRAUSS–AYALI & SIMPSON, 1999; NEIGER & SIMPSON, 2000; ARAÚJO & FERREIRA, 2002; BAILLON & MARSHAL-JONES, 2004). Para NEIGHER et al. (1998), este índice pode chegar a 100% em animais que vivem coletivamente, como em canil. Deve ser reafirmado que, no presente experimento, todos os animais utilizados eram provenientes do canil experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Na maioria dos cães, a avaliação endoscópica do estômago revelava mucosa gástrica aparentemente normal. Apenas 12 animais apresentaram alterações macroscópicas como erosões na mucosa, hemorragias petequiais, ou ambas, entretanto, nenhum desses animais

apresentaram sintomatologia clínica que pudesse estar correlacionada com as alterações macroscópicas observadas.

Além dessas observações, a literatura indica que a existência de bactérias espiraladas na mucosa gástrica de cães pode não estar correlacionada com doenças digestivas do animal, podendo, por outro lado, se constituir em fonte de disseminação dessas bactérias.

As bactérias foram encontradas principalmente no lúmen das glândulas gástricas, nas fossetas gástricas e no muco adjacente ao epitélio. Neste contexto, SIMPSON et al. (1999) observaram maior prevalência de bactérias no lúmen das glândulas gástricas, podendo também ser encontradas nas células parietais e glândulas gástricas. A presença da bactéria variou de acordo com a região do estômago estudada, registrando índices de 64,28% na região do antro e 60,71% na região do corpo, concordando com VIEIRA (2004), e discordando de YAMASAKI et al. (1998) e SIMPSON et al., (1999), que afirmam que a região do cárdia, fundo e corpo são mais comumente colonizadas que a região do antro.

O infiltrado inflamatório era de natureza predominantemente linfoplasmocitária concordando com o que foi estabelecido por WIINBERG et al. (2005), ao estudar a inflamação gástrica em cães.

SIMPSON et al. (1999) observaram graus semelhantes de inflamação tanto em animais infectados quanto naqueles não infectados por *Helicobacter spp.* Salientaram ainda que o antro apresentava maior intensidade de reação inflamatória quando comparado ao cárdia e ao corpo do estômago. A inflamação era caracterizada pela presença mais acentuada de plasmócitos e com escassos linfócitos. Os neutrófilos e os eosinófilos eram eventuais ou não se faziam presentes. Para esses autores não havia uma clara relação entre o grau de inflamação e o grau de colonização pelas bactérias espiraladas. Folículos linfóides foram observados tanto em biópsias de cães aparentemente normais quanto de infectados e tenderam a ser mais numerosos na região do antro, que no corpo e no cárdia. No presente estudo, foi observada maior quantidade de folículos linfóides na região fúndica.

Segundo BELLI et al. (2003), o teste da urease é utilizado para determinar a produção dessa enzima pela bactéria, visto que esta substância pode ser produzida em grande quantidade por esse microorganismo, podendo fornecer resultado positivo em

menos de uma hora. Salientaram ainda, que a sensibilidade do teste é de apenas 70 a 90%. Por outro lado, discordando do autor acima, FLATLAND (2002) reporta a alta sensibilidade e especificidade do teste da urease variando de 88-100%, o que se comprovou no presente estudo, todas as amostras gástricas apresentaram resultado positivo no teste de urease, e ao exame histopatológico, foram visualizadas bactérias com características morfológicas semelhantes ao *Helicobacter*.

Concordando com VIEIRA (2004), neste experimento, a maioria das reações observadas no teste da urease foi fortemente positiva e analogamente ao observado por aquela autora, tiveram origem em fragmentos de tecido provenientes da região do corpo gástrico, onde, no estudo anterior foram reportado maior número de reações fortemente positivas nas regiões do corpo e fundo com 90,20% e 85,40% respectivamente, seguido da região antral 75,06% e cárdica 29,3%. Entretanto, VIEIRA (2004) não constatou forte associação entre o teste de urease e o grau de colonização entre as diferentes regiões gástricas.

HAPPONEN et al. (1996) e FLATLAND (2002), afirmaram que reações falso-negativas podem ocorrer após o tratamento de gastrite devido ao baixo número de bactérias e, por outro lado, o falso-positivo pode resultar do aumento de pH devido à contaminação da amostra com sangue e a outras bactérias produtoras de urease como o *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de bactérias da cavidade oral. Contudo, no presente estudo não ficou demonstrada a presença de reações falso-positivas e ou falso-negativas no teste de urease uma vez, que se pôde relacionar a reatividade desse teste com a visualização da bactéria por meio da histopatologia com a coloração pela Carbol-Fucsina.

Baseado nas características morfológicas da bactéria e devido ao fato do cão ser hospedeiro primário dessa espécie, suspeita-se que no presente estudo houve predominância do *Helicobacter heilmannii*. Morfologicamente, é possível estabelecer diferenças entre as bactérias espiraladas que colonizam o estômago do cão ou do homem, consistindo em diferença básica o fato do *H. heilmannii* ser mais espiralado do que o *H. pylori* (EATON et al., 1996; SIMPSON & BURROWS, 1997; SIMPSON et al., 1999; KATO et al., 2004). Trata-se de microorganismo de cultivo extremamente difícil nos procedimentos convencionais de microbiologia (KATO et al., 2004).

Dos tratamentos realizados aquele que apresentou melhores resultados, foi o da terapia tripla que ao final do procedimento resultou em erradicação do *Helicobacter spp.*

A terapia tripla consiste na combinação de dois antibióticos e um inibidor da bomba de prótons e, graças à sua eficácia, tem o seu uso gradativamente ampliado no tratamento clínico de *Helicobacter pylori*, associado a outras doenças gastrintestinais (IIMURO et al, 2002). No entanto, a erradicação pela terapia tripla nem sempre é eficaz e alguns efeitos colaterais dessas drogas têm sido reportados. Corroborando com esses autores, MARTIN & ERNST (2003) relataram que a erradicação do *Helicobacter pylori* pode ser difícil com o uso da antibioticoterapia convencional requerendo para tal, a combinação de antibióticos, inibidores da bomba de prótons e preparados à base de bismuto. Similarmente, SIMPSON & BURROWS (1997) enfatizaram de forma categórica que nenhum medicamento antimicrobiano por si só tem conseguido taxa adequada de erradicação dessas bactérias espiraladas. Nesse contexto, FLATLAND (2002) afirmaram que a resistência do *H. pylori* aos antibióticos é sério problema na medicina humana e tem sido encontrada com a claritromicina, metronidazol, amoxicilina e tetraciclina. Entretanto, combinações com novas terapias têm sido feitas com sucesso, utilizando-se o metronidazol, apesar da sua aparente resistência “in vitro”. Contudo, no presente estudo, o protocolo da terapia tripla foi realizado com sucesso, utilizando-se os antibióticos amoxicilina e metronidazol, juntamente com o omeprazol.

Apesar da resistência a esses antibióticos ter sido reportada por O’GARA et al. (2000), não foi observada em nos animais deste experimento, que tiveram queda consistente da colonização e da densidade da bactéria, comprovada tanto pelo teste de urease quanto pelo exame histopatológico. Esses resultados discordam, pelo menos em parte, daqueles observados por FLATLAND (2002), que sugeria que o tratamento pode apenas suprimir ligeiramente a infecção, porém não é capaz de erradicar a mesma.

Por meio da Correlação de Pearson, verificou-se a inexistência de correlação entre a redução da densidade bacteriana e os outros parâmetros avaliados. Desta forma, a densidade de bactérias não está diretamente correlacionada com o número de células inflamatórias, com agregados linfóides e com degeneração glandular, uma vez que, mesmo havendo a erradicação do *Helicobacter spp.* não houve redução significativa no valor dessas variáveis. No entanto, esses dados devem ser interpretados com cuidado, uma vez

que as biópsias foram realizadas logo após o término do tratamento, significando que houve pequeno lapso de tempo entre a cessação do estímulo agressor, o que poderia não ser suficiente para provocar redução dos parâmetros acima nominados. Fomentando essa controvérsia, SIMPSON et al. (1999) afirmaram não haver relação entre o grau de inflamação e o grau de colonização por bactérias, enquanto VIEIRA (2004) observou o contrário.

De acordo com o teste de Wilcoxon, foi observado que os animais tratados com o óleo de alho apresentaram redução significativa do infiltrado inflamatório e da degeneração glandular da região fúndica, bem como da densidade de *Helicobacter spp.* nesta mesma região. Segundo IIMURO et al. (2002), o extrato de alho na dieta apresenta pouca ou nenhuma capacidade de erradicar o *H. pylori* ou reduzir as lesões gástricas em gerbils depois que a lesão está estabelecida. Entretanto, ele pode prevenir a indução de gastrite pelo *H. pylori*.

Efeitos sinérgicos do extrato de alho com omeprazol “in vitro”, sugerem que o seu uso, com o inibidor da bomba de prótons, pode ser indicado com sucesso (CELLINI et al., 1996; O’GARA et al., 2000).

Há relatos de irritação gástrica, logo a alicina, que é o princípio ativo do alho, deve ser usada com cautela em certos pacientes, sobretudo naqueles portadores de lesão na mucosa gástrica ou inflamação ( O’GARA et al., 2000). Nos animais tratados com cápsulas de alho não foi observada piora no grau de inflamação ou lesão na mucosa gástrica e sim melhora.

Apesar de GRAHAM et al. (1999), terem observado efeitos colaterais como diarreia, flatulência, hálito e odor de alho pelo corpo nos pacientes tratados, na presente pesquisa não foi possível verificar qualquer tipo de efeito colateral nos animais submetidos a esse tratamento.

A terapia com alho não apresentou resultado estatisticamente significativo na redução da densidade de bactérias espiraladas no estômago de cães, discordando assim do que foi constatado por CELLINI et al., (1996), OHTA et al., (1999), O’GARA et al., (2000), SIVAM (2001) e CANIZARES et al., (2002), por meio de estudos experimentais realizados “in vitro”.

Segundo O’GARA et al. (2000), na prática, o maior problema com a ingestão de preparados à base de alho, em tablete ou em cápsula, reside na inativação ou destruição da alicinase pelo pH gástrico, prevenindo a formação da alicina e diminuindo assim tanto a atividade sistêmica como intragástrica do componente ativo. Corroborando com essa assertiva, MCNULTY et al. (2001) asseguraram que a formação da alicinase tem lugar quando se corta o dente de alho, ou se adiciona água ao pó de alho, sendo sua atividade inativada pelo suco gástrico.

Neste mesmo contexto, estudos realizados por CANIZARES et al. (2002), nos quais foram comparados os poderes inibitórios do extrato de alho e de alguns antibióticos usados no tratamento de infecções por *Helicobacter pylori*, sugerem que o extrato de alho possui graus de inibição “in vitro” similar ao desses antibióticos.

Já a terapia com própolis, não apresentou resultado significativo na redução dos parâmetros morfológicos analisados, incluindo a densidade de bactérias espiraladas no estômago de cães, não confirmando desta forma, daqueles resultados observados “in vitro” por BOYANOVA et al. (2003).

## 6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos possibilitou as seguintes conclusões:

- Nos animais tratados com a terapia tripla foram constatadas reduções significativas nas densidades de *Helicobacter spp.*, tanto na região do corpo, quanto na região do antro gástrico, essa redução foi confirmada devido à ausência da bactéria ao exame histopatológico e ao resultado negativo ao teste de urease;
- Os animais tratados com o óleo de alho apresentaram redução significativa do infiltrado inflamatório e da degeneração glandular da região fúndica, bem como da densidade de *Helicobacter spp.* nesta mesma região;
- O tratamento com óleo de alho na dose utilizada foi eficaz para reduzir a degeneração glandular tanto da região fúndica quanto da região pilórica em cães;
- O tratamento com óleo de alho na dose utilizada foi eficaz em reduzir a densidade de *Helicobacter spp.* em alguns cães, entretanto não erradicou totalmente a bactéria, que pôde ainda ser observada ao exame histopatológico, e cujo teste de urease foi positivo;
- O tratamento com extrato de própolis na dose utilizada não foi eficaz para reduzir o *Helicobacter spp.* em cães;
- A presença da bactéria estava associada à gastrite de grau leve a moderada. Imediatamente após o tratamento com a terapia tripla, que culminou com ausência total desses organismos espiralados, verificou-se a persistência do infiltrado inflamatório.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, I.C; FERREIRA, A.M. Infecção por *Helicobacter* spp. em gatos – revisão. **Clínica Veterinária**, v.7, n.37, p.41-50, 2002.

BAILLON, M.L; MARSHALL-JONES, Z. Bactérias enteropatogênicas em cães e gatos. **Waltham Focus**, edição especial , p.12-18, 2004.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n.1, p. 561-571, 2001.

BELLI,C.B, FERNANDES, W.R.,SILVA, L.C.L.C.Teste de uréase positivo em equino com úlcera gástrica - *Helicobacter* sp.?.**Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.17-20, jan./mar.,2003.

BOYANOVA, L.; DEREJIAN, S.; KAUMANOVA, R.; KATSAROV, N.; GERGOVA, G.; MITOV, I.; NIKOLOV, R.; KRASTEVA, Z. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. **Journal of Medical Microbiology**, v.52 ,n. 5, p. 417-419, 2003.

BULKUOL, D.P., CASTILLO, R.D., BARBOSA, A.D.M. Doença péptica gastroduodenal por *Helicobacter pylori* em crianças. **Revista da Sociedade de Pediatria do Rio de Janeiro**,v.3, n.1, 2002.

CANIZARES, P.; GRACIA, I.; GÓMEZ, L. A.; GARCIA, A.; MARTIN DE ARGILA, C.; BOIXEDA, D.; DE RAFAEL, L. Thermal degradation of allicin in garlic extracts and its implication on the inhibition of the in-vitro growth of *Helicobacter pylori*. **Biotechnol Prog**, v. 20, n.1, p.32-37, 2004a.

CANIZARES, P.; GRACIA, I.; GÓMEZ, L. A.; MARTIN DE ARGILA, C.; BOIXEDA, D.; GARCIA, A., DE RAFAEL, L. Allyl-thiosulfinates, the bacteriostatic compounds of garlic against *Helicobacter pylori*. **Biotechnol Prog**, v. 20, n.1, p.397-401, 2004b.

CANIZARES, P.; GRACIA, I.; GÓMEZ, L. A.; MARTIN DE ARGILA, C.; DE RAFAEL, L.; GARCIA, A. Optimization of *Allium sativum* solvent extraction for the inhibition of in vitro growth of *Helicobacter pylori*. **Biotechnol Prog**, v.18, n.6, p.1227-1232, 2002.

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. Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter spp.* in naturally infected dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 70, n.1, p. 239-250, 1999.

CELLINI, L.; DI CAMPLI, E.; MASSULI, M.; DI BARTOLOMEO, S.; ALLOCATI, N. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). **Immunology Medical and Microbiology**, v.13, n.4, p. 273-277, 1996.

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

DORE, M. P.; BILOTTA, M.; VAIRA, D.; MANCA, A.; MASSARELLI, G.; LEANDRO, G.; ATZEI, A.; PISANU, G.; GRAHAM, D.Y.; REALDI, G. High prevalence of helicobacter pylori infection in Shepherds. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 44, n. 6, p. 1161-1164, 1999.

EATON, K.A.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B.E.; PAOLA, J.; SHERDING, R. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pets dogs: animal and public health implications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 3165-3170, 1996.

FLATLAND, B. *Helicobacter* infection in humans and animals. **Compendium**, v. 24, n. 9, p.688-697, 2002.

GEMI (Groupe d'Etude en Médecine Interne) Consensus sur *Helicobacter*. *Prat. Méd. Chir Anim. Comp.*, Paris, v. 36, n. 4, p. 361-364, 2001.

GEYER, C.; COLBATZKY, F.; LECHNER, J.; HERMANNNS,W. Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. **Veterinary Record**, v. 133, n. 1, p.18-19, 1993.

GOODMAM, K.J.; CORREA, P. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. **International Journal of Epidemiology**, v.24, n.5, p. 875 – 87, 1995.

GRAHAM, D.Y.; ANDERSON, S.Y.; LANG, T. Garlic or jalapeno peppers for treatment of *Helicobacter pylori* infection. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 94, n. 5,p. 1200-1202, 1999.

HANDT, L.K.; FOX, J.G; STALIS, I.H; RUFO, R.;LEE, G.; LINN, J.; LI, X.; KLEANTHOUS, H. Characterization of feline *Helicobacter pylori* strains and associated gastritis in a colony of domestic cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n. 9, p.2280-2289, 1995.

HAPPONEN, I.; LINDEN, J.; SAARI, S.; KARJALAINEN, M.; HANNINEN, M.L.; JALAVA, K.; WESTERMARCK, E. Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastrites. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 12, p. 1767-1774, 1998.

HAPPONEN, I.; LINDEN, J.; WESTERMARCK, Effect of the triple therapy on eradication of canine gastric helicobacters and gastric disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, n.1, p. 1-6, 2000.

HAPPONEN, I.; SAARI, S.; CASTREN, L.; TYNI, O.; HANNINEN, M.L.; WESTERMARCK, E. Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, v.115, n.2, p. 117-127,1996.

HEINERMAN, J. The healing benefits of garlic. **Nutrition**, S.l., v. 13, n. 2, p. 173-174, 1997.

HERMANN, W.; KRENGEL, K.; BREUER, W.; LECHNER, J. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**,v. 112, n. 3, p. 307-318,1995.

HWANG, C.Y.; HAN, H.R.; YOUN, H.Y. Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 3, n. 2, p. 123-133, 2002.

IIMURO, M.; SHIBATA, H.; KAWAMORI, T.; MATSUMOTO, T.; ARAKAWA, T.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Suppressive effects of garlic extract on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. **Cancer Letters**, v. 187,n. 1-2, p. 61-68, 2002.

JALAVA, K.; ON, S.L.; VANDAMME, P.A.; HAPPONEN, I.; SUKURA, A.; HANNINEN, M.L. Isolation and identification of *Helicobacter spp.* from canine and feline gastric mucosa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.10, p. 3998-4006, 1998.

JAVALA, K.; STEPHEN, L.W.; CLARE, O.; HARRINGTON, S.; ANDERSEN, L.P.; HANNINEN, M.L.; VANDAMME, P. A culture strain of "*Helicobacter heilmanni*", a human gastric pathogen, identified as *H. bizzozeronii*: evidence of zoonotic potential of *Helicobacter*. **Emerging Infections Disease**, v. 7, n. 6, p. 1036-1038, 2001.

JENKINS, C.C.; BASSET, J.R. *Helicobacter* Infection. **Compendium on Continuing Education for the Practitioners Veterinary**, Treton, v.19, n.3, p.267-279, 1997.

KATO, S.; OZAWA, K.; SEKINE, H.; OHYAUCHI, M.; SHIMOSEGAWA, T.; MINOURA, T.; INUMA, K. *Helicobacter heilmannii* infection in a child after succesful eradication of *Helicobacter pylori*: case report and review of literature. **Journal of Gastroenterology**, v. 40, p. 94-97, 2004.

LECOINDRE, P.; CHEVALIER, M.; PEYROL, S.; BOUDE, M.; LABIGNE, A.; LAMOULIATTE, H.; PILET, C. Helicobactérioses de l' homme et des carnivores domestiques: quelques données comparatives. **Bulletin de L' académie Nationale de Médecine**, v. 181, n. 3, p. 407-454, 1997.

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, n. 6, p. 487-494, 1992.

MARTIN, K.W.; ERNST, E. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 241-246, 2003.

MCISSAC, W. J.; LEUNG, G. M. Peptic ulcer disease and exposure to domestic pets. **American Journal of Public Health**, v. 89, n. 1, p. 81-84, 1999.

MCNULTY, C.A.; WILSON, M.P.; HAVINGA, W.; JOHNSTON, B.; O'GARA, E.A.; MASLIN, D.J. A pilot study to determine the effectiveness of garlic oil capsules in the treatment of dyspeptic patients with *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 6, n. 3, p. 249-253, 2001.

MÉGRAUD, F.; DOERMANN, H. P. Clinical relevance of resistant strains of *Helicobacter pylori*: a review of current data. **Gut: An International of Gastroenterology and Hepatology**, v. 43, n.1, p. 61-65, 1998.

MEINING, A.; KROHER, G.; STOLTE, M. Animal reservoir in the transmission of *Helicobacter heilmannii*. Results of a questionnaire based study. **Scandinavian Journal Gastroenterology**, v. 33, p. 795-798, 1998.

NEIGER, R.; SIMPSON, K.W. *Helicobacter* Infection in dogs and cats: Facts and fictions. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lakewood, v.14, n.2, p.125-133,2000.

NEIGER, R.; DIETERICH, C.; BURNENS, A.; WALDVOGEL, A.; CORTHÉSY-THELAZ, 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.

O'GARA, E. A.; HILL, D. J.; MASLIN, D. J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2269-2273, 2000.

OHTA, R.; YAMADA, N.; KANEKO, H.; ISHIKAWA, K.; FUKUDA, H.; FUJINO, T.; SUZUKI, A. In vitro inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n.7, p. 1811-1812, 1999.

OLIVEIRA, C.P.M.S. *Helicobacter pylori*, Fatores de virulência e inflamação. **Revista de Gastroenterologia da Fundação Médico-cultural de Gastroeterologia e Nutrição de São Paulo**, v.2,n.8, set /out, p.2, 2000.

PERKINS, S.E.; FOX, J.G.; WALSH, J.H. *Helicobacter mustelae* associated hypergastrinemia in ferrets (*Mustela putorius furo*). **American Journal Veterinary Research**, v. 57, n. 2, p. 147-150, 1996.

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

SATO, T.; MIYATA, G. The nutraceutical benefit, part IV: Garlic. **Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 787-788, 2000.

SIMPSON, K.W.; MCDONOUGH, P.L.; STRAUSS-AYALI, D.; CHANG, Y.F.; HARPENDING, P.; VALENTINE, B.A. *Helicobacter felis* infection in dogs: effect on gastric structure and function. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 237-248, 1999.

SIMPSON, K.W.; NEIGER, R.; DENOVO, R.; SHERDING, R. The relationship of *Helicobacter* spp infection to gastric disease in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, p.223 – 227, 2000.

SIMPSON, K.W.; BURROWS, C.F. Gastritis, Ulcers and *Helicobacter spp.* in Humans, Dogs and Cats. **Waltham Focus**, n. 7, p. 2-6 , 1997.

SIVAM, G.P. Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. **Journal of Nutrition**, Review, v, 131, n. 3s, p. 1106S-1108S, 2001.

SIVAM, G.P.; LAMPE, J.W.; ULNESS, B.; SWANZY, S.R.; POTTER, J.D. *Helicobacter pylori*- *In vitro* susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract. **Nutrition and Cancer**, v. 27, n. 2, p. 118-121, 1997.

SOLNICK, J.V. Clinical significance of *Helicobacter* species other than *Helicobacter pylori*. *Clinical Practice*, v. 36, p. 349-354, 2003.

STRAUSS – AYALI, D.; SIMPSON, K. W. Gastric *Helicobacter* infection in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 397 – 414, 1999.

VANDENPLAS, Y.; BADRIUL, H. *Helicobacter pylori* infection. **Acta Paediatrica Taiwanica**, v. 40, p. 212-224, 1999.

VIEIRA, F. T. Frequência e distribuição de *Helicobacter* ssp. na mucosa gástrica de cães. **Universidade Federal de Viçosa**. Viçosa, Tese de Mestrado, 2004.

WIINBERG, B.; SPOHR, A.; DIETZ, H.H.; EGELUND, T.; GREITER-WILKE, A.; MCDONOUGH, S.P.; OLSEN, J.; PRIESTNALL, S.; CHANG, Y.F.; SIMPSON, K.W. Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to *Helicobacter* spp. infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 4-14, 2005.

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

YOU, W.C.; ZHANG, L.; GAIL, M.H.; MA, J.L.; CHANG, Y.S.; BLOT, W.J.; LI, J.Y.; ZHAO, C.L.; LIU, W.D.; LI, H. Q.; HU, Y.R.; BRAVO, J.C.; CORREA, P., XU, G.W.; FRAUMENI, J. F. JR. *Helicobacter pylori* infection, garlic intake and precancerous lesions in a Chinese population at low risk of gastric cancer. **International Journal of Epidemiology**, n. 27, v.6, p. 941-944, 1998.