

Marcadores serológicos y de diagnóstico por imagen en el estudio de la hipertensión pulmonar en perros con *Dirofilariosis* (*Dirofilaria Immitis*)

Yaiza Falcón Cordón



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

ESCUELA DE DOCTORADO

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOMEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**MARCADORES SEROLÓGICOS Y DE
DIAGNÓSTICO POR IMAGEN EN EL ESTUDIO
DE LA HIPERTENSIÓN PULMONAR EN PERROS
CON DIROFILARIOSIS (*Dirofilaria immitis*)**

Doctoranda

Yaiza Falcón Cordón

Directora

Elena Carretón Gómez

Co-director

José Alberto Montoya Alonso

Las Palmas de Gran Canaria 2022

D/D^a JOSE ALBERTO MONTOYA ALONSO COORDINADOR/A DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

INFORMA,

De que la Comisión Académica del Programa de Doctorado, en su sesión de fecha tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada " Marcadores serológicos y de diagnóstico por imagen en el estudio de la hipertensión pulmonar en perros con dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*)" presentada por la doctoranda D^a Yaiza Falcón Cordón y dirigida por la Doctora Elena Carretón Gómez y co-dirigida por el Doctor José Alberto Montoya Alonso.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 11 del Reglamento de Estudios de Doctorado (BOULPGC 04/03/2019) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a.....de.....de dos mil veintidós.

AGRADECIMIENTOS

La suerte favorece sólo a la mente preparada.

Isaac Asimov

La suerte ayuda a los osados.

Virgilio

Siempre he sabido y reconocido que tengo mucha suerte, suerte de haber tenido el apoyo de mi familia durante este largo camino, la primera persona a la que debo agradecer este trabajo es al pilar más importante en mi vida que es, como no, mi hermana gemela, Soraya. Ella ha estado a mi lado en todo momento, en los buenos, buenísimos, malos y malísimos momentos durante estos ya casi seis años de trabajo. Como todos saben somos inseparables y es, sin lugar a dudas, mi alegría de vivir. No tengo palabras ni actos suficientes para demostrarle lo importante que es en mi vida y lo ha sido en esta parte del camino.

Además, mis padres, los que siempre han estado detrás apoyándome con todo, con los días largos en el laboratorio, con el estrés y las alegrías, siempre inculcándonos lo importante que es trabajar y ser mejor cada día dándome el mejor ejemplo de todos a seguir. Gracias de verdad.

A mi hermano Toni para el que nunca tengo palabras que expresen lo importante y lo que me sirve de inspiración cada día para levantarme y seguir adelante y ser mejor persona. Ni siquiera he tenido que pedirle ayuda nunca porque sin tener que decir una palabra él ya se ha ofrecido con lo que sea para ayudarme sin pensar en lo que supone. Siempre intentando protegernos y cuidarnos, ante todo. Nunca ha dudado de que podría con esto como si tuviese un oráculo divino que todo lo sabe. Te quiero Toni.

A mi hermano Samuel que aún en la distancia siempre ha estado pendiente de mí y de ayudarme en el camino dentro de lo que cabe y siempre ha sido y será un referente para mí de trabajo constante. Gracias Samuel.

Por otro lado, mi familia científica que es mi familia elegida no es para menos. Mi suerte ha continuado cuando me surgió la oportunidad de trabajar con Alberto Montoya, Cande Juste y Elena Carretón. Todo gracias al gran Antonio Mejías que me llamó directamente cuando supo que Alberto Montoya estaba buscando a recién licenciados para comenzar con una beca de investigación. Nunca tendré palabras para agradecerle a Antonio esa llamada.

El Jefe para mí ha sido como un padre, siempre preocupado e intentando darme buenos consejos, animándome y echándome la bronca de vez en cuando. Tiene una energía y una pasión tremenda por su profesión y así me lo ha transmitido. Muchas gracias Jefe, por todo, por ayudarme siempre y por ser tan buena persona.

Para Cande me voy a quedar corta siempre en palabras, el tiempo que compartimos fue inspirador, me traía paz y mucha sabiduría. No tengo manera de expresar lo afortunada que soy por haber compartido tantos buenos ratos trabajando juntas y aprendiendo de ella. Otro gran ejemplo a seguir que siempre admiraré mucho.

Para agradecer a Elena toda su ayuda no voy a tener tiempo ni nada va a ser suficiente, ella ha sido un gran ejemplo de tenacidad, de trabajo, de ayudar a los demás, de ser buena persona y luchadora. Sin duda soy super afortunada de haber compartido este camino con ella, no se me ocurre mejor persona y, sinceramente, dudo que la haya. Gracias Elena de todo corazón. Eskerrik asko Jefa.

No puedo dejar de agradecer a Alicia Caro toda su paciencia y dedicación conmigo, los días que compartimos juntas fueron muy especiales y me inspiraron para ser mejor persona y veterinaria cada día. Ha sido todo un honor para mí haber aprendido de ella, otro gran referente tanto a nivel profesional como personal. Muchas gracias Alicia de corazón.

Para Laín no tengo palabras tampoco, pocas personas conozco tan pacientes, dedicadas y amables como él. También aprendí muchísimo de él además de recordarme que en esta vida no se llega a ningún lado sin ser buena persona. Gracias Laín, muchas gracias.

A mis compañeros de doctorado que han sido una familia para mí, Bernardo fue el primero y me ayudó mucho en todo lo que pudo y siempre le estaré agradecida. A Noelia, mi Noe, que comenzó conmigo y Cande en el laboratorio de Patología y hemos continuado este camino juntas, has sido para mí un grandísimo apoyo y un gran descubrimiento además de una gran amiga, te adoro y te admiro. A Jorge, mi George, que cuando empezó conmigo en el hospital los dos andábamos a dos manos y siempre estuvo a mi lado, apoyándome, dándome consejos y aguantándome, todo sea dicho. Tengo que agradecerte toda tu paciencia y todos los buenos momentos que hemos compartido, otro gran amigo que he ganado en este camino. A Sara, que con su sonrisa y amabilidad me derrite y con la que no he podido compartir tanto como me hubiera gustado pero los pocos ratos juntas han sido inmejorables. También tengo que agradecerte toda tu ayuda y apoyo. Honrada me siento por haber podido enseñarles lo que sé y lo que me han hecho aprender de ustedes, que, aunque no lo crean, ha sido mucho. Ellos han sido un gran apoyo para mí y han estado en muchos de los momentos más complicados. Seguramente sin ellos esto no habría sido posible.

No puedo terminar sin agradecer a Loli y a Nuha y a todo el equipo de la cafetería que han sido maravillosos siempre, atentos, dándome apoyo y alegrías, al igual que Rito, al que también quiero agradecer toda su ayuda.

A Marta que siempre me alegraba las mañanas en el hospital con su alegría y su sonrisa a pesar de que fuera un mal día. A Aury y Marisol, la alegría de vivir que me daban cada vez que compartíamos un rato juntas.

Y, por último, pero no menos importante, a Jamie que en este último año me ha hecho terminar de entender y apreciar lo afortunada que soy al contar con esta familia tan grande que me acompaña siempre y a ayudarme a terminar lo comenzado. Gracias Jamie.

Esta tesis es indiscutiblemente de todos ellos también.

ÍNDICE

Introducción	1
Objetivos	3
Revisión Bibliográfica	4
Dirofilariosis cardiopulmonar canina	4
Taxonomía	4
Ciclo Biológico	5
Vectores	6
Microfilaremia	7
Wolbachia	7
Epidemiología	9
Fisiopatología	11
Endarteritis pulmonar proliferativa	11
Hipertensión pulmonar	13
Insuficiencia cardiaca congestiva derecha	14
Lesiones pulmonares	15
Tromboembolismo pulmonar	18
Síndrome de Vena Cava	18
Alteraciones renales	19
Signos clínicos	20
Diagnóstico de la dirofilariosis canina	22
Test de antígenos	22

Detección de microfilarias	23
Radiografía torácica	24
Electrocardiografía	26
Ecocardiografía	27
Pruebas de laboratorio	29
Tomografía axial computerizada	31
Profilaxis	31
Resistencias y falta de eficacia	32
Tratamiento de la dirofilariosis cardiopulmonar canina	33
Eliminación de las larvas migratorias y de las microfilarias	33
Tratamiento frente a <i>Wolbachia pipientis</i>	34
Tratamiento adulticida	34
Restricción del ejercicio	35
Tromboembolismo pulmonar	35
Tratamiento quirúrgico	36
Confirmación de éxito del tratamiento	36
Hipertensión pulmonar	38
Estructura ventricular derecha	40
Estructura de la vasculatura pulmonar	41
Fisiopatología de la hipertensión pulmonar	41
Hipoxia alveolar	42
Control adrenérgico	42

Óxido nítrico_____	42
Eicosanoides: prostaglandinas y tromboxano_____	43
Endotelina 1 (ET-1)_____	43
Angiotensina II_____	45
Clasificación clínica de la hipertensión pulmonar _____	46
Clasificación funcional_____	48
Signos clínicos_____	49
Biomarcadores serológicos_____	50
Electrocardiografía_____	51
Radiografía torácica_____	52
Ecocardiografía_____	52
Tomografía axial computerizada_____	55
Tratamiento_____	56
Análogos de la prostaciclina_____	56
Antagonistas de la endotelina_____	57
Inhibidores de la fosfodiesterasa-5_____	57
Otros inhibidores de la fosfodiesterasa_____	58
Pronóstico_____	58
Artículos_____	60
Conclusiones_____	83
Resumen_____	85
Summary_____	88

Bibliografía _____ 91

Anexo. Otros trabajos publicados relacionados con la Dirofilariosis _____ 116



INTRODUCCIÓN

La dirofilariosis cardiopulmonar o “Enfermedad del gusano del corazón”, es una enfermedad causada por el nematodo *Dirofilaria immitis*, alojándose las formas adultas en las arterias pulmonares y cámaras cardíacas derechas. Afecta principalmente a carnívoros domésticos y salvajes. Inicialmente, la infección puede ser subclínica, dando lugar a la aparición de signos clínicos a medida que se cronifica la enfermedad. Los signos clínicos que se suelen observar con mayor frecuencia son de carácter cardiorrespiratorio.

Es una enfermedad de distribución mundial, siendo su incidencia mayor en zonas tropicales y subtropicales, donde la presencia del vector (mosquito) es mayor. La expansión del hospedador intermediario ha provocado la detección de la enfermedad en zonas anteriormente libres. Esto, en combinación con el cambio climático, movimiento y transporte de animales, así como la urbanización y formación de nuevas áreas de cultivo, favorece la expansión y perpetuación del parásito.

D. immitis puede llegar a afectar a humanos de manera accidental, produciendo nódulos pulmonares, describiéndose su mayor incidencia en zonas endémicas de la enfermedad.

El tratamiento de la dirofilariosis cardiopulmonar es complejo, está enfocado en eliminar las distintas fases parasitarias y su bacteria endosimbionte *Wolbachia pipientis*. Cabe añadir que, en animales con afecciones secundarias producidas por la infección, el riesgo de complicaciones o muerte es más alto. El actual protocolo de tratamiento tiene un mayor porcentaje de éxito y pronóstico comparado con los anteriormente utilizados. Una vez finalizado, es importante valorar la existencia de daños secundarios a la infección ya que, en algunos casos, pueden persistir síntomas que requieran tratamiento complementario.

Una de las principales complicaciones en animales infectados por *D. immitis* es el desarrollo de hipertensión pulmonar, que es de carácter grave y puede producir la muerte del paciente. Es una consecuencia crónica de la endarteritis que esta patología provoca y supone un reto diagnóstico para el veterinario en la clínica diaria, por lo que es necesario el desarrollo de técnicas diagnósticas que faciliten su detección. Para ello, las técnicas empleadas son, principalmente, el uso de métodos de diagnóstico por imagen, siendo herramientas de gran utilidad para establecer un tratamiento, pronóstico y seguimiento

del paciente. Actualmente, además, se están desarrollando estudios de detección de hipertensión pulmonar enfocados en la medición de diferentes marcadores serológicos. Se trata de técnicas que se encuentran en desarrollo; sin embargo, los resultados que se han obtenido en diferentes estudios hasta la fecha ofrecen resultados prometedores. Por otro lado, actualmente se desconocen las repercusiones que el desarrollo de endarteritis e hipertensión pulmonar puedan tener a largo plazo en los perros infectados. Algunos (pocos) estudios preliminares parecen indicar que la endarteritis permanece en los perros tras el tratamiento, por lo que la hipertensión pulmonar que se produce en algunos perros como consecuencia debería ser estudiada a largo plazo.

Debido a su carácter zoonótico, su continua expansión y gravedad de la infección en pequeños animales, la dirofilariosis cardiopulmonar canina es una enfermedad de gran importancia veterinaria que requiere seguir siendo estudiada. Para ello, es necesario su estudio a nivel vascular, cardíaco y respiratorio. Así, el objetivo de esta tesis es el de estudiar los distintos biomarcadores serológicos de daño vascular y el empleo de técnicas de diagnóstico por imagen para detectar la presencia y gravedad de hipertensión pulmonar antes, durante y tras el tratamiento adulticida, para continuar avanzando en el estudio de este fenómeno tan frecuente y grave en la dirofilariosis cardiopulmonar canina.

OBJETIVOS

1. Determinar la utilidad de la tomografía axial computarizada a través de la medición del ratio TP:Ao (tronco pulmonar: aorta), para detectar la presencia y severidad de hipertensión pulmonar en perros infectados con *Dirofilaria immitis*, además de determinar la correlación entre los ratios TP:AoD (tronco pulmonar: aorta descendente) y TP:AoA (tronco pulmonar: aorta ascendente).
2. Evaluar el índice de distensibilidad de la arteria pulmonar derecha y otros indicadores ecocardiográficos en perros 10 meses después de la última dosis del tratamiento adulticida frente a *Dirofilaria immitis*, para determinar los cambios en la presión pulmonar, y consecuentemente, la progresión de la endarteritis pulmonar en dichos pacientes.
3. Evaluar las concentraciones séricas de proteínas de fase aguda, tanto positivas (proteína C- reactiva, haptoglobina y ferritina) como negativas (albúmina y paraoxonasa-1), así como los biomarcadores adiponectina y endotelina-1, en pacientes infectados por *Dirofilaria immitis*, además de determinar su utilidad diagnóstica como biomarcadores de hipertensión pulmonar, y valorar su progresión a lo largo del tratamiento adulticida hasta seis meses después de finalizar el mismo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

DIROFILARIOSIS CARDIOPULMONAR CANINA

La dirofilariosis cardiopulmonar es una enfermedad causada por el parásito *Dirofilaria immitis*. Es un nematodo perteneciente al género *Dirofilaria* y es reconocido por su importancia clínica y capacidad zoonótica. Sus principales vectores son mosquitos del género *Anopheles*, *Culex* y *Aedes*, siendo sus hospedadores definitivos cánidos domésticos y salvajes y hurones. Por otro lado, se consideran hospedadores accidentales los félicos y el humano. La enfermedad está condicionada, entre otros motivos, por la presencia del mosquito, por tanto, en zonas tropicales donde el vector está activo durante todo el año y las condiciones de temperatura y humedad son más elevadas la prevalencia es mayor.

Por otro lado, debido al aumento de temperaturas a nivel mundial, la adaptación y progreso del vector se ve favorecida en zonas no afectadas con anterioridad, tales como el centro y norte de Europa (Genchi et al., 2009; Simón et al., 2009; Genchi et al., 2011). Todo ello, junto con la existencia de reservorios salvajes, ayudan a favorecer la transmisión del parásito en los animales domésticos (Lee et al., 2010), llegando a suponer un mayor riesgo para el contagio en humanos (Otranto et al., 2013). Los humanos son hospedadores normalmente accidentales en áreas endémicas de enfermedad y su infección suele relacionarse con la formación de nódulos o quistes parasitarios en ramas de la vasculatura pulmonar (Genchi et al., 2009; Fontes-Sousa et al., 2019).

TAXONOMÍA

D. immitis pertenece a la Clase Nematoda, Familia Filariidae, Género *Dirofilaria* y Especie *immitis* de aspecto filiforme y color blanquecino (Marquardt et al., 2000). El Género *Dirofilaria* está conformado por varias especies, aunque destacan *Dirofilaria immitis* y *Dirofilaria repens* por su distribución mundial y capacidad de afectar a humanos y animales.

Los vermes adultos de *D. immitis* suelen ser alargados y carecen de cápsula bucal y faríngea. Por norma, el macho es mucho menor que la hembra, y las espículas son desiguales en forma y tamaño, llegando a medir entre 250 a 310 mm de longitud la hembra y 120 a 200 mm el macho (Manfredi et al., 2007). La vulva se sitúa próxima al extremo anterior donde los huevos larvados eclosionan en el útero, dando lugar a las L1 hacia el torrente sanguíneo.

CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de vida de *D. immitis* se desarrolla gracias a mosquitos del género *Culex*, *Aedes* y *Anopheles* principalmente. Sus hospedadores definitivos son perros domésticos principalmente, aunque existen otros carnívoros que pueden infectarse como zorros, lobos, coyotes, cánidos salvajes, gatos y félidos salvajes, hurones, nutrias, leones marinos, pandas rojos, osos e incluso algunos primates, actuando como reservorios de la enfermedad. En la especie humana, el contagio se considera accidental en aquellas zonas con elevada prevalencia de la enfermedad en animales domésticos, siendo el desarrollo del parásito diferente (Simón et al., 2012).

Estos mosquitos con capacidad hematófaga ingieren sangre de un perro con microfilarias (L1) circulantes en el torrente sanguíneo, las cuales avanzan desde el intestino del mosquito hasta los túbulos de Malpighi entre 24 y 36 horas post-ingestión, dando lugar al desarrollo de larvas L3 (forma infectante) (Manfredi et al., 2007). A continuación, migran hacia la probóscide donde permanecerán hasta ser inoculadas junto con la hemolinfa al nuevo hospedador (Cancrini y Kramer, 2001). El desarrollo larvario en el mosquito depende de las condiciones ambientales, especialmente de la temperatura, siendo las óptimas superiores a 14°C (Genchi et al., 2009). Una vez inoculada la forma infectante (L3) comienza su desarrollo a estado adulto dentro del hospedador definitivo. Esta L3 se aloja en el músculo o tejido subcutáneo donde muda a L4 permaneciendo en el tejido subcutáneo hasta 3 semanas para desplazarse a las fibras musculares, donde podrá alcanzar el centímetro de longitud hasta un periodo de dos meses. A los 50 días se produce la muda a estadio pre-adulto (L5) el cual llegará a las arterias pulmonares entre los días 70 a 85 post-infección, llegando a medir de 2 a 3 cm.

A partir de los seis a ocho meses puede tener una longitud de entre 20 a 30 cm siendo ya capaz de producir microfilarias (Figura 1). Las formas adultas tienen una vida media de

5 a 7 años y las microfilarias hasta 30 meses (Bowman y Atkins, 2009). Está descrita la transmisión transplacentaria de microfilarias de madre a cachorros, aunque al tratarse de formas inmaduras L1 no tienen capacidad infectante. De igual modo ocurre en las microfilarias transmitidas por transfusión sanguínea (Mantovani y Jackson, 1966; Brinkmann et al., 1976; Todd y Howland, 1983; Menda., 1989).

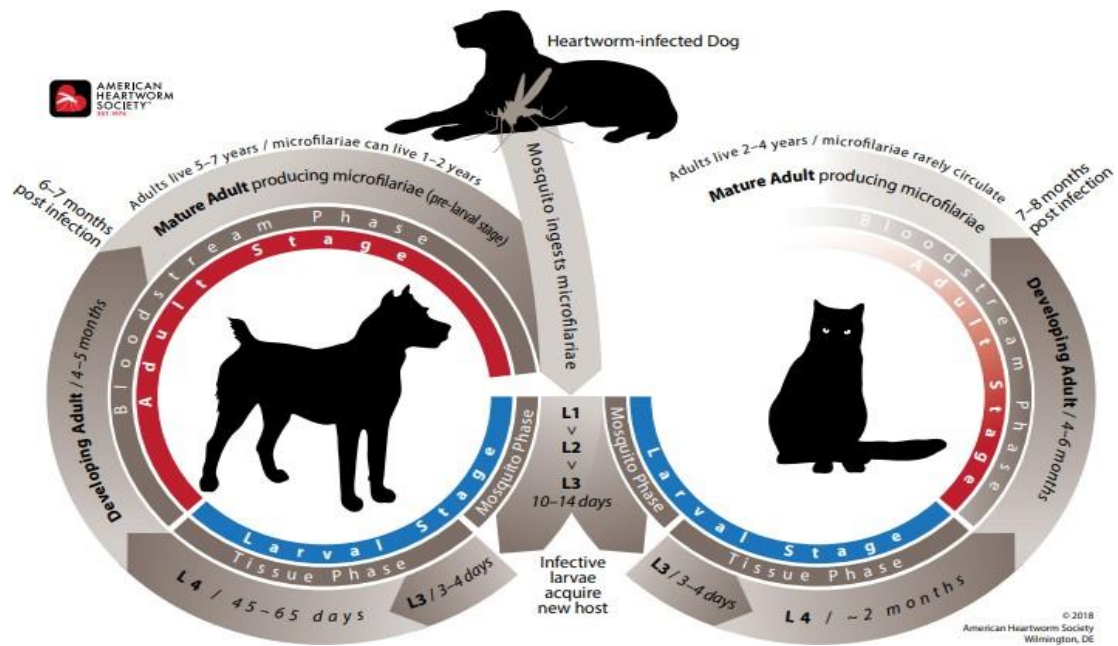


FIGURA 1: Dibujo ilustrativo con la descripción del ciclo biológico de *D. immitis* en perro y gato (American Heartworm Society, 2020).

VECTORES

Los vectores del parásito son mosquitos hembra pertenecientes al orden Díptera, suborden Nematóceras, Familia Culicidae. Dentro de esta familia se encuentran los géneros *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Culiseta* cuyas piezas bucales se caracterizan por formar una larga probóscide preparada para perforar la piel de los mamíferos. Las hembras requieren del aporte de proteínas de la sangre previamente a la puesta de huevos. Morfológicamente, se caracterizan por tener un cuerpo pequeño (no más de 15 mm) y patas alargadas (Guedes, 2012).

La capacidad de adaptación de estos vectores es muy alta, pudiendo realizar la puesta de huevos tanto en agua como en plantas de áreas domésticas y otros útiles humanos como botellas, macetas, floreros, platos (Da Silva et al., 2014). Todo ello, asociado a los cambios climatológicos en zonas templadas, favorece la presencia de estos vectores en zonas antes no descritas, considerándose especies invasoras (Genchi et al., 2005; Montoya-Alonso et al., 2010; Montoya-Alonso et al., 2011; Genchi et al., 2011; Diaz, 2015).

MICROFILARIAS

La microfilaremia aparece a los 6 meses tras la infección. Actualmente no existe relación entre el número de microfilarias circulantes estimado por ml de sangre y el número de parásitos adultos presentes en las arterias pulmonares y/o corazón derecho. Existen descripciones clásicas referentes a la periodicidad de la microfilaremia en perros infectados por *D. immitis*, las cuales referían que la microfilaremia era mayor durante las horas diurnas, siendo descartado actualmente por varios estudios (Rawlings y Calvert, 1997; Dillon, 2000). Se ha descrito que aproximadamente un 60% de los animales infectados por este parásito son amicrofilarémicos; estos casos pueden deberse a que existe una eliminación inmunomediada de las microfilarias circulantes, existen infecciones con parásitos adultos de un sólo sexo o que se ha aplicado un tratamiento preventivo cuya acción es microfilaricida (Labarthe et al., 1997).

WOLBACHIA PIPIENTIS

Wolbachia pipientis es una bacteria gram negativa perteneciente al orden denominado Rickettsiales, la cual es endosimbionte y es indispensable para la supervivencia del parásito. Esta bacteria se encuentra en todos los estadios de desarrollo del ciclo de vida de *D. immitis*. Se aloja principalmente en las células hipodérmicas de las cuerdas laterales; además, en la hembra se encuentra en el tracto reproductivo de las hembras (ovocitos, fases morulares y microfilarias) (Bandi et al., 1999; Kramer et al., 2003; Kozek et al., 2005). Cabe añadir que no se ha detectado la presencia de la misma en el sistema reproductor de los parásitos machos hasta el momento (Kozek et al., 2005)

por lo que se sugiere que la transmisión de la bacteria se produce de manera vertical a través del citoplasma del óvulo.

La reproducción de *W. pipientis* puede tener lugar mediante fusión binaria, la cual es la más común, o mediante un ciclo similar al de las bacterias del filum Chlamydiae, el cual consiste en la formación de pequeñas partículas esféricas conocidas como cocides y su posterior crecimiento y desarrollo a formas bacterianas más grandes (Storz et al., 1971). La relación carga bacteriana-parásito parece tener diferente proporción en los diferentes estadios de desarrollo del nematodo, siendo menor en las microfilarias y en las etapas larvarias L2 y L3. Cabe añadir que la carga bacteriana suele ser un factor ventajoso para el parásito en cuanto a términos de longevidad y fecundidad (Taylor et al., 2005). Además, durante la primera semana tras la infección, el número de *W. pipientis* aumenta considerablemente. La multiplicación rápida continúa durante todo el desarrollo de la L4, por lo que la principal fase de crecimiento de la población bacteriana tiene lugar el primer mes de dicha infección (Kozek et al., 2005; Taylor et al., 2005).

En cuanto a la importancia en la fisiopatología de la enfermedad aportada por *W. pipientis* cabe añadir que, al encontrarse el parásito en el propio sistema circulatorio, cuando se libera la bacteria al torrente sanguíneo puede diseminarse de manera muy rápida por todo el organismo, afectando principalmente a la vasculatura pulmonar, también al sistema reticuloendotelial tanto en bazo como en hígado, además de poder ser filtradas por el riñón. Estas localizaciones suelen ser las más habituales en las que se encuentra la mayoría de las veces antígenos bacterianos y lesiones asociadas (Kozek et al., 2005; Taylor et al., 2005).

Los distintos mecanismos por los que la bacteria puede liberarse al torrente sanguíneo pueden ser durante la muerte de los parásitos adultos o las larvas ya sea por la acción de fármacos o por la propia respuesta inmune del hospedador. También se puede producir la liberación de *W. pipientis* desde el útero de las hembras adultas o a través de fragmentos de huevos que son arrojados (Kozek et al., 2005).

Por último, es de interés añadir la capacidad de dichas bacterias en la inmunotolerancia característica de esta enfermedad a largo plazo, ya que parece tener implicación en la disminución de la respuesta inmune del huésped (Genchi et al., 2012).

EPIDEMIOLOGÍA

"La historia natural de las enfermedades transmitidas por mosquitos es compleja, y la interacción con el clima, la ecología, la biología de los vectores y muchos otros factores desafían todos los análisis simplistas"

(Paul Reiter, 2001)

La emergencia y reemergencia de enfermedades transmitidas por vectores ha aumentado exponencialmente en los últimos 30 años. Esto es debido a la confluencia de factores medioambientales, ecológicos y sociales que facilitan la interacción del parásito, vector y hospedador. La dirofilariosis es considerada una enfermedad de distribución mundial, cosmopolita, cuya localización suele ser zonas con elevadas temperatura y humedad durante, al menos, determinadas épocas del año. El cambio climático es uno de los factores determinantes para la dispersión y adaptación de los vectores transmisores del parásito, por lo que el aumento de temperaturas a nivel mundial facilita la diseminación de la enfermedad en zonas antes no esperadas (Simón et al., 2012). Además, el potencial zoonótico de *D. immitis* y su relevancia en la salud pública remarca la importancia de monitorizar la evolución de esta enfermedad (Simón et al., 2012).

En Europa Occidental, la dirofilariosis canina se ha estabilizado, incluyéndose las áreas hiperendémicas de la enfermedad. En cambio, la prevalencia ha aumentado en países del Este y zonas asiáticas de Rusia (Genchi et al., 2009) favorecido por el cambio climático y otros factores, como la falta de prevención, subestimación del riesgo de infección y el alto número de perros callejeros y huéspedes salvajes no tratados, principalmente chacales (Otranto et al., 2013; Kravchenko et al., 2016).

En España, se ha producido un aumento de la prevalencia en áreas del sur y el este ya consideradas endémicas de la enfermedad como son Extremadura, Murcia, Comunidad Valenciana, Cataluña y Aragón. Mientras que también hay un aumento progresivo de la

prevalencia en zonas con poca presencia del parásito, o presencia muy localizada, como es el caso de Galicia, Castilla y León, Castilla la Mancha, o Baleares. Además, las prevalencias del parásito se reportan por primera vez en Asturias, Cantabria, Navarra y País Vasco (Montoya et al., 2020; 2022) (Figura 2). Esto puede deberse a otros factores como la creación de áreas de regadíos y zonas urbanas, la adopción de mascotas y su traslado desde áreas endémicas a otras libres anteriormente del parásito sin los controles adecuados, y a la ausencia de profilaxis generalizada, lo que ayuda a su diseminación.

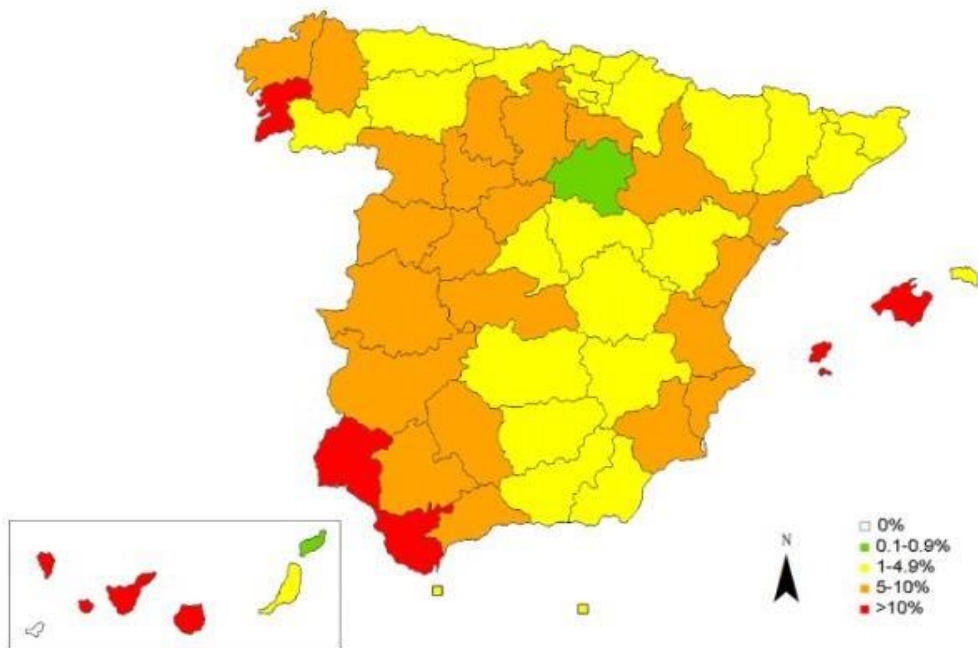


FIGURA 2: Mapa de prevalencia de *D. immitis* en perros en España (Montoya et al., 2022).

D. immitis es considerada una enfermedad hiperendémica en cuatro de las siete islas Canarias, habiéndose estabilizado su prevalencia en los últimos años. Debido a los microclimas característicos de las islas, las zonas rurales y áreas de cultivo presentan mayor incidencia que las urbanas. La exposición a *D. immitis* en la especie felina es proporcional al grado de dirofilariosis canina (Montoya et al., 2016).

FISIOPATOLOGÍA

Como hemos comentado con anterioridad los parásitos adultos se localizan en las arterias pulmonares, siendo los principales órganos afectados los pulmones y el corazón. Los cambios fisiopatológicos vendrán condicionados principalmente por la duración de la infección (cronicidad), la reacción propia de cada hospedador en respuesta a la infección y el nivel de actividad física de cada paciente (Knight et al., 1987; Dilon et al., 1995; McCall et al 2008a; Atkins et al., 2011).

Endarteritis pulmonar proliferativa.

La endarteritis pulmonar proliferativa consiste en una serie de cambios a nivel de la vasculatura pulmonar que se desencadenan por la presencia de los parásitos en la luz vascular así como otros mecanismos endógenos, que provocan un engrosamiento de la íntima vascular que conlleva a un estrechamiento de la luz arterial (Furlanello et al., 1998). Estos cambios se hacen visibles al poder observarse vellosidades en las paredes de las arterias afectadas, que se tornan rugosas y con tonos púrpuras en contraposición con las paredes vasculares sanas, que suelen ser de aspecto blanquecino y liso (Adcock et al 1961; Rawlings et al., 1986) (Figura 3).

Estos cambios desembocan en que las arterias lesionadas pierden su elasticidad y se vuelven tortuosas, sufriendo dilatación y aumento de diámetro. Sin embargo, la luz vascular disminuye debido al engrosamiento de la pared arterial de manera que, en algunos casos, se produce obstrucción por embolización en aquellas arterias más estrechas (Kittleson y Kienle, 2000; McCall et al., 2008b). Dicha remodelación suele comenzar a los pocos días después de la llegada de los parásitos a las arterias pulmonares, pudiendo evidenciarse cambios tras 3 meses de infección y agravándose desde los siguientes 2 meses, aproximadamente. Suele comenzar en las ramas periféricas de la arteria pulmonar, ya que es el primer sitio de fijación de los parásitos, para ir avanzando hacia segmentos proximales a medida que avanza la infección (Gómez et al., 1999).

La endarteritis pulmonar proliferativa se produce por cambios en la estructura y organización de las células endoteliales en la que se produce una migración de células de musculatura lisa de la túnica media a la íntima vascular. Se describe también la existencia

de neutrófilos activados adheridos a la superficie endotelial y una activación de la adhesión plaquetaria, debido al daño endotelial, lo que permite que la albúmina y células sanguíneas alcancen el espacio perivascular favoreciendo la infiltración de leucocitos en la pared arterial. A todo ello cabe añadir que se produce la multiplicación de células de la musculatura lisa en la túnica media, que migran a la superficie endotelial en respuesta a la liberación de factores de crecimiento. Esta multiplicación y migración de células musculares produce vellosidades en la superficie interna de las arterias pulmonares, las cuales también se componen de colágeno (Munnell et al., 1980; Venco et al., 2014a) (Figura 4).

Además de la acción del propio parásito en la íntima vascular, también se han descrito otros mecanismos que pueden favorecer el desarrollo de esta endarteritis pulmonar proliferativa como son la activación del sistema plasminógeno/plasmina llevado a cabo por los productos metabolitos del parásito. Ha sido descrito que la desregulación del sistema plasminógeno/plasmina conlleva a una sobreproducción de plasmina que desemboca en degradación de colágeno de tipo I,II,III,IV, V y XI y, por lo tanto, de la matriz extracelular, además de proliferación y migración celular en las arterias elásticas, contribuyendo así a la formación de las microvellosidades vasculares (Gonzalez-Miguel et al., 2015; Bou-Gharios G et al., 2004).

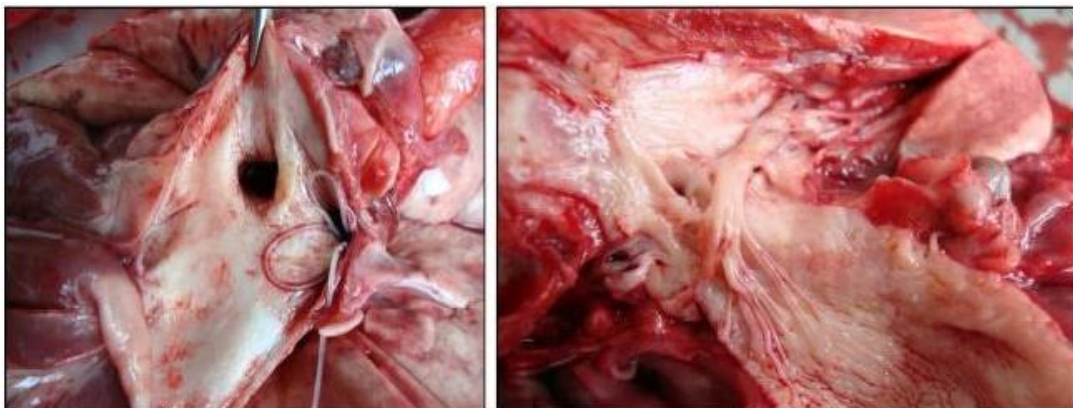


FIGURA 3: Endarteritis pulmonar proliferativa en la arteria pulmonar de un perro infectado por *D. immitis* donde se puede apreciar la presencia de vellosidades dando un aspecto rugoso a la pared, así como una tonalidad púrpura (Carretón et al., 2012).

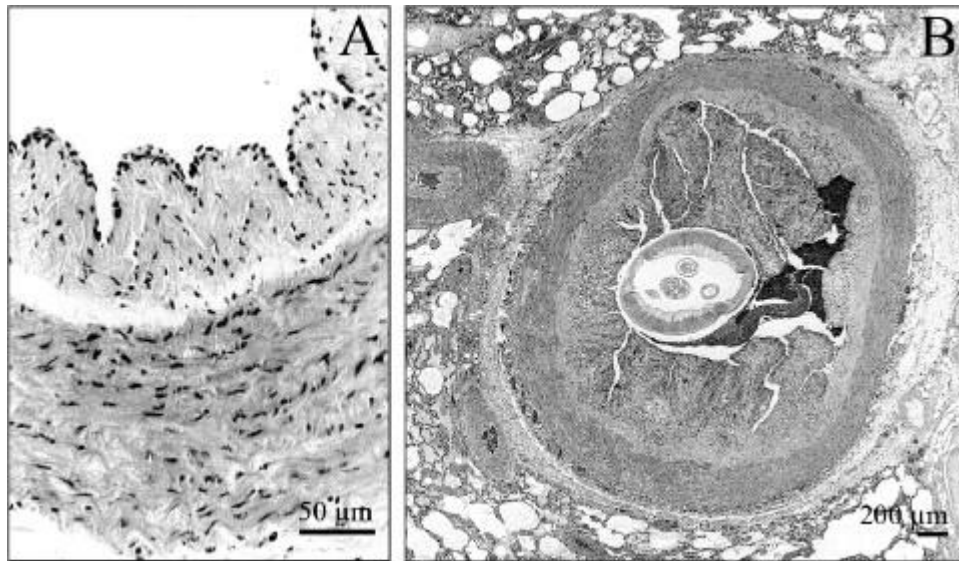


FIGURA 4: Imagen histológica de una sección de arteria pulmonar de un gato infectado por *D. immitis* donde se aprecia la endarteritis pulmonar proliferativa (A) además de un verme adulto rodeado por un trombo (B) (McCracken y Patton, 1993).

Hipertensión pulmonar.

La dirofilariosis cardiopulmonar es una enfermedad que afecta al sistema cardiorrespiratorio, produciendo un aumento de la resistencia vascular pulmonar, lo que supone un aumento de la poscarga debido a la vasoconstricción y remodelación vascular. Estas alteraciones conducen a la reducción de la luz vascular, pérdida de la elasticidad o distensibilidad de las arterias pulmonares, y la formación de tromboembolismos pulmonares, provocando todo ello hipertensión pulmonar (Rawlings et al., 1981; Sasaki et al., 1992; Rohn et al., 1995; Venco y Venzoni, 2001; Venco et al., 2014b). Estos cambios se producen de manera gradual y crónica, por lo que en ocasiones se puede formar una circulación colateral en el pulmón de ciertos animales infectados al igual que ocurre con otras enfermedades parasitarias por nemátodos, que podría compensar el aumento de presión (Borgeat et al., 2014).

Algunos de los factores relacionados con la severidad de la hipertensión pulmonar pueden ser la carga parasitaria relativa, la duración de la infección, la cantidad de ejercicio

realizado durante la parasitosis y la reacción individual del hospedador (Bowman y Atkins, 2009; Anne y Atkins, 2020), aunque otros autores afirman que el número de parásitos en las arterias pulmonares no correlaciona con el grado de hipertensión pulmonar en perros infectados por *D. immitis* (Uchide et al., 2005). Cabe añadir que la hipertensión suele ser moderada en la mayoría de los pacientes, aunque durante el ejercicio el gasto cardiaco aumenta — por el mayor requerimiento de sangre y su consiguiente aumento de flujo sanguíneo en el lado derecho del corazón — por lo que la presión en la arteria pulmonar puede llegar a ser más del triple (Kittleson et al., 1998). Por este fenómeno podría explicarse el principal signo clínico en muchos animales infectados por *D. immitis*, la intolerancia al ejercicio (Rawlings et al., 1978).

También se pueden presentar casos agudos en el caso de hipertensión pulmonar, asociados a la formación de tromboembolismos pulmonares secundarios a la muerte de los parásitos adultos, ya sea de manera inducida por el tratamiento o de manera natural, en los que se produce una obstrucción arterial y vasoconstricción (Kramer et al., 2008; Bowman y Atkins, 2009). En estos casos, el pronóstico es reservado debido a la escasa capacidad de compensación del lecho vascular ante un cambio tan brusco de presión en la circulación pulmonar. La hipertensión pulmonar puede, además, facilitar la recolocación de los parásitos migrando desde zonas distales de la arteria pulmonar a partes proximales de la misma o incluso al corazón, pudiendo favorecer el desarrollo del síndrome de vena cava (Atkins et al., 1988; Ames y Atkins, 2020) (Figuras 5 y 6).

Insuficiencia cardiaca congestiva derecha.

Como se ha descrito, la producción de esta endarteritis pulmonar proliferativa va a producir un aumento en la resistencia vascular pulmonar con un aumento de la poscarga en el ventrículo derecho y, por consiguiente, desarrollo de hipertensión pulmonar. De manera temprana, esta hipertensión pulmonar es sobrellevada por el ventrículo derecho, el cual va a incrementar su contractilidad para mantener el gasto cardiaco. Sin embargo, de manera crónica, esta sobrecarga de presión va a provocar ciertos cambios, como hipertrofia de los miocitos y leve fibrosis del endocardio, subendocardio e intersticio. Esta hipertrofia del ventrículo derecho será concéntrica en estados iniciales; es decir, el diámetro interno del ventrículo se verá mantenido (Hoch y Strickland, 2008; Poser y

Guglielmini, 2016) y de manera sostenida en el tiempo se producirá una hipertrofia excéntrica en el que el diámetro del ventrículo derecho se verá aumentado (Naliye et al., 2013).

En estadios más avanzados se observa un deterioro en la función diastólica, con lo que el llenado del ventrículo derecho se verá alterado dando lugar a una insuficiencia diastólica del mismo (Hsieh et al., 1992; Gaynor et al., 2005). Algunos autores sugieren que, en respuesta a esta sobrecarga de presión crónica a la que se ve sometida el ventrículo derecho, puede existir una actividad compensatoria por parte de la aurícula derecha la cual va a actuar como reservorio más que como conducto (Gaynor et al., 2005). Así lo han señalado estudios anteriores mediante modelos matemáticos, en los que se observó que el aumento de la distensibilidad auricular mejoraba el rendimiento cardiaco en casos de aumento crónico de poscarga derecha (Suga et al., 1974). Los cambios histopatológicos que tienen lugar en el ventrículo derecho también pueden aparecer en la aurícula derecha pero de manera más lenta, por lo que la capacidad de compensación del atrio derecho es muy importante y en casos en los que no tenga lugar podría aparecer signos de insuficiencia cardiaca congestiva derecha (Laks et al., 1969; Dillon et al., 1995; Gaynor et al., 2005; McCall., 2008). Según otros autores, hasta un 50% de los perros infectados por *D. immitis* van a desarrollar insuficiencia cardiaca congestiva (Calvert et al., 1999; Ettinger y Feldman, 2009b).

Lesiones pulmonares.

Aunque los parásitos adultos de *D. immitis* no se encuentran en contacto directo con el parénquima pulmonar, este órgano se ve afectado por el parásito de distintas maneras, debido a que desencadena una respuesta inflamatoria local causada por el depósito de antígenos parasitarios. Como se ha comentado con anterioridad, el desarrollo de endarteritis en las arterias pulmonares provoca un daño que desencadena aumento de la permeabilidad en los vasos, por lo que se produce un infiltrado de plasma y células inflamatorias, que da lugar a la aparición de edema e inflamación periarterial. Así, se forman infiltrados intersticiales y alveolares en los que principalmente se encontrarán eosinófilos y neutrófilos, dando lugar a una fibrosis irreversible (Rawlings et al., 1986).

Por consiguiente, el área de intercambio gaseoso se verá reducida, lo que contribuirá al aumento de la resistencia vascular pulmonar.

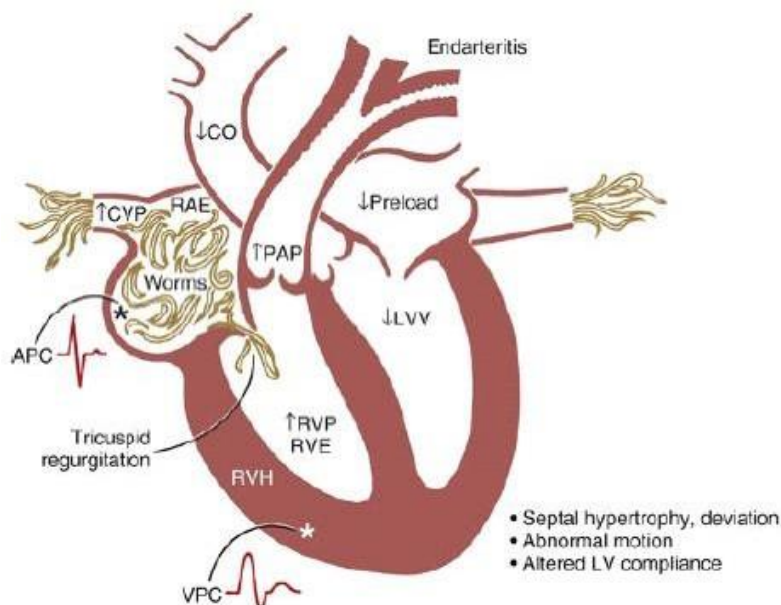


FIGURA 5: Diagrama explicativo de la patogénesis del fallo cardíaco en casos de síndrome de vena cava. Los parásitos migran de manera retrógrado desde las arterias pulmonares hasta el atrio derecho y vena cava. Esto produce alteración en la función de la válvula tricúspide y una disminución de la precarga. El bajo gasto cardíaco y la congestión que este fenómeno conlleva puede producir arritmias y contribuye aún más a la disfunción cardíaca. Leyenda: CO. Gasto cardíaco. APC. Complejos atriales prematuros. CVP. Presión venosa central. LVV. Volumen ventricular izquierdo. PAP. Presión arterial pulmonar. RAE. Dilatación de aurícula derecha. RVE. Dilatación de ventrículo derecho. RVH. Hipertrofia ventricular derecha. VPC. Complejo ventricular prematuro (Atkins, 1990; Ettinger y Feldman, 2009b).

Además, es posible encontrar lesiones pulmonares relacionadas con la neumonitis eosinofílica o alérgica, también denominada síndrome de infiltración eosinofílica pulmonar, la cual puede darse en perros que sufren hipersensibilización a los antígenos de las microfilarias. En estos pacientes, las microfilarias son inmovilizadas y destruidas de manera inmediata y aguda en la circulación pulmonar, debido a la presencia de gran número de anticuerpos frente a las microfilarias, principalmente IgG (Calvert y Losonsky, 1985). Esto va a producir la adhesión de los leucocitos a las microfilarias, que van a ser

rodeadas por una inflamación eosinofílica granulomatosa asociada, en ocasiones, a una linfadenopatía bronquial (Confert et al., 1983; Bowman y Atkins, 2009). Además, también se pueden formar lesiones del parénquima pulmonar focales debido a tromboembolismos pulmonares, generalmente producidos por la muerte de los parásitos adultos. Estos tromboembolismos van a agravar aún más la hipertensión pulmonar y, en su caso, el fallo cardiaco derecho pudiendo observarse, en raras ocasiones, infarto pulmonar. Los gusanos muertos van a desembocar a los vasos más pequeños, produciendo daño en éstos y potenciando la activación de la coagulación, por lo que la circulación pulmonar de la zona podría verse restringida y conllevar a la consolidación del lóbulo afectado (Bowman y Atkins, 2009). Además, se sospecha que *Wolbachia* también juega un papel en el proceso causante de las lesiones pulmonares; ciertos estudios han observado la presencia de trombos e intensa inflamación perivascular intersticial en perros sin tratamiento mientras que perros que recibieron tratamiento antibiótico, microfilaricida y adulticida mostraron lesiones arteriales menos graves y reducción en la presencia de trombos (Kramer et al., 2008).



FIGURA 6: Parásitos adultos de *D. immitis* en cámaras cardiacas derechas (European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017).

Tromboembolismo pulmonar.

D. immitis es capaz de crear un microambiente en el hospedador que previene la formación de trombos cuando están vivos. Se conoce que sus antígenos excretorios/secretorios pueden tener propiedades anticoagulantes estimulando la expresión de activadores de la fibrinólisis y reduciendo la actividad del factor Xa. (González-Miguel et al., 2015; Diosado et al., 2020; Ames y Atkins, 2020).

La formación de tromboembolismos pulmonares tiene lugar cuando los parásitos mueren, ya sea provocado por el tratamiento adulticida o de forma natural. Los parásitos van a circular a favor de corriente hasta quedar estancados en los vasos pulmonares de menor calibre, principalmente en lóbulos caudales, lo que va a contribuir al daño vascular y a activar la coagulación. Las zonas pulmonares afectadas tendrán su flujo sanguíneo muy reducido o incluso interrumpido, por lo que puede producirse consolidación e infarto pulmonar. Con todo ello provocará un desequilibrio en la relación ventilación-perfusión y, por consiguiente, hipoxemia (McCall et al., 2008b).

A nivel de la pared arterial, se observa una inflamación granulomatosa que favorecerá a la aparición de vellosidades en la íntima vascular seguido de un aumento de la permeabilidad vascular y formación de edema perivascular, como se ha detallado anteriormente. Por otra parte, los fragmentos de los parásitos serán calcificados y parcialmente incorporados a la pared arterial en cuyas zonas se formará, a modo de cicatriz, gran cantidad de tejido conectivo (Atkins et al., 2005). La formación de tromboembolismos pulmonares exacerbará la hipertensión pulmonar en estos pacientes. A su vez, y a raíz del daño vascular, las células endoteliales producirán factores como la endotelina-1 o factores liberados por las plaquetas como serotonina, adenosin fosfato (ADP) o tromboxano A₂, que contribuirán a la vasoconstricción vascular arterial pulmonar (Kramer et al., 2006; Ettinger y Feldman, 2009a).

Síndrome de vena cava.

El síndrome de vena cava tiene lugar cuando los parásitos adultos migran desde las arterias pulmonares hacia cámaras cardíacas derechas, imposibilitando el correcto

funcionamiento de la válvula tricúspide, así como a las venas cavas craneal y caudal (Figura 6). Esta obstrucción física del flujo sanguíneo, junto con la hipertensión pulmonar, producirá la aparición de signos de fallo cardiaco congestivo derecho por aumento de la presión venosa (Strickland, 1998). Este fenómeno ocurre en perros con alta carga parasitaria (Rawlings, 1986; Atkins et al., 1988; Ames y Atkins, 2020). En estos casos el pronóstico es desfavorable y está indicado el tratamiento quirúrgico para paliar los síntomas y reducir la carga parasitaria (Bové et al., 2010; Ames y Atkins, 2020).

Alteraciones renales.

Numerosos estudios han demostrado que las alteraciones renales también están presentes en los perros infectados por *D. immitis*. Se desarrolla una glomerulonefritis membranosa debido principalmente al depósito de inmunocomplejos en la membrana basal de la membrana glomerular, dañando el endotelio del mismo (Abramowsky et al., 1981; Buoro y Atwell, 1983; Graver et al., 1989). Esta glomerulonefritis se caracteriza histopatológicamente por la presencia de infiltrados inflamatorios en glomérulos, engrosamiento de la membrana basal glomerular y deposición de fibrina, con proliferación celular mesangial y endotelial (Nakagaki et al., 1993; Kamiie et al., 2000; Carretón et al., 2020).

La presencia de microfilarias en los capilares glomerulares y vasos medulares también contribuye a la exacerbación de la inflamación de los mismos (Ludder et al., 1988; Paes-de-Almeida et al., 2003). Además, las microfilarias sirven de vehículo para la bacteria endosimbionte *W. pipientis* que, al liberarse con la muerte de las microfilarias, aumenta la respuesta inmune específica y provocan, por lo tanto, una mayor inflamación (Aresu et al., 2007; McCall et al. 2008; Morchón et al., 2012; Hormaeche et al., 2014). La glomerulonefritis suele ir acompañada de proteinuria, lo que favorece el empeoramiento dando lugar a nefrosis grave; en algunos casos, puede observarse azotemia, aunque ésta normalmente no está presente (Kramer et al., 2005; Carretón et al., 2020). Algunos autores han descrito que más del 19% de perros infectados presentan proteinuria (Carretón et al., 2020). La presencia de proteinuria puede conllevar, entre otras, la pérdida de Antitrombina III la cual juega un papel especialmente importante en el estado de

hipercoagulabilidad en los perros infectados por *D. immitis* (Ettinger y Feldman, 2009c; Carretón et al., 2013).

SIGNOS CLÍNICOS

La aparición de signos clínicos en los perros infectados por *D. immitis* suele demorarse hasta pasado el periodo larvario y pre-adulto de los parásitos, que suele ser de unos 6 o 7 meses. Por ello, esta enfermedad suele ser silente al principio y la aparición de síntomas no sucede hasta que la enfermedad no se cronifica, pudiendo comenzar a aparecer en torno al año tras la infección y siendo más evidentes varios años después (Kittleson, 1998; McCall et al., 2008b). La presentación de éstos va a depender principalmente de la carga parasitaria relativa, duración de la infección, cantidad de ejercicio y la reacción individual del hospedador al parásito (Dillon et al., 1995; Bowman y Atkins, 2009; Ames y Atkins, 2020). La tos no productiva y crónica acentuada tras el ejercicio suele ser el hallazgo más común en perros levemente afectados, además de disnea, taquipnea, intolerancia al ejercicio, pérdida de peso y síncope cuando la enfermedad va avanzando. Puede aparecer hemoptisis y/o epistaxis debido a la inflamación vascular pulmonar, la cual puede desarrollar aneurismas que, junto con la aparición de tos, pueden provocar la ruptura de algunos vasos pulmonares.

A la auscultación cardiaca puede existir un soplo sistólico con punto de mayor intensidad en la región apical derecha en caso de insuficiencia tricúspideas, cuando existe hipertensión pulmonar, así como un soplo diastólico pulmonar en caso de presencia de insuficiencia pulmonar valvular. En lo referente a la auscultación pulmonar, en ocasiones se pueden escuchar crepitaciones pulmonares difusas, más marcadas en lóbulos caudales en casos de granulomatosis eosinofílica, aunque puede existir afección pulmonar sin cambios en la auscultación (Ames y Atkins, 2020). En casos de insuficiencia cardiaca congestiva derecha y síndrome de la vena cava podemos observar distensión y presencia de pulso yugular, el cual indica aumento en la presión del atrio derecho, acompañado de hepatomegalia, esplenomegalia y ascitis (Ettinger y Feldman, 2009b; Ames y Atkins, 2020). Otros hallazgos menos frecuentes son efusión pleural, derrame pericárdico o edema subcutáneo, este último mayormente asociado a hipoalbuminemia. La naturaleza y gravedad de los signos clínicos son una de las características principales que se tienen

en cuenta a la hora de establecer un estadiaje de severidad clínica en la enfermedad, en la clasificación clásica establecida por Di Sacco y Vezzoni. (1992) (Tabla 1).

Clasificación según gravedad	Características clínicas
Clase I	Anamnesis y exploración física normales
	Radiografía torácica, ecocardiografía y analítica sin alteraciones
	Pronóstico favorable
Clase II	Leve intolerancia al ejercicio y tos
	Radiografía torácica: ligero engrosamiento de la arteria pulmonar y aumento moderado de ventrículo derecho
	Ecocardiografía: presencia de filarias adultas
	Pronóstico: reservado
Clase III	Intolerancia al ejercicio, tos persistente, disnea, anorexia, soplo sistólico
	Radiografía torácica: engrosamiento de las arterias pulmonares y dilatación de ventrículo derecho
	Ecocardiografía: presencia de filarias adultas en arterias pulmonares y ventrículo derecho
	Pronóstico: grave
	Síntomas anteriores además de shock, letargia, ascitis, disnea, cianosis. Hemoglobinuria y/o hemoglobinemia

Clase IV (Síndrome de vena cava)	Radiografía torácica: aumento de las arterias pulmonares, dilatación de ventrículo derecho y cava caudal
	Ecocardiografía: filarias en arterias pulmonares, ventrículo derecho, cava caudal y craneal
	Pronóstico: desfavorable

TABLA 1: Clasificación clínica en pacientes infectados por *D. immitis* (Di Sacco y Vezzoni, 1992).

DIAGNÓSTICO DE LA DIROFILARIOSIS CARDIOPULMONAR CANINA

Para establecer un diagnóstico definitivo de la enfermedad se realizará un test de antígenos y para valorar el estadio de enfermedad y el pronóstico serán necesarias varias pruebas complementarias (European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2020).

Test de antígenos.

Para el diagnóstico de la dirofilariosis cardiopulmonar, el test de antígenos es el método de elección (Figura 7). Existen kits comerciales basados en técnicas de ELISA e inmunocromatografía, desarrollados para la detección de antígenos de gusanos adultos de *D. immitis* (Barr et al., 2011, Henry et al., 2018; Little et al., 2018). Estos test van a detectar antígenos del tejido ovárico de hembras adultas, (Courtney y Cornell, 1990) si bien los de última generación también son capaces de detectar proteínas comunes tanto en machos como en hembras (Grieve et al., 1981; Weil et al., 1987).

Dichos test poseen una especificidad muy elevada (99,3-100%), por lo que la posibilidad de obtener reacciones cruzadas con otras filarias caninas como *D. repens*, *D. reconditum*,

A. dracunculoides y *S. lupi* es baja. La sensibilidad es muy elevada, aunque cargas parasitarias muy bajas pueden no ser detectadas (Courtney y Zeng., 2001; Atkins et al., 2003). Los falsos positivos suelen ser poco frecuentes y están asociados a fallos técnicos a la hora de realizar el test o a que el tiempo de lectura del resultado haya sido mayor al indicado por el fabricante (Wang et al., 1998; Atkins et al., 2003; Lee et al., 2011). Por otro lado, pueden reportarse falsos negativos debido principalmente a baja carga parasitaria, infección en periodo prepatente en el que los parásitos aún no son adultos (McCall et al., 2001; Henry et al., 2018), o parásitos adultos muy viejos con menor carga antigénica. También pueden producirse falsos negativos por reacciones inmunes con formación de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo en el hospedador, infecciones causadas sólo por parásitos adultos machos, una administración continuada de lactonas macrocíclicas en perros infectados o por errores en el manejo a la hora de realizar el test (Tonelli et al., 1989; American Heartworm Society, 2020).



FIGURA 7: UranoTest® Quattro (*Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum* y *Anaplasma spp*) con resultado positivo frente a *D. immitis*.

Detección de microfilarias.

La detección de microfilarias circulantes se considera un método complementario para el diagnóstico de la dirofilariosis cardiopulmonar incluso en zonas hiperendémicas de enfermedad. Esto es debido a que entre un 10-20% de las infecciones pueden cursar con amicrofilaremia debido a, por ejemplo, que exista parasitación con gusanos adultos de un solo sexo, inmadurez de los parásitos o por el contrario infecciones con parásitos de edad avanzada, existencia de localización ectópica, destrucción inmunomediada de las

microfilarias por parte del sistema inmune o aplicación de tratamiento preventivo intermitente (Rawlings et al., 1982; Ettinger y Feldman, 2009b). Sin embargo, la aplicación de esta técnica es de gran utilidad en animales en los que se sospecha de infección, pero se ha obtenido un test de antígenos negativo (Velasquez et al., 2014).

El método de referencia para cuantificar la cantidad de microfilarias es el test de Knott, permitiendo además la diferenciación morfológica entre *D. immitis*, *D. repens* y *Acanthocheilonema* spp (Knott, 1939; Mylonakis et al., 2004). La cantidad de microfilarias observadas no está correlacionado con la carga de parásitos adultos ni con la severidad de la infección (European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2020).

Radiología torácica.

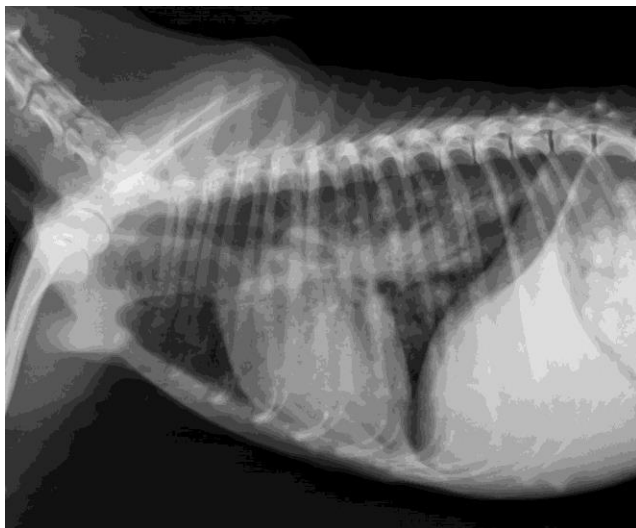
La radiografía torácica es un método complementario en el diagnóstico, ayudando a determinar la severidad de la infección ya que aporta información sobre los cambios que ocurren tanto en el parénquima pulmonar como en la vasculatura (Venco et al., 2003; Bahr., 2009) (Figuras 8 y 9).

Se considera que hasta el 85% de los pacientes infectados por *D. immitis* desarrollan cambios radiológicos del parénquima pulmonar, los cuales pueden presentarse de manera precoz en casos de respuesta inflamatoria, normalmente asociada a la llegada de las filarias pre-adultas al parénquima pulmonar, mientras que otros cambios se harán evidentes con el avance de la enfermedad asociados a la cronicidad del daño vascular y a la formación de tromboembolismos pulmonares; por ejemplo, se observan zonas de radiodensidad aumentada adyacentes a las arterias afectadas normalmente en los lóbulos pulmonares caudales (Bowman y Atkins, 2009; Ettinger y Feldman, 2009b).

Los hallazgos radiológicos asociados a la vasculatura pulmonar son la dilatación y aumento de la tortuosidad de las arterias pulmonares principales y periféricas (Quinn y Williams, 2011b). Estas arterias pulmonares pueden terminar su recorrido de forma brusca en casos de presencia de tromboembolismos pulmonares al verse interrumpido el flujo sanguíneo a través de ellas (Losonsky et al., 1983). Para la valoración radiológica

de las arterias pulmonares, las proyecciones ventrodorsal y/o dorsoventral son las de mayor utilidad ya que nos permiten comparar el diámetro de las mismas con el diámetro de la novena costilla, siendo considerado un valor normal un ratio arteria:costilla <1 (Tudor et al., 2014; Oui et al 2015). En la proyección laterolateral izquierda podemos valorar las arterias lobares craneales, las cuales no deben tener un diámetro mayor al diámetro de la cuarta costilla en su porción más proximal (Tharll y Losonsky, 1976).

La dilatación de las cámaras cardíacas derechas se asocia a fases avanzadas de la enfermedad y según estudios se puede observar hasta en un 60% de los casos (Losonsky et al., 1983). Se evalúa con mayor facilidad en las proyecciones ventrodorsal y/o dorsoventral, observándose la silueta cardíaca con la denominada forma de "D invertida" en aquellos animales con cámaras derechas dilatadas (Bahr, 2009). También puede ser de utilidad la medición del índice cardíaco-vertebral para valorar la presencia de cardiomegalia de manera objetiva (Buchanan y Bucheler, 1995; Lister et al., 2005). En caso de presencia de fallo cardíaco congestivo derecho podemos observar dilatación de vena cava caudal, además de efusión pleural (Georgi y Georgi, 1994).



FIGURAS 8 y 9: Radiografías laterolateral derecha y dorsoventral de perro con dirofilariosis cardiopulmonar en el que se aprecia un patrón bronquio-intersticial pulmonar además de dilatación de arterias pulmonares y leve aumento de las cámaras cardíacas derechas.

Electrocardiografía.

Aunque las arritmias son poco frecuentes en perros infectados por *D. immitis* podemos encontrar alteraciones electrocardiográficas en fases avanzadas de la enfermedad, principalmente cuando el corazón se ve afectado. Algunos autores demostraron que entre un 38-62% de perros con dirofilariosis cardiopulmonar presentaban anormalidades en el electrocardiograma (Lombar y Ackerman, 1984), mientras que en otros estudios reportan alteraciones solo en un 6% (Calvert y Rawlings, 1988). En cuanto a los hallazgos más comunes, se describe desvío del eje eléctrico medio hacia la derecha en caso de dilatación/hipertrofia del ventrículo derecho. Esta alteración suele estar asociada a la presencia de ondas Q y S profundas en el complejo QRS y bloqueo de rama derecha (Figura 10). En casos de dilatación de aurícula derecha, podemos observar ondas P *pulmonale* normalmente asociadas a la presencia de hipertensión pulmonar (Ettinger y Feldman, 2009b). La presencia de arritmias suele ser de entre un 2-4% caracterizadas por complejos atriales y ventriculares prematuros o fibrilación atrial, sobre todo en casos de síndrome de vena cava, insuficiencia cardiaca e hipertensión pulmonar (Atkins, 2009; Montoya Alonso y Carretón, 2012).

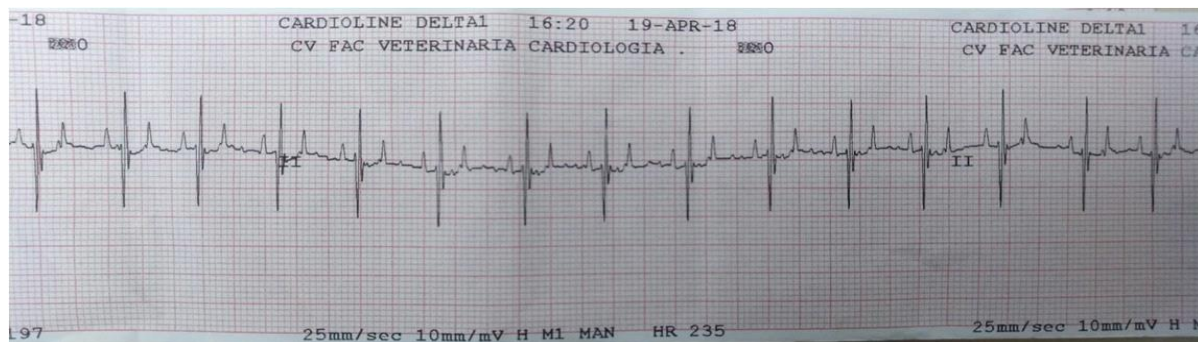


FIGURA 10: Trazado electrocardiográfico (25 mm/sec; 10 mm/mV) en el que se puede apreciar un ritmo sinusal con aumento de voltaje de onda Q en derivación II indicativo de bloqueo de rama derecha en un paciente infectado por *D. immitis*.

ECOCARDIOGRAFÍA

La ecocardiografía es un método complementario de gran valor en pacientes con dirofilariosis cardiopulmonar ya que nos permite valorar la morfología y función del corazón. Esta técnica permite visualizar a los parásitos adultos en muchas ocasiones, los cuales se localizan principalmente en las arterias pulmonares distales, aunque si se encuentran fuera del campo ecográfico no siempre son visibles. En pacientes con alta carga parasitaria podemos observar fácilmente a los gusanos adultos en arteria pulmonar principal y en aurícula y ventrículo derechos. Los parásitos se visualizan como dos líneas hiperecogénicas paralelas. Debemos tener precaución ya que algunos artefactos pueden dar lugar a un diagnóstico falso positivo (Quinn y Williams, 2011b; Paradies et al., 2014). Para visualizar los parásitos de manera óptima se recomienda realizar un corte transversal a nivel del tracto de salida del ventrículo derecho y del tronco pulmonar en posición paraesternal derecha (Boon, 2012); a este nivel podemos valorar la carga parasitaria relativa (Venco et al., 2001). Gracias al examen bidimensional o modo B podemos valorar la morfología del ventrículo derecho a causa del aumento de poscarga como son hipertrofia de la pared libre del ventrículo derecho y del septo interventricular o la dilatación de las arterias pulmonares. En casos de hipertensión pulmonar podemos observar aplanamiento del septo interventricular, movimiento septal paradójico y/o dilatación del ventrículo derecho (Tai y Huang, 2013).

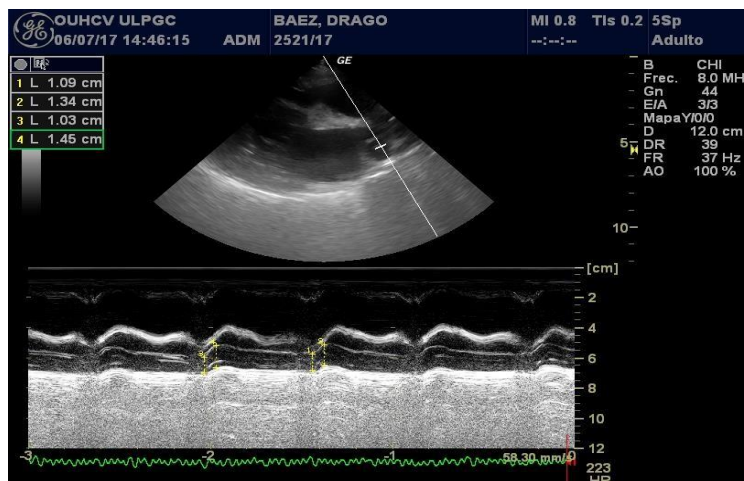


FIGURA 11: Imagen ecocardiográfica en vista paraesternal derecha de un perro con dirofilariosis en el que se observa un corte de cuatro cámaras. Medición mediante Modo M del índice de distensibilidad de la arteria pulmonar derecha.

Además, mediante el modo M podemos medir el índice de distensibilidad de la arteria pulmonar derecha el cual nos permite valorar la elasticidad de las arterias pulmonares en los casos de endarteritis pulmonar proliferativa (Figura 11), lo que permite estimar la presencia y gravedad de hipertensión pulmonar (Venco et al., 2014; Visser et al., 2016; Serrano Parreño et al., 2017).

El examen por Doppler color nos ayuda a observar la presencia de regurgitación, tanto tricúspidea como pulmonar, para detectar los casos de hipertensión pulmonar por aumento de la poscarga y creación de un gradiente de presión (Figura 12). Por otro lado, el Doppler espectral nos ayuda a valorar la velocidad del flujo a través de las válvulas y estimar la presencia y gravedad de hipertensión pulmonar (Kellihan y Stepien, 2012b; Boon, 2012) (Figura 13).

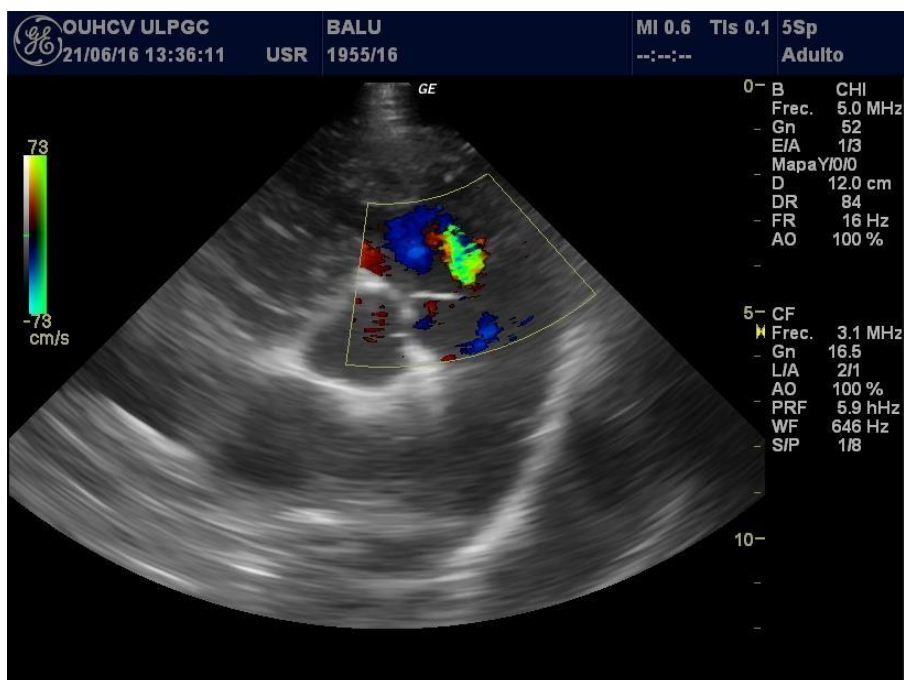


FIGURA 12: Imagen ecocardiográfica en corte paraesternal derecho a nivel de base cardíaca de un perro infectado por *D. immitis* con carga parasitaria moderada. El examen de la válvula pulmonar mediante Doppler Color muestra la presencia de regurgitación pulmonar.

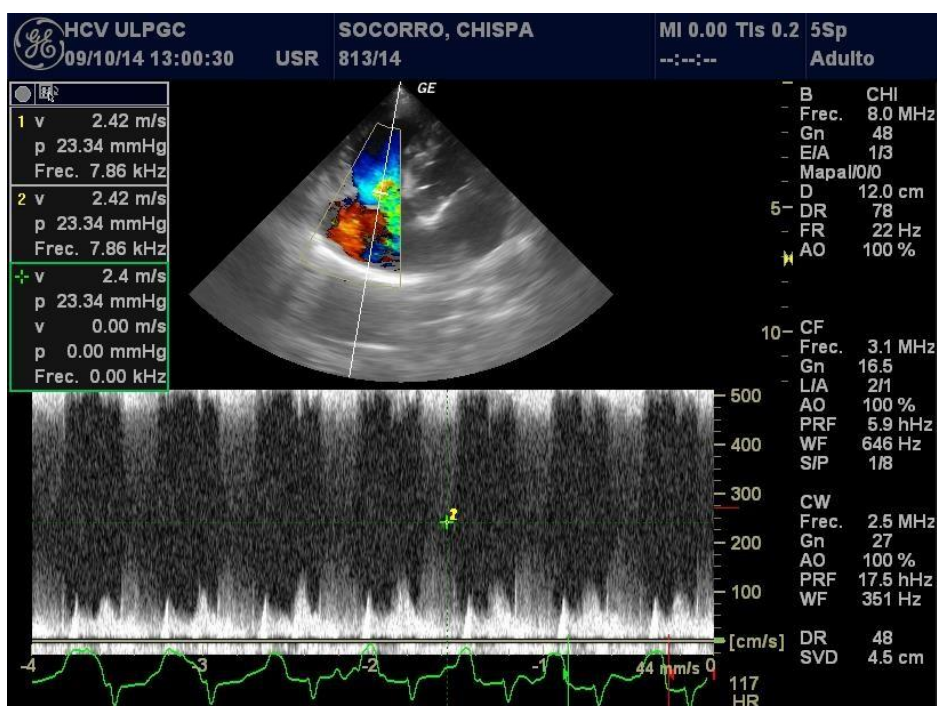


FIGURA 13: Imagen ecocardiográfica mediante ventana paraesternal izquierda en el que se observa un corte apical de cuatro cámaras en un perro con dirofilariosis. Mediante Doppler espectral se mide la velocidad de regurgitación tricúspidea, siendo en este caso, de 2,4 m/s (se considera hipertensión pulmonar una regurgitación >2,8 m/s) (Kellihan y Stepien, 2010; Reiner et al., 2020).

Pruebas de laboratorio.

En referencia a las pruebas hematológicas, las anomalías más comunes en perros infectados por *D. immitis* son: anemia no regenerativa leve, neutrofilia, eosinofilia, basofilia y trombocitopenia. En casos de pacientes con síndrome de vena cava se puede observar, además, anemia hemolítica debido a que existe una destrucción traumática de los eritrocitos al pasar a través de los parásitos adultos en la aurícula derecha principalmente (Buoro y Atwell, 1984; Atwell y Farmer, 1982). También se ha descrito la presencia de anemia no regenerativa tanto leve como moderada en perros microfilarémicos (Atwell y Buoro, 1983). Estudios recientes describen la presencia de anomalías en la distribución media de glóbulos rojos en los casos de hipertensión

pulmonar severa (Swann et al., 2014; Mazzotta et al., 2016; Su-Jung Kim et al., 2020). La distribución de glóbulos blancos suele ser normal en pacientes asintomáticos (Rawlings, 1985), aunque hay presencia de eosinofilia en el 85-95% de los perros, siendo un signo inespecífico de la enfermedad (Confer, 1983). En el caso de pacientes amicrofilarémicos se puede encontrar neutrofilia asociada a la respuesta inmune frente a las microfilarias (Gosset et al., 1987).

Los parámetros bioquímicos suelen verse afectados en pacientes con enfermedad severa. Suelen verse afectados principalmente los parámetros hepáticos como la ALT y AST y se relaciona con una disminución del gasto cardíaco derecho que conlleva congestión venosa hepática o asociado a coagulación intravascular diseminada (Ames y Atkins, 2020). La elevación de la ALT en estos pacientes, según ciertos estudios, sugiere un pronóstico reservado (Bove et al., 2010). También está descrita la presencia de azotemia y proteinuria, y los pacientes con síndrome de vena cava pueden presentar orina de color marrónáceo asociado a la presencia de hemoglobinuria (Atkins et al., 2009, Bowman y Atkins, 2009).

En cuanto al perfil de coagulación cabe recordar que en estos pacientes existe daño endotelial, lo cual conlleva a la adhesión plaquetaria y leucocitaria lo que facilita la formación de tromboembolismos pudiendo derivar en un mayor consumo de plaquetas, fibrinógeno y otros sustratos de la coagulación, mostrándose alteraciones analíticas en este sentido (Schaub et al., 1981; Rawlings et al., 1982; Boudreaux y Dillon, 1991; Ames y Atkins, 2020). Además, en casos de sospecha de presencia de tromboembolismo pulmonar el Dímero-D es un marcador de gran ayuda en casos de infecciones por *D. immitis*. (Carretón et al., 2013; 2017) (Figura 14).

También ha sido descrito la utilidad de la valoración de proteínas de fase aguda en el pronóstico y seguimiento de la dirofilariosis cardiopulmonar, además de biomarcadores como el péptido natriurético NT-ProBNP y troponinas cardíacas para valorar el daño cardíaco en estos pacientes (Carretón et al., 2013; 2017; Yoon et al., 2017; Ames y Atkins, 2020).



FIGURA 14: Imagen de medición de Dímero D en paciente infectado por dirofilariosis cardiopulmonar (Cobas h232®, Roche). El resultado obtenido es 0,33 ug/ml (valor de referencia: <0,2 ug/ml).

Tomografía axial computerizada.

La tomografía axial computerizada es una técnica que se encuentra cada vez más entendida en la práctica diaria de la medicina veterinaria. El estudio mediante esta prueba del tórax ayuda a valorar tanto el parénquima pulmonar como el estado de la vasculatura pulmonar a la hora de estudiar la presencia de tromboembolismos pulmonar al emplearse técnicas de contraste además de ayudar en el diagnóstico de hipertensión pulmonar. (Kellihan y Stepien, 2012). Actualmente, los estudios relacionados con la dirofilariosis son escasos, limitándose únicamente al estudio de infecciones experimentales y casos clínicos (Takahashi et al., 2008; Jung et al., 2020; Oliveira et al., 2010; Seiler et al., 2010).

PROFILAXIS

La prevención es de vital importancia en esta enfermedad. Se recomienda empezar lo antes posible con tratamiento preventivo, en torno a las 6-8 semanas de edad (Atkins et al., 2011; European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2020). Dicho tratamiento preventivo está basado en el uso de lactonas macrocíclicas: ivermectina, abamectina, selamectina, eprinomectina, dentro del

grupo de las avermectinas, así como milbemicina oxima y moxidectina, pertenecientes al grupo de las milbemicinas. Existen diferentes preparados comerciales que pueden aplicarse tanto de manera oral como en *spot on* o inyectable, con una regularidad mensual, o anual en el caso de la aplicación inyectable (Prichard, 2021). Las lactonas macrocíclicas son capaces de destruir las larvas transmitidas por el mosquito al hospedador durante los 30-60 días anteriores a su aplicación. Presentan, por lo tanto, actividad antihelmíntica frente a microfilarias, L3 y L4, si bien su eficacia sobre esta última forma larvaria es menor. Además, si se emplean de manera continua pueden actuar sobre las L5. El mecanismo de acción de estos fármacos in vivo frente al parásito aún no ha sido del todo esclarecido; parece ser que las lactonas macrocíclicas actúan sobre los canales de cloro ligados al glutamato además de bloquear el poro excretor/secretor del parásito, el cual juega un papel muy importante en la evasión del sistema inmune del hospedador (Moreno et al., 2010; Wolstenholme et al., 2013; Noack et al., 2021).

RESISTENCIAS Y FALTA DE EFICACIA

Aunque cada vez se reportan más casos de falta de eficacia de las lactonas macrocíclicas frente a *D. immitis*, su eficacia y ratio terapéutico/tóxico son excelentes. Varios estudios han sido publicados durante las últimas décadas indicando la falta de eficacia de las lactonas macrocíclicas frente a *D. immitis* (Pulaski et al., 2014; Bourguinat et al., 2015, Ballesteros et al., 2018). Se cree que la mayoría de estos fallos se deben a la falta de comunicación o entendimiento entre el veterinario y el propietario, o a la incorrecta aplicación del preventivo por parte del cliente (Atkins, 2011).

Actualmente se reconoce la existencia de cepas resistentes a las lactonas macrocíclicas, principalmente presentes en Estados Unidos. La primera cepa descrita fue la denominada MP3, la cual se encontró en Estados Unidos en el año 2006. Tras el paso de los años se han descrito nuevas cepas resistentes (por ejemplo, Td2008 y Jd2009) mostrando resistencia especialmente a ivermectina y milbemicina, siendo la moxidectina tópica efectiva (Noack et al., 2021). Sin embargo, otros estudios reportan haber encontrado resistencia también frente a moxidectina de algunas cepas como JYD-34, ZoeMO, ZoeLA y AMAL, la cual se vio resuelta al aumentar la dosis del antiparasitario (McTier et al., 2017; McTier et al., 2019). Esto no es exclusivo de *D. immitis*, ya que otros parásitos han

demostrado resistencia a las lactonas macrocíclicas como *Trichostrongylus* spp. en pequeños rumiantes (Bowman et al 2012) u *Onchocerca volvulus* (Osei-Atweneboana et al., 2011; Nana-Djeunga et al., 2014; Noack et al., 2021). Actualmente, se están estudiando los mecanismos por los cuales los parásitos desarrollan estas resistencias (Prichard, 2021).

TRATAMIENTO

Antes de comenzar con un plan terapéutico se recomienda valorar el estado general del paciente teniendo en cuenta la historia clínica, el examen físico, los resultados del test de antígenos, así como los hallazgos radiológicos y ecocardiográficos, que nos ayudarán a determinar si existe daño cardiovascular y/o respiratorio (Tabla 1). Se debe tener en cuenta que la aparición de signos clínicos está estrechamente relacionada con la actividad y el ejercicio físico que realiza el paciente, por lo que perros inactivos pueden no presentar síntomas evidentes de enfermedad. Además, podemos encontrar enfermedad cardíaca en pacientes con infecciones crónicas.

Eliminación de las larvas migratorias y de las microfilarias.

Antes de comenzar con el tratamiento adulticida se deben eliminar las microfilarias circulantes, así como las larvas L3 y L4 administrando lactonas macrocíclicas a sus dosis preventivas habituales durante 2 o 3 meses antes de administrar el fármaco adulticida, si bien es posible reducir este intervalo a un mes (Carretón et al., 2019; European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2020). Además, al comenzar con tratamiento preventivo se evita que el paciente se reinfecte, y durante este plazo de tiempo previo a la administración del fármaco adulticida, se permitirá que las filarias que ya no son susceptibles a las lactonas macrocíclicas continúen su desarrollo para convertirse en parásitos pre-adultos y adultos, sensibles a la melarsomina diclorhidrato (Atkins y Miller, 2003; McCall et al., 2004). Además, al comenzar con el uso de lactonas macrocíclicas, la capacidad reproductiva de las hembras adultas se ve disminuida.

Tratamiento frente a *Wolbachia pipientis*.

Como se ha descrito con anterioridad, *W. pipientis* tiene gran importancia en la patofisiología de la enfermedad, por lo que se debe eliminar previamente al tratamiento adulticida para evitar su liberación al torrente sanguíneo (Kramer et al., 2005). Por ello, la administración de doxiciclina previamente al tratamiento adulticida durante 28 días (10 mg/kg/12 horas) reduce la aparición y severidad de tromboembolismo pulmonar y neumonitis. (Kramer et al., 2011; Ames y Atkins., 2020). Además, este tratamiento inhibe la embriogénesis y disminuye supervivencia de los parásitos adultos (Kramer et al., 2008; McCall et al., 2008; Kramer y Genchi, 2014; McCall et al., 2014). También ha sido descrito que la terapia con doxiciclina junto con lactonas macrocíclicas va a reducir el número de microfilarias de manera mucho más rápida (Carretón et al., 2020b).

Tratamiento adulticida.

El tratamiento adulticida de elección es el derivado arsenical dihidrocloruro de melarsomina (Immiticide®) el cual se administra de manera intramuscular lumbar profunda. La dosis indicada es de 2.5 mg/kg y las actuales recomendaciones apuntan a la aplicación de una primera dosis inicial seguida de dos dosis separadas 24 horas entre sí, 4 semanas tras la primera administración (Nelson et al., 2005; European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2020). Este protocolo asegura la muerte escalonada y controlada de los parásitos adultos reduciendo así el riesgo de desarrollo de tromboembolismo pulmonar (Atkins y Miller, 2003).

Se ha de tener en cuenta la posible aparición de efectos secundarios tras la administración de melarsomina, tales como edema en el punto de inyección, miositis y dolor, además de posible producción de abscesos estériles. Otras posibles reacciones incluyen letargia, anorexia, hipersalivación, fiebre, vómitos y diarreas o de tipo respiratorio tales como tos, jadeos y disnea (Kittleson y Kienle, 2000; Ware et al., 2000; Maxwell et al., 2014; Ames y Atkins, 2020).

Restricción del ejercicio.

La restricción del ejercicio es de gran importancia durante todo el tratamiento y especialmente durante el tratamiento con melarsomina, ya que reduce la aparición de complicaciones asociadas a la muerte de los parásitos adultos como el tromboembolismo pulmonar (Dillon et al., 1995; McCall et al., 2008; Ames y Atkin, 2020; European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2020). En periodos en los que el gasto cardiaco aumenta, como es el caso de la actividad física, se incrementa el flujo sanguíneo a través de la vasculatura pulmonar, presumiblemente obstruida por la presencia de los parásitos adultos muertos, por lo que es más probable la ruptura de los capilares afectados, provocando fibrosis de los mismos, aumento de la resistencia vascular pulmonar y conduciendo a una insuficiencia cardiaca derecha (Bowman y Atkins, 2009).

Tratamiento del tromboembolismo pulmonar.

La formación de tromboembolismos es muy probable durante la fase del tratamiento adulticida, ya que los parásitos adultos van a caer en la vasculatura pulmonar provocando una reacción inflamatoria en la misma. Esto principalmente ocurre entre 5 a 10 días tras la administración de melarsomina (Atwell et al., 1986; Vezzoni et al., 1992; Carreton et al., 2013). Cuando esto ocurre pueden observarse signos como tos, hemoptisis, hemorragias focales o coagulación intravascular diseminada (Calvert y Rawlings, 1985; Ames y Atkins, 2020).

Para intentar controlar los síntomas, se recomienda el tratamiento con esteroides, oxigenoterapia y restricción del ejercicio severa (Calvert et al., 1999; Rawlings y Tackett, 1990; Ames et al., 2020). El uso de esteroides debe estar justificado y comenzar en perros que presenten síntomas asociados a tromboembolismo, ya que si se administran de manera errónea pueden provocar hipercoagulabilidad (Rose et al., 2011; Carretón et al., 2014; Ames et al., 2020).

No existe en la actualidad consenso respecto el uso de anticoagulantes o tratamiento trombolítico (DeLaforcade et al., 2019; American Heartworm Society, 2020). La aspirina

no parece tener efectos en casos de daño vascular e incluso está contraindicada en estos casos (Rawlings, 1990; Knight, 1995; Kittleson, 1998; Atkins, 2005). El uso de clopidogrel parece reducir el riesgo de tromboembolismo pulmonar al combinarse con esteroides en perros sanos, pero no existen aún estudios que analicen su acción en perros infectados por *D. immitis* (Thomason et al., 2020). Tal vez la aparición de nuevos tratamientos anticoagulantes, como el rivaroxabán, puedan ser de utilidad en el futuro (Ames et al., 2020).

Tratamiento quirúrgico.

El tratamiento quirúrgico se ha convertido en el tratamiento alternativo en pacientes con alta carga parasitaria o con síndrome de vena cava. Se lleva a cabo una extracción quirúrgica de los parásitos adultos a través de un acceso vascular transyugular, preferiblemente a través de la vena yugular derecha, accediendo a cámaras cardíacas derechas y arterias pulmonares mediante el empleo de fórceps flexibles *Alligator* o un lazo quirúrgico; la fluoroscopia es de gran ayuda para guiar el dispositivo endovascular y/o la ecografía transesofágica para visualizar los parásitos (Sasaki et al., 1989; Bové et al., 2010; Yoon et al., 2013; Cavaliere et al., 2017; European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2020).

Tras la extracción quirúrgica se debe monitorizar al paciente, ya que es posible la aparición de coagulación intravascular diseminada, daño renal severo y/o anemia (Bové et al., 2010). Con la intervención no suele ser posible la extracción de todos los parásitos adultos, por lo que posteriormente se debe comenzar con el tratamiento adulticida tradicional (Strickland, 1998; Ames et al., 2020; American Heartworm Society, 2020).

CONFIRMACIÓN DE ÉXITO DEL TRATAMIENTO

La recuperación del paciente y la desaparición de signos clínicos no aseguran que los parásitos hayan sido eliminados de manera eficaz, por lo que para confirmar la eficacia del tratamiento debe realizarse un test de antígenos 6 meses tras la última dosis de melarsomina (McTier et al., 1994; Maxwell et al., 2014; European Society of

Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2020). No se recomienda realizar esta prueba antes de los 6 meses debido a que los restos antigénicos de parásitos muertos pueden persistir en sangre entre 4 y 5 meses hasta su eliminación completa (McCall et al., 2004).

HIPERTENSIÓN PULMONAR

La hipertensión pulmonar es un síndrome complejo que pone en alto riesgo de muerte a los animales que la padecen. Es una enfermedad dependiente de múltiples factores y normalmente asociada a enfermedades sistémicas en las cuales la vasculatura pulmonar sufre cambios. Gracias al reconocimiento de los síntomas, las posibles etiologías que la producen y la disponibilidad de mejores medios para su diagnóstico, hoy en día existe una mayor calidad y esperanza de vida de los pacientes que la sufren.

La hipertensión pulmonar es un estado patofisiológico que depende del flujo sanguíneo pulmonar, la resistencia vascular pulmonar y la presión poscapilar (Stepien, 2009). Se define como un aumento de la presión arterial sistólica mayor de 30 mmHg y/o aumento de la presión arterial diastólica mayor de 15 mmHg, o presión media arterial pulmonar mayor de 20 mm Hg (Serres et al., 2007; Kellihan y Stepien, 2012; Jaffey et al., 2019; Reinero et al., 2020).

El origen de la hipertensión puede estar asociado a diversos factores. Puede deberse a un aumento en la resistencia vascular pulmonar que puede darse en casos de shunt con dirección izquierda-derecha o casos de enfermedad cardíaca izquierda. La hipertensión pulmonar postcapilar es común en casos de aumento de presión en la aurícula derecha como consecuencia de enfermedad cardíaca izquierda; esto sucede porque este aumento de presión en la aurícula izquierda va a conllevar a un aumento en la carga del ventrículo derecho y por lo tanto el ventrículo derecho va a crear una mayor presión sistólica. La hipertensión pulmonar postcapilar sostenida en el tiempo puede conllevar al desarrollo de vasoconstricción pulmonar arterial y enfermedad vascular pulmonar que conllevará a un aumento en la resistencia vascular pulmonar (Kellihan y Stepien, 2012; Guazzi y Naeije., 2017; Reinero et al., 2020).

Por otro lado, el aumento de la resistencia vascular pulmonar puede deberse a cambios estructurales en la vasculatura pulmonar por distintas causas. El aumento en la presión arterial pulmonar con aumento de la resistencia vascular pulmonar y sin aumento de presión en la aurícula izquierda se define como hipertensión pulmonar precapilar, que sucede en casos de enfermedad respiratoria crónica o tromboembolismos pulmonares (Reinero et al., 2020).

La hipertensión pulmonar en perros infectados por *D. immitis* se identifica siendo de origen precapilar, debida tanto a los efectos que tiene el propio parásito adulto en los vasos pulmonares como a los distintos mecanismos inmunológicos del hospedador. Los daños mecánicos producidos por el parásito producirán cambios anatómicos en la pared arterial, como el aumento de tamaño de las células endoteliales y desorientación de los ejes de disposición de estas (Venco y Venzoni, 2001). Estos cambios van a facilitar la llegada y entrada de células inflamatorias en los espacios perivasculares y la exposición del subendotelio favorece la activación plaquetaria, todos estos acontecimientos conllevan a la formación de endarteritis proliferativa la cual se caracteriza por el desarrollo de microvellosidades en la pared interna de la arteria, dándole un aspecto rugoso a la misma (Carretón et al., 2012). Como se ha descrito con anterioridad, todo ello va a conducir a la vasoconstricción de la vasculatura y a favorecer la aparición de tromboembolismos pulmonares (González-Miguel et al., 2015; Kramer et al., 2008; McCall et al., 2008b), lo que conllevará a un aumento en la resistencia vascular y presión en el sistema vascular pulmonar (Johnson et al., 1999; Pyle et al., 2004; Quinn and Williams, 2011a; Tai y Huang, 2013).

Aunque el diagnóstico definitivo de la hipertensión pulmonar es mediante el cateterismo cardiaco, tanto en medicina humana como en veterinaria (Kellihan y Stepien, 2010; Reiner et al., 2020), se trata de una técnica invasiva y que requiere anestesia; además, se trata de una técnica que no se encuentra fácilmente disponible. Por ello, el diagnóstico de hipertensión pulmonar se realiza mediante ecocardiografía, técnica que en la actualidad está al alcance de cualquier clínico. Mediante la ecocardiografía es posible valorar los cambios hemodinámicos y estructurales asociados a la presencia de hipertensión pulmonar, además de estimar la presión arterial pulmonar mediante el uso de Doppler. Varios estudios han demostrado que existe una alta correlación entre las presiones medidas mediante cateterismo y las medidas realizadas mediante ecocardiografía, por lo que se considera un método diagnóstico altamente fiable y eficaz (Arcasoy et al., 2003; Bacal et al., 2010; Visser et al., 2016; Augustine et al., 2018).

Además de estimar las presiones arteriales pulmonares sistólicas y diastólicas, mediante ecocardiografía podemos valorar la existencia de otros cambios asociados a la presencia de hipertensión pulmonar como la dilatación de ventrículo y/o atrio derechos, dilatación de arteria pulmonar principal y/o arterias pulmonares derecha e izquierda, hipertrofia

ventricular derecha, o existencia de regurgitación valvular tricúspidea y/o pulmonar (Johnson et al., 1999; Visser et al., 2016; Vezzosi et al., 2019; Reinero et al., 2020).

ESTRUCTURA VENTRICULAR DERECHA

El ventrículo derecho forma la parte craneal y derecha de la masa ventricular, de hecho, forma casi todo el borde craneal del corazón sin alcanzar la punta (formada por el ventrículo izquierdo). El ventrículo derecho tiene forma triangular y está formado por tres caras y una base. La base del ventrículo derecho está en contacto con el atrio derecho, los cuales se comunican a través del orificio atrioventricular derecho. La parte izquierda del ventrículo derecho se proyecta formando el cono arterioso del cual surge el tronco pulmonar. En el orificio atrioventricular derecho se encuentra la válvula tricúspide formada por tres cúspides, cuspis angularis, septalis y parietalis. La estructura ventricular derecha puede verse modificada por distintos factores tales como cambios de volumen o de presión (Vezzosi et al., 2018; Reinero et al 2020).

La principal función del ventrículo derecho es la de recibir la sangre venosa sistémica y bombearla hacia las arterias pulmonares en dirección a la circulación pulmonar. En condiciones normales, el ventrículo derecho se encuentra conectado a un sistema vascular pulmonar de baja resistencia y gran capacidad de distensión en comparación con la circulación sistémica (Lee, 1992). La función ventricular derecha depender de la contractilidad, precarga y poscarga, frecuencia y ritmo cardiacos, sincronía de la contracción (sincronicidad) y la interdependencia ventricular. El ventrículo derecho muestra una gran sensibilidad a los cambios agudos de la poscarga, como sucede en el tromboembolismo pulmonar, y no es capaz de adaptarse adecuadamente (Barnard y Alpert, 1987; Haddad et al., 2008; Tazar y Álvarez, 2012). Cuando la capacidad compensatoria del ventrículo derecho se ve sobrepasada, la presión pulmonar aumenta inicialmente durante el ejercicio para posteriormente aumentar también en reposo, provocando insuficiencia ventricular derecha (Guglin y Khan, 2010).

ESTRUCTURA DE LA VASCULATURA PULMONAR

La vasculatura pulmonar es un circuito de baja presión y resistencia, y de alta capacidad de almacenamiento de sangre. Las arterias pulmonares tienen una gran capacidad elástica y sus paredes son de gran distensibilidad. Están compuestas por una túnica íntima, una túnica media y una capa exterior llamada túnica adventicia. La túnica íntima, que es la que está en contacto con la luz vascular, está formada por una capa simple de células endoteliales, colágeno y algunos fibroblastos. La túnica media es más gruesa y se forma a partir de elastina, colágeno y células musculares lisas. La túnica adventicia está formada principalmente por colágeno (Kellihan y Stepien, 2012).

Cambios tales como engrosamiento concéntrico, aumento de la capa muscular de la túnica íntima, hipertrofia y fibrosis de la túnica media, son característicos en pacientes con hipertensión pulmonar. En casos severos, se pueden desarrollar también lesiones irregulares y sobrecrecimientos en forma de vellosidades en la íntima vascular, que invaden el lumen arterial del vaso. En ocasiones también podemos observar necrosis de la pared íntima vascular (Quinn y Williams, 2011a).

FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN PULMONAR

Para que se mantenga una correcta presión pulmonar existen diversos mecanismos que deben encontrarse en equilibrio y son los encargados de producir principalmente vasodilatación y/o vasoconstricción. Normalmente, cuando existe disfunción endotelial los agentes que mantienen esta hemostasis se alteran y, por tanto, se produce una alteración en la presión arterial pulmonar. Entre ellos se encuentran el tromboxano A₂, prostaciclina, óxido nítrico, endotelina, serotonina y angiotensina II. Otros factores como la hipoxia alveolar, los cambios en altitud, viscosidad de la sangre también pueden afectar a la resistencia de la vasculatura pulmonar (Poser y Guglielmini, 2016).

Hipoxia alveolar.

La hipoxia alveolar tiene un rol importante en el cambio de las presiones pulmonares. Principalmente, ocurre en respuesta a la vasoconstricción de los vasos pulmonares; gracias a este mecanismo, la sangre no oxigenada va a orientarse a zonas del pulmón con mejor ratio ventilación-perfusión. Esta primera respuesta es de gran ayuda durante cierto tiempo, pero de manera mantenida puede llegar a producir hipertensión pulmonar (West 2012, Poser y Guglielmini, 2016). Además, los canales de potasio, calcio y cloro se van a ver afectados por los cambios en la presión parcial de oxígeno, produciendo mayor vasoconstricción. Ésta va a ser más marcada en las arteriolas pulmonares de menor calibre, aumentando así la resistencia vascular pulmonar (Kellihan y Stepien 2010). También se ha descrito la producción de factores de crecimiento debidos a la hipoxia alveolar, como los factores de crecimiento derivados de las plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular, endotelina y serotonina, que se encuentran involucrados en los fenómenos de proliferación endotelial y remodelación vascular (Quinn y Williams, 2011b).

Control adrenérgico.

Gracias a la presencia de receptores adrenérgicos alfa en las arterias pulmonares, éstas son capaces de vasoconstruirse. La noradrenalina es una de las moléculas afines a estos receptores, y su estimulación excesiva puede conllevar a remodelación vascular pulmonar (Kellihan y Stepien, 2010). Por otro lado, la activación de los receptores adrenérgicos beta producirá vasodilatación y la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Óxido nítrico.

El óxido nítrico es un agente producido por las células endoteliales, de gran importancia en el mantenimiento de las bajas presiones del circuito pulmonar. Tras liberarse al torrente sanguíneo, actúa sobre las células musculares lisas activando la

enzima guanilato-ciclasa, lo que provocará un aumento de las concentraciones de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Esta molécula va a inhibir la liberación de calcio por parte del retículo endoplasmático, produciendo así vasodilatación. Además, también está involucrada en los mecanismos de inhibición plaquetaria y la remodelación de las células musculares lisas de la vasculatura pulmonar (Quinn y Williams, 2011b; Schermuly et al., 2011). En presencia de hipertensión arterial pulmonar, la biodisponibilidad de óxido nítrico se ve disminuida, produciéndose vasoconstricción, proliferación de la musculatura lisa vascular, inflamación en los vasos y trombosis (Lan et al., 2018).

Eicosanoides: prostaglandinas y tromboxano.

Otros de los mediadores implicados en el mantenimiento de las presiones vasculares pulmonares son las prostaglandinas y el tromboxano. Las primeras son sustancias que se producen en los pulmones, siendo la prostaglandina F2 alfa y la prostaglandina A2 las que producen vasoconstricción. Por otro lado, la prostaciclina y la prostaglandina E1 van a provocar vasodilatación y remodelación vascular, así como inhibición de la agregación plaquetaria (McLaughlin et al., 2009; Kellihan y Stepien, 2010). El tromboxano es un derivado de las prostaglandinas, el cual se sintetiza y se almacena en las plaquetas; está involucrado en los procesos de vasoconstricción y activación plaquetaria. En medicina humana, ha sido descrito que el desequilibrio existente entre prostaciclina-tromboxano favorece la vasoconstricción pulmonar arterial y los fenómenos de trombosis (Wells y Sleeper, 2008).

Endotelina 1 (ET-1)

La endotelina 1 (ET-1) es un potente vasoconstrictor que pertenece a una familia de tres isopéptidos llamadas endotelinas (Figura 15). Es producida principalmente por las células endoteliales, aunque otras células también pueden sintetizarla, como los miocitos cardiacos, las células glomerulares renales y algunos leucocitos (Luscher y Barton, 2000). La ET-1 es la isoforma más presente en el sistema cardiovascular (Masaki, 1998; Chester

y Yacoub, 2014). Existen distintos factores que influyen en una mayor síntesis de ET-1, como pueden ser la tensión cortante o tangencial (*shear stress*), hipoxia, oxidación de colesterol LDL, bajos niveles de estrógenos, otros agentes vasoconstrictores, factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de adhesión. En contraposición, el óxido nítrico, la prostaciclina y los estrógenos pueden reducir la cantidad de ET-1 que se libera (Galie et al., 2004; Chester y Yacoub, 2014).

La ET-1 produce vasoconstricción a nivel de la vasculatura pulmonar, tanto de las arterias como de las venas, incluso a muy bajas concentraciones. Además de este efecto vasoconstrictor, la ET-1 tiene efectos pro-mitogénicos sobre las células musculares lisas de la vasculatura pulmonar y también aumenta el crecimiento de la matriz en la pared de los vasos (McLaughlin et al., 2009). Estos efectos se ven incrementados o reforzados si además existe presencia de factores de crecimiento como el TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β 1) o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. La ET-1 también tiene un efecto de estimulación de la proliferación de los fibroblastos pulmonares, además de efectos cronótrópicos e inótrópicos positivos en el miocardio (Luscher y Barton, 2000; Seccia et al, 2003; Galie et al, 2004; Chester y Yacoub, 2014).

La ET-1 es especialmente abundante en los pulmones, lo que conlleva que una desregulación en la misma provoque un aumento en la resistencia pulmonar vascular y remodelación de la vasculatura pulmonar. De hecho, varios estudios han demostrado la alta presencia de ET-1 y preET-1 en las células de la musculatura arterial y en células endoteliales de la vasculatura pulmonar en pacientes con hipertensión arterial pulmonar (Giaid et al., 1993; Benza et al., 2015). Además, otros estudios han demostrado que los niveles de ET-1 están correlacionados con el aumento de la resistencia vascular pulmonar y, por tanto, con la severidad de los cambios estructurales de las arterias pulmonares (Bressollette et al., 2001). En medicina veterinaria, diversos estudios confirman que los niveles de ET-1 también se encuentran elevados en perros con hipertensión pulmonar y fallo cardiaco congestivo (Prosek et al., 2004; Uchide y Saida, 2005; Fukumoto et al., 2014).

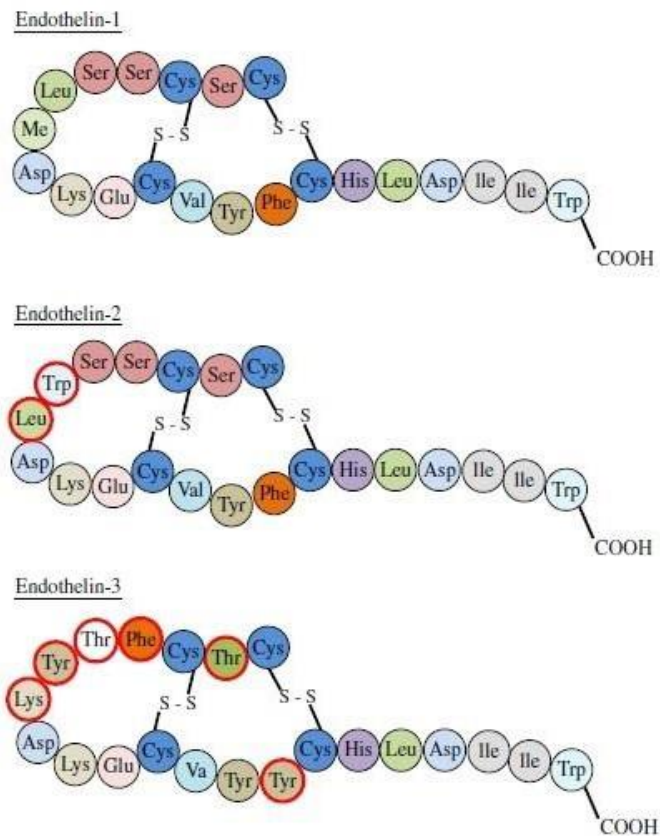


FIGURA 15: Estructura de las distintas isoformas de la familia de las endotelinas (Chester y Yacoub, 2014).

Angiotensina II.

El hígado sintetiza la angiotensina I, que es convertida a angiotensina II gracias a la acción de enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina II provoca vasoconstricción y remodelación vascular, además de tener efectos cardiopáticos y nefrotóxicos (Kellihan y Stepien, 2010). También se ha relacionado con la remodelación cardíaca y vascular, provocando fibrosis e hipertrofia, y se ha descrito que favorece la disfunción del endotelio vascular (Brilla et al., 1995; Ames et al., 2019).

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA HIPERTENSIÓN PULMONAR

La clasificación clínica de la hipertensión pulmonar en medicina veterinaria ha sido actualizada recientemente por (Reinero et al. 2020) En ella se define la hipertensión pulmonar como un aumento anormal de la presión en la vasculatura pulmonar y se determinan las distintas características ecocardiográficas para llegar a su diagnóstico. Éste está basado principalmente en la estimación del gradiente de presión en función de la velocidad de regurgitación tricúspidea, es decir, la presión pulmonar arterial sistólica. Además, también se tiene en cuenta la valoración clínica del paciente y la presencia de signos clínicos. Para esta clasificación, se han propuesto 6 grupos siguiendo las líneas de clasificación propuestas en medicina humana (Simonneau et al., 2013).

Grupo I. Hipertensión arterial pulmonar.

Este grupo engloba a los pacientes que presentan hipertensión arterial debida a enfermedad vascular pulmonar. Entre las posibles causas, se encuentra la hipertensión de origen idiopático, muy común en medicina humana y poco frecuente pero descrita en medicina veterinaria (Glaus et al., 2004; Moon et al., 2007; Ryan et al, 2012). Este tipo de hipertensión también puede estar causado por shunt cardiacos congénitos (Hogan et al., 2002; Kelliham y Stepien, 2010; Paradies et al., 2014), por vasculitis pulmonar (Pumarola et al., 1991), o por depósitos de sustancia amiloide en la vasculatura pulmonar (Faunt et al., 1998).

Grupo II. Hipertensión pulmonar debida a enfermedad cardiaca izquierda.

Con el desarrollo de enfermedad cardiaca del lado izquierdo del corazón se va a producir un aumento de presión del atrio izquierdo. Como consecuencia, también se produce un aumento en la presión en las venas pulmonares que, en casos avanzados, provoca el desarrollo de edema pulmonar cardiogénico, hipoxia e hipertensión arterial pulmonar. La enfermedad valvular mitral es la causa más común en este grupo (Visser et al., 2016; Rhinehart et al., 2017; Caivano et al., 2018) aunque también puede estar causado por otras patologías, como la cardiomiopatía dilatada o algunas enfermedades

congénitas, como la estenosis aortica o estenosis valvular mitral (Pyle et al., 2004; Pariaut et al., 2012).

Grupo III. Hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad respiratoria crónica, hipoxia o ambos.

En este grupo, las enfermedades asociadas con hipertensión pulmonar en personas es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la enfermedad intersticial (McLaughlin et al., 2009; Thenappan et al., 2018). En medicina veterinaria, este tipo de hipertensión se encuentra frecuentemente asociado a enfermedades respiratorias obstructivas crónicas, como colapso bronquial o traqueal (Mazzota et al. 2016; Jaffey et al., 2019), a enfermedades pulmonares primarias, como fibrosis pulmonar o neumonía (Schober y Baade., 2006; Okine et al., 2018) y a neoplasias pulmonares difusas (Jaffey et al., 2019; Roels et al., 2019).

Grupo IV. Embolismo, trombo o tromboembolismo pulmonar.

En medicina humana este grupo incluye los pacientes que padecen tromboembolismos u otras enfermedades obstructivas arteriales pulmonares, como los casos de angiosarcoma, estenosis arterial pulmonar congénita o la producida por parásitos en casos de hidatidosis (Thenappan et al., 2018; Norris et al., 2018). La hipertensión pulmonar en los perros clasificados en el grupo IV es debida principalmente a procesos tromboembólicos tanto agudos como crónicos, relacionados con enfermedades como la anemia hemolítica inmunomediada, hiperadrenocorticismo, neoplasias o sepsis (Kellihan y Stepien, 2010; Roldan-Alzate et al., 2014).

Grupo V. Enfermedades parasitarias.

En este grupo se incluyen los pacientes infectados por *Dirofilaria immitis* y *Angiostrongylus vasorum*. Dichas infecciones han sido relacionadas con el desarrollo de endarteritis, además de la formación de tromboembolismos pulmonares y enfermedad inflamatoria del parénquima pulmonar. En el actual consenso, estas dos enfermedades parasitarias no se incluyeron en las enfermedades infecciosas debido a que los

mecanismos patofisiológicos del desarrollo de hipertensión pulmonar son multifactoriales y diferentes (Nicolle et al., 2006; Kellihan et al., 2011; Borgeat et al., 2015; Visser et al., 2016; Serrano-Parreño et al., 2017).

Grupo VI. Mecanismos multifactoriales o desconocidos.

En medicina humana, algunos trastornos como desordenes mieloproliferativos, anemia, enfermedad tiroidea y otras enfermedades que no se encuentran bien clasificadas pueden producir hipertensión pulmonar mediante mecanismos no esclarecidos. (Simonneau et al., 2009; Simonneau et al., 2013). En medicina veterinaria, estos casos no son muy frecuentes pero pueden verse asociados a trastornos en los que la vasculatura pulmonar se ve comprimida, como es el caso de algunas neoplasias o en animales con policitemia vera (Perros et al., 2008; Quinn y Williams, 2011a).

CLASIFICACIÓN FUNCIONAL

Además de la anterior clasificación, basada principalmente en la etiología de la hipertensión pulmonar, existe otra de carácter funcional o práctico en el que se clasifica a los paciente en función de la gravedad de los signos clínicos. Dicha clasificación está basada en la utilizada en medicina humana y desarrollada en 1998, propuesta por la Organización Mundial de la Salud (WHO) (Hatano, 1975; Quinn y Williams, 2011a; Posser y Guglielmini, 2016).

Clase I.

En este grupo se incluyen los pacientes con diagnóstico de hipertensión pulmonar pero que no presentan intolerancia al ejercicio o signos de disnea, fatiga o síncope.

Clase II.

Estos pacientes no presentan síntomas al estar en reposo, pero al comenzar cierta actividad física puede aparecer signos como disnea, fatiga o dolor torácico.

Clase III.

Los pacientes incluidos en esta clase presentan limitaciones importantes en la actividad física, como disnea, fatiga, dolor torácico o síncope. Estos pacientes aún se encuentran bien en reposo.

Clase IV.

En este grupo englobamos a los pacientes en los que cualquier actividad física provoca síntomas severos. Permanecen asintomáticos o con síntomas leves durante el descanso, pero ya presentan insuficiencia cardíaca derecha secundaria a la hipertensión pulmonar.

SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos pueden ser variados y, en muchas ocasiones, relacionados con la causa subyacente de la hipertensión pulmonar (Fleming y Ettinger, 2006; Reiner et al., 2020).

La taquipnea, disnea y la tos son síntomas muy frecuentes en estos pacientes (Kellum y Stepien, 2007; Campbell, 2007; Kelliher et al., 2015). Cabe añadir que la tos suele verse agravada en casos de hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad respiratoria (Johnson et al., 1999), siendo posible, además, apreciar ruidos respiratorios aumentados, crepitaciones, cianosis o hipoxia (Campbell., 2007; Poser y Guglielmini, 2016). La intolerancia al ejercicio también es uno de los signos frecuentemente encontrados en pacientes con hipertensión pulmonar (Kellum y Stepien, 2008; Reiner et al., 2020). En algunos casos, durante el ejercicio, el flujo pulmonar puede ser insuficiente y pueden producirse síncope (Johnson et al., 1999).

En casos avanzados en los cuales el corazón se encuentra afectado, o bien si la causa subyacente es una enfermedad cardíaca de lado izquierdo (Pyle et al., 2004; Schober y Baade, 2006), podremos apreciar soplos cardíacos sistólicos en la válvula mitral, tricúspide o ambas. Además, estudios recientes sugieren que la intensidad del soplo tricúspideo se relaciona con la gravedad de la hipertensión pulmonar (Ohad et al., 2013).

También se pueden auscultar soplos cardiacos diastólicos en presencia de insuficiencia valvular pulmonar (Quinn y Williams, 2011b; Reinero et al., 2020).

Se pueden presentar signos de fallo cardiaco congestivo derecho, como ascitis, organomegalia abdominal, distensión o pulso yugular o edema periférico y/o síncope (Pyle et al., 2004; Campbell et al., 2007; Poser y Guglielmini, 2016). Los signos clínicos suelen ser progresivos hasta desembocar en cianosis, debilidad, letargia o distrés respiratorio grave, lo que suele ser la principal causa de muerte. También se pueden apreciar síntomas sistémicos como vómitos, fiebre o letargia (Johnson et al., 1999).

BIOMARCADORES SEROLÓGICOS

Los biomarcadores serológicos son de gran ayuda en el estudio de las patologías que cursan con hipertensión pulmonar, tanto para la valoración del estado del paciente como para la monitorización del tratamiento y pronóstico del mismo (Smith et al., 2015). Entre ellos, están las troponinas cardiacas, que son proteínas que se liberan al torrente sanguíneo cuando existe daño miocárdico (Wells y Sleeper, 2008). Presentan una elevada sensibilidad y son de gran ayuda a la hora de valorar la severidad de la enfermedad cardiaca y el pronóstico del paciente, tanto en medicina humana como veterinaria (Galvani et al., 1997; Fonfara et al., 2010). Su uso está extendido en medicina humana, pero únicamente un estudio ha confirmado que los perros que sufren hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad valvular mitral presentan niveles aumentados de este biomarcador (Guglielmini et al., 2010). Asimismo, también se han descrito elevaciones en perros infectados por *D. immitis* (Carretón et al., 2011; Carretón et al., 2012; Carretón et al., 2014).

Otro biomarcador que puede ser de gran utilidad es el péptido natriurético NT-pro-BNP, el cual se libera a circulación en respuesta a un aumento de la tensión del miocardio. En medicina veterinaria es de gran utilidad para ayudar a discernir entre problema cardiaco o respiratorio en pacientes con disnea (Boswood et al., 2008; Oyama, 2015). En medicina humana, su utilidad está sobradamente probada para ayudar en el diagnóstico y determinar la gravedad de la hipertensión pulmonar (Souza et al., 2007; Ten Kate et al., 2015). En medicina veterinaria, en cambio, apenas existen estudios que evalúen la utilidad de este biomarcador en pacientes que padecen hipertensión pulmonar, pero los resultados que se han obtenido son prometedores (Atkinson et al., 2009; Quinn y Williams, 2011b;

Kellihan et al., 2011). También se han descrito elevaciones de NT-proBNP en perros con dirofilariosis cardiopulmonar (Carretón et al., 2014). Sin embargo, los valores de este biomarcador pueden estar aumentados en caso de sobrecarga de ventrículo derecho sin presencia de hipertensión pulmonar, por lo que son necesarios más estudios para determinar la utilidad del NT-proBNP para ayudar en el diagnóstico de la hipertensión pulmonar (Hori et al., 2008).

Por último, cabe añadir la utilidad de la medición del Dímero-D, producto de degradación de la fibrina. Es un biomarcador útil para ayudar a detectar la formación de tromboembolismos pulmonares, ya que sus niveles se elevan en sangre desde una hora tras la formación del trombo, pudiendo persistir elevado en sangre hasta aproximadamente 7 días (Meissner et al., 2000). Aunque no está estudiado aún, podría ser útil en el estudio de pacientes con hipertensión pulmonar secundaria a fenómenos tromboembólicos, como es el caso de la dirofilariosis, tanto para contribuir a su diagnóstico como para valorar tratamiento y monitorización del mismo (Nelson, 2005; Carretón et al., 2014).

ELECTROCARDIOGRAFÍA

El electrocardiograma es una técnica complementaria y de apoyo en el diagnóstico de la hipertensión pulmonar debido a que podemos encontrar hallazgos que sugieran la presencia de esta enfermedad (Campbell et al., 2017). En la gran mayoría de los casos el electrocardiograma no presenta cambios, pero en el caso de encontrar alteraciones las más comunes son consecuencia de la presencia de cardiomegalia de las cámaras cardíacas derechas. Así, es posible observar dextroeje y presencia de onda p *pulmonale* (Lewczuk et al., 2004; Poser y Guglielmini, 2016). Además, en casos graves, podemos apreciar la aparición de arritmias tanto supraventriculares como ventriculares, sobre todo en pacientes que presentan una enfermedad cardíaca izquierda subyacente o asociada al aumento de poscarga que sufre el ventrículo derecho, o bien por fallo en la perfusión cardíaca (Demerouti y Manginas, 2013). Si esto ocurriese, se puede presentar fibrilación atrial, taquicardia supraventricular y ventricular, complejos ventriculares prematuros y bloqueo auriculoventricular de primer grado (Pyle et al., 2004).

RADIOGRAFÍA TORÁCICA

El uso de la radiografía torácica es de gran utilidad en el estudio de la hipertensión pulmonar, ya que permite obtener información sobre las patologías subyacentes o asociadas a esta condición. Sin embargo, no existen cambios patognomónicos que permitan el diagnóstico radiológico de la hipertensión pulmonar, por lo que la radiografía torácica se considera una técnica complementaria (Pyle et al., 1981; Quinn y Williams, 2011b; Poser y Guglielmini, 2016).

Entre los hallazgos que es posible apreciar en proyecciones laterolaterales, se encuentra la alteración de la silueta cardiaca por cardiomegalia de cámaras derechas, con aumento del contacto cardio-esternal o desplazamiento dorsal de la tráquea craneal hacia la carina. En proyecciones dorsoventrales o ventrodorsales es posible observar la silueta cardiaca con forma de "D" invertida. Además, es posible observar dilatación de las arterias pulmonares, pudiendo tener aspecto tortuoso (Johnson, 1999; Kellum et al., 2007; Quinn y Williams, 2011b).

En pacientes con enfermedad valvular degenerativa mitral en los que se ha desarrollado hipertensión pulmonar, es posible detectar un aumento de las cámaras cardíacas izquierdas, con aumento del ángulo de la bifurcación traqueal, dilatación de venas pulmonares y, en presencia de insuficiencia cardíaca congestiva, edema intersticial-alveolar (Diana et al., 2009; Le Roux et al., 2012).

En casos de hipertensión pulmonar asociada a problemas respiratorios, la radiografía torácica puede ser útil para detectar signos compatibles con estas enfermedades, como pueden ser bronquitis crónica, fibrosis pulmonar y/o colapso traqueal y/o bronquial. (Johnson, 1999; Steele y Henik, 2004).

ECOCARDIOGRAFÍA

La ecocardiografía es el método empleado en medicina humana y veterinaria para el diagnóstico definitivo de la hipertensión pulmonar. Aunque la cateterización del corazón derecho es el método más objetivo y directo, esta técnica no resulta práctica ya que requiere anestesia y se trata de una técnica intervencionista (Galiè et al., 2009; Kellihan y Stepien, 2012; Reiner et al., 2020). Por ello, el uso de la ecocardiografía permite estimar de manera fiable las presiones arteriales pulmonares mediante Doppler

espectral siendo, además, una técnica no invasiva y accesible a todos los médicos tanto de medicina humana como veterinaria (Visser et al., 2016; Poser y Guglielmini, 2016; Reinero et al., 2020).

El examen bidimensional (2D) permite valorar cambios en el ventrículo derecho o en la arteria pulmonar que sugieren aumento de presión, como aplanamiento del septo interventricular, dilatación de aurícula derecha o hipertrofia del ventrículo derecho. Estos cambios son más evidentes en casos de hipertensión pulmonar moderada o severa (Johnson et al., 1999; Pyle et al., 2004; Glaus et al., 2004; Nyland et al., 2004). En casos de hipertensión pulmonar severa está descrita la presencia de hipertrofia concéntrica del ventrículo derecho (Boon, 2012).

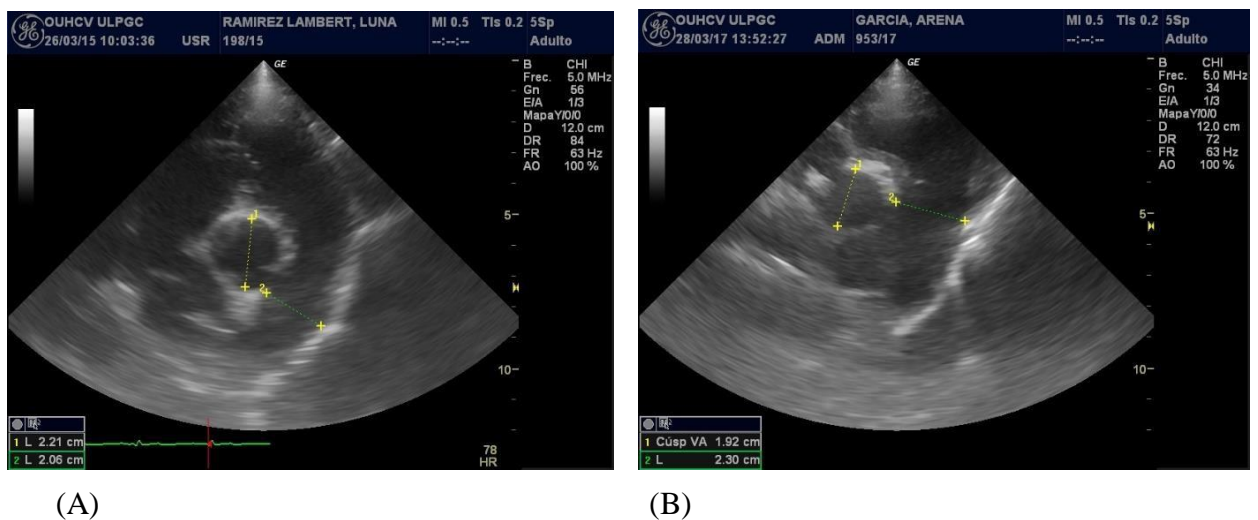


FIGURA 16: Imagen ecocardiográfica por ventana paraesternal derecha nivel de base cardiaca, mediante la cual se realiza la medición del ratio aorta: arteria pulmonar, siendo en este caso normal en la imagen A y estando patológicamente aumentado en la imagen B.

Para valorar el espesor del ventrículo derecho se deben hacer las mediciones en diástole mediante el uso del modo bidimensional 2D, o bien mediante el modo monodimensional o modo-M. Para ello se emplea como referencia el ventrículo izquierdo, ya que el grosor

del ventrículo derecho de un perro con hipertensión pulmonar será igual o superior al grosor de la pared libre del ventrículo izquierdo (Nyland et al., 2004).

Mediante el modo bidimensional también se puede medir el ratio entre el diámetro de la arteria pulmonar y el diámetro de la aorta, mediante un corte paraesternal derecho en eje corto, a nivel de la base cardiaca. Esta relación debe ser menor de 1, por lo que valores superiores indican dilatación de la arteria pulmonar y se consideran indicativos de hipertensión pulmonar (Figura 16) (Serres et al., 2007; Kellihan y Stepien, 2010; Boon, 2012; Tai y Huang, 2013; Poser y Guglielmini, 2016; Reiner et al., 2020).

El índice de distensibilidad de la arteria pulmonar derecha, medido en modo-M, también permite detectar y valorar la gravedad de la hipertensión pulmonar. Esta medición se lleva a cabo mediante un acceso paraesternal derecho de cuatro cámaras, visualizando la arteria y venas pulmonares derechas y colocando el cursor del modo-M. Esto permitirá medir los diámetros de la arteria en sístole y en diástole, pudiendo calcular una relación entre estas dos medidas aplicando la fórmula matemática (diámetro sistólico – diámetro diastólico / diámetro sistólico). Valores por debajo de 0,29 son altamente indicativos de hipertensión pulmonar moderada/severa incluso en ausencia de regurgitación tricúspidea. (Venco et al., 2014; Visser et al., 2016; Reiner et al., 2020).

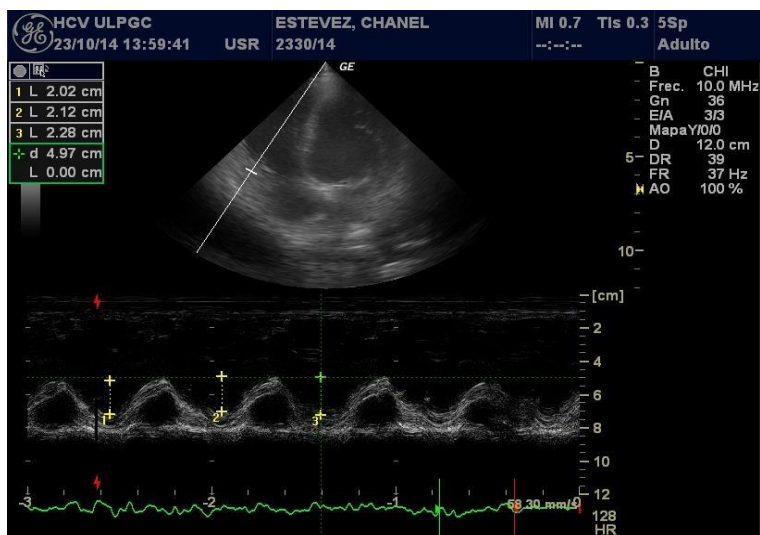
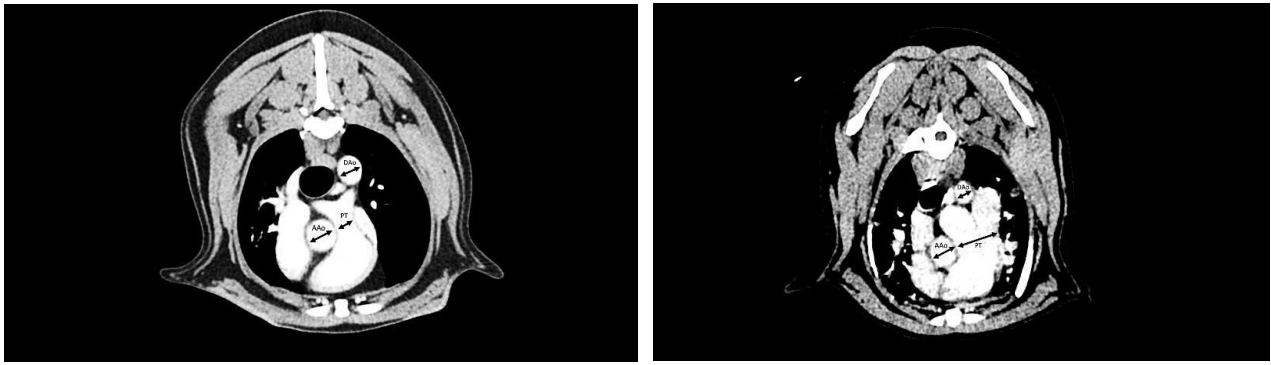


FIGURA 17: Imagen ecocardiográfica tomada mediante acceso por ventana paraesternal izquierda en corta apical de cuatro cámaras, en la que se observa la medición del TAPSE empleando el modo M.

El movimiento sistólico del anillo tricúspideo (TAPSE) es otro índice que se mide en modo-M. Fue recientemente desarrollado en medicina humana para evaluar la función sistólica del ventrículo derecho (Pariat et al., 2012) y posteriormente evaluado en medicina veterinaria. El TAPSE permite valorar el desplazamiento lateral del anillo tricúspideo mediante un corte apical de cuatro cámaras accediendo a través de una ventana paraesternal izquierda (Figura 17). Varios estudios han demostrado que este índice disminuye en pacientes con hipertensión pulmonar y que se relaciona con una disminución en la función sistólica del ventrículo derecho (Pariat et al., 2012). Esto permite emplear el TAPSE para aumentar o reducir las sospechas de hipertensión pulmonar en perros (Feldhütter et al., 2021).

TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTARIZADA

La tomografía axial computarizada se ha convertido en una técnica cada vez más presente en la clínica veterinaria. Se presenta como una prueba de diagnóstico por imagen de alta sensibilidad a la hora de valorar cambios en la vasculatura pulmonar, parénquima pulmonar, detectar tromboembolismos pulmonares y evaluar otras causas asociadas a la presencia de hipertensión pulmonar. En varios estudios se ha demostrado que un aumento en el ratio tronco pulmonar: aorta por encima de 1,4 es altamente sugerente de hipertensión pulmonar en el perro, siendo además estos valores comparables a los obtenidos mediante ecocardiografía (Granger et al., 2016; Sutherland-Smith et al., 2018) (Figura 18). Además, permite valorar otras alteraciones relacionadas con la presencia de hipertensión pulmonar, como el aumento de cámaras cardíacas derechas, la disminución en el ratio entre la vena pulmonar y la arteria pulmonar, o el aumento en el ratio ventrículo derecho: ventrículo izquierdo (Roels et al., 2019; Roels et al., 2021).



(A)

(B)

FIGURA 18: Imagen de estudio de tórax realizada mediante tomografía axial computarizada en ventana de tejido blando, en el que se muestran las medidas de diámetro de la aorta ascendente y aorta descendente junto con el diámetro del tronco pulmonar en un paciente sin hipertensión pulmonar (A) y en un paciente con hipertensión pulmonar (B).

TRATAMIENTO

Una vez resuelta y/o tratada la causa subyacente de la hipertensión pulmonar, es posible comenzar con tratamientos específicos con el objetivo de reducir la presión arterial pulmonar y por tanto la poscarga del ventrículo derecho, para lograr una mejoría de los signos clínicos (Reinero et al., 2020). Además, los pacientes con hipertensión pulmonar a menudo requieren tratamiento de apoyo para mejorar su estado general, así como terapias adicionales basadas en la causa subyacente de la hipertensión pulmonar.

Análogos de prostaciclina.

La prostaciclina es un vasodilatador e inhibidor plaquetario conocido y también tiene efectos antiproliferativos (Kitabatake et al., 1983; McLaughlin et al., 2009). Los análogos de la prostaciclina empleados en medicina humana incluyen epoprostenol, treprostinil e iloprost, mejorando los síntomas y la supervivencia. Se han estudiado de manera experimental en el tratamiento de la hipertensión pulmonar canina, mejorando el gasto

cardíaco, la vasodilatación y el rendimiento cardíaco (Zwissler et al., 1995; Kerbaul et al., 2007). Sin embargo, su elevado precio hace que no sea posible administrarlos a pacientes veterinarios.

Antagonistas de la endotelina.

Como se ha comentado anteriormente, la endotelina-1 (ET-1) provoca vasoconstricción, proliferación de músculo liso y remodelación vascular, por lo que el empleo de antagonistas puede ser beneficioso. Los antagonistas de la ET-1 más comunes son el bosentán, sitaxsentán y ambrisentán. Estos fármacos mejoran la intolerancia al ejercicio, la presión arterial pulmonar e incluso la resistencia vascular pulmonar en seres humanos (McLaughlin et al., 2009). En medicina veterinaria, se ha evaluado el bosentán en modelos experimentales. Su uso fue efectivo, disminuyendo la remodelación vascular, mejorando la función miocárdica y disminuyendo la remodelación ventricular (Kim et al., 2000; Mishima et al., 2000). Igualmente, su elevado precio no ha permitido desarrollar más estudios ni emplearlo en pacientes veterinarios.

Inhibidores de la fosfodiesterasa 5.

El principal tratamiento frente a la hipertensión pulmonar en medicina veterinaria está basado en el uso de inhibidores de la fosfodiesterasa-5 (PDE-5) entre los que se encuentran el sildenafil, tadalafil y vardenafil. Son fármacos que promueven la vasodilatación arterial pulmonar al aumentar los niveles de cGMP (Bach et al., 2006; Brown et al., 2010; Kelliham et al., 2015; Murphy et al., 2017). Distintos estudios comprobaron que existe una mejoría en los signos clínicos, calidad de vida y mejores resultados ecocardiográficos en los pacientes tratados. Normalmente el tratamiento suele comenzarse con la administración de sildenafil cada 8-12 horas a una dosis de 1 a 3 mg/kg. Recientemente el tadalafil ha resultado ser una alternativa al sildenafil al tener una acción más prolongada con respecto al sildenafil pudiendo administrarse cada 24 horas, aunque aún hacen falta estudios para evaluar su utilidad real (Jaffey et al., 2019; Reinero et al., 2020).

Otros inhibidores de la fosfodiesterasa.

La teofilina es un inhibidor débil no selectivo de la fosfodiesterasa, y afecta a las PDE-3, PDE-4 y PDE-5. Este medicamento se usa comúnmente por su capacidad para relajar el músculo liso en pacientes con enfermedad bronquial. En medicina humana, se ha demostrado que mejora la hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad pulmonar obstructiva crónica y puede ser útil en perros con hipertensión pulmonar de clase clínica III. En general, la teofilina no se considera un agente único efectivo para tratar la hipertensión pulmonar (Kellihan y Stepien, 2010).

El pimobendan y levosimendan son fármacos de doble mecanismo. Ejercen efectos inotrópicos positivos asociados con la sensibilización al calcio, así como efectos vasodilatadores mediados por la inhibición de la PDE-3. Clínicamente, se ha demostrado que pimobendan mejora la hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad degenerativa de la válvula mitral (clase clínica II) (Atkinson et al., 2009; Kellihan y Stepien, 2012), aunque actualmente no se considera útil en el tratamiento de otras clases clínicas de hipertensión pulmonar (Kellihan y Stepien, 2010).

PRONÓSTICO

El pronóstico de los perros con hipertensión pulmonar varía y, a menudo, depende de la causa subyacente. Antes de la disponibilidad del sildenafil, los perros con hipertensión pulmonar tenían pronósticos graves, y muchos sobrevivían solo unos días tras el diagnóstico (Johnson et al., 1999). Con la introducción de la terapia con sildenafil, el promedio de supervivencia aumentó a 91 días, y algunos pacientes sobreviven casi dos años (Bach et al., 2006). Los factores pronósticos negativos incluyen estar en una clase funcional avanzada, tener una presión alta en la aurícula derecha, disfunción ventricular derecha grave y valores elevados de NT-proBNP (Serres et al., 2007; Brown et al., 2010).

ARTÍCULOS

1. Matos, J.I., Falcón-Cordón, Y., García-Rodríguez, S.N., Costa-Rodríguez, N., Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E. Evaluation of pulmonary hypertension in dogs with heartworm disease using the computed tomographic pulmonary trunk to aorta diameter ratio. *Animals*. 2022, 12, 2441.
2. Falcón-Cordón, Y., Tvarijonavičiute, A., Montoya-Alonso, J.A., Muñoz-Prieto, A., Caro-Vadillo, A., Carretón, E. Evaluation of acute phase proteins, adiponectin and endothelin-1 to determine vascular damage in dogs with heartworm disease (*Dirofilaria immitis*); before and after adulticide treatment. *Vet. Parasitol.* 2022, 309, 1-6.
3. Falcón-Cordón, Y.; Montoya-Alonso, J.A.; Caro-Vadillo, A.; Matos, J.I.; Carretón, E. Persistence of pulmonary endarteritis in canine heartworm infection 10 months after the eradication of adult parasites of *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* 2019, 273, 1–4.

Article

Evaluation of Pulmonary Hypertension in Dogs with Heartworm Disease Using the Computed Tomographic Pulmonary Trunk to Aorta Diameter Ratio

Jorge Isidoro Matos , Yaiza Falcón-Cordón, Sara Nieves García-Rodríguez, Noelia Costa-Rodríguez , José Alberto Montoya-Alonso *  and Elena Carretón 

Internal Medicine, Veterinary Medicine and Therapeutic Research Group, Faculty of Veterinary Medicine, Research Institute of Biomedical and Health Sciences (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

* Correspondence: alberto.montoya@ulpgc.es

Simple Summary: Pulmonary hypertension (PH) is a consequence of proliferative pulmonary endoarteritis caused by the parasite *Dirofilaria immitis* (heartworm). To date, the diagnosis is carried out through echocardiographic determinations, with the right pulmonary artery distensibility (RPAD) index being the gold standard for diagnosis of PH caused by heartworm. Given the high importance and frequency of PH in dogs, the study of the pulmonary trunk to aorta ratio (PT:Ao) determined by computed tomography (CT) was proposed to assess its usefulness in the diagnosis of PH, compared to the gold standard method. The results show that the PT:Ao ratio was reliable for detecting and staging the severity of moderate to severe PH in dogs with heartworm.



Citation: Matos, J.I.; Falcón-Cordón, Y.; García-Rodríguez, S.N.; Costa-Rodríguez, N.; Montoya-Alonso, J.A.; Carretón, E. Evaluation of Pulmonary Hypertension in Dogs with Heartworm Disease Using the Computed Tomographic Pulmonary Trunk to Aorta Diameter Ratio. *Animals* **2022**, *12*, 2441. <https://doi.org/10.3390/ani12182441>

Academic Editor: Robert Li

Received: 15 August 2022

Accepted: 9 September 2022

Published: 16 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: *Dirofilaria immitis* causes proliferative pulmonary endoarteritis that leads to the appearance of chronic precapillary pulmonary hypertension (PH) in dogs. Pulmonary trunk to aorta ratio (PT:Ao ratio) obtained by computed tomography (CT) was studied and the quantitative measure of the diameters of the pulmonary trunk (PT), the descending thoracic aorta (DAo) and ascending thoracic aorta (AAo) were evaluated for the determination of the presence of moderate to severe PH in 59 dogs. The diagnosis of PH was echocardiographically determined, based on the determination of the right pulmonary artery distensibility (RPAD) index (<29.5%), and compared with other parameters for estimating PH. The results showed a very high concordance: 0.976 (*p*-value 0.000) between the two CT methods (PT:DAo and PT:AAo) with an excellent intraclass correlation coefficient > 0.95. Moreover, cut-off values of ≥ 1.111 for PT:DAo, and ≥ 1.057 for PT:AAo were determined for dogs with an RPAD index < 29.5%, which suggests a cut-off value between healthy dogs and the presence of PH. As has been previously published, The PT:Ao ratios did not determine the presence of mild PH, so the measurements cannot be considered useful for the early diagnosis of PH in dogs with heartworm.

Keywords: heartworm disease; *Dirofilaria immitis*; pulmonary hypertension; computed tomography; pulmonary trunk to aorta ratio; dogs; animal diseases



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Canine heartworm disease (HWD) is a severe worldwide vector-borne disease caused by *Dirofilaria immitis*, which mainly affects the pulmonary arteries and the lung parenchyma. The presence of adult parasites in direct contact with the vasculature produces proliferative endoarteritis that chronically leads to the appearance of precapillary pulmonary hypertension (PH), a frequent and serious phenomenon in HWD [1,2]. In addition, the sudden death of the parasites produces pulmonary thromboembolisms that worsen the vascular damage and presence of PH [3,4]. It has been hypothesized that the determination of PH may be highly useful to determine the severity of pulmonary endoarteritis [3,5]. Moreover

heartworm-infected dogs with PH show important clinical signs, including cough, exercise intolerance, respiratory distress, and syncope, while right-sided congestive heart failure may occur in advanced stages. Consequently, the objective determination of PH is important [4].

Catheterization of the right side of the heart is considered the gold standard for measuring pulmonary artery pressure and to definitively diagnose PH [6]. However, it involves a high risk and expensive costs, not affordable in veterinary medicine. Thus, diagnostic imaging techniques, specifically echocardiography, provide the most accurate, non-invasive, available, and cost-effective estimate of pulmonary pressure in dogs [7]. Although echocardiography is the method of choice to estimate the presence or absence of PH, in veterinary practice, helical thoracic computed tomography (CT) is becoming more widely available and used more frequently for the evaluation of cardiorespiratory diseases in small animals [8]. Moreover, recent studies have shown the usefulness of CT in the diagnosis of PH in the canine species [9–11]; although, to date, there are no published specific indicators of PH in dogs with heartworm.

The use of angiography through CT and the quantitative measure of the diameters of the pulmonary trunk (PT) and the aorta (Ao), translated into the PT:Ao ratio, constitutes a clinical parameter routinely used to aid in the diagnosis of PH in humans, which has also demonstrated an objective value in veterinary medicine in comparison with echocardiography [9–14]. The recent use of the PT:Ao ratio has shown that dogs with moderate and severe PH had significantly higher PT:Ao ratios than healthy dogs and dogs with mild PH in a study carried out with dogs with idiopathic pulmonary fibrosis [11]. Furthermore, there are two different measurement methods of the PT:Ao ratio, which are based on the size of the descending aorta (DAo) or the ascending aorta (AAo). This hinders the standardization of the PT:Ao ratio in CT and, to the authors knowledge, there are no clinical studies comparing these two techniques. Therefore, the aim of this study was to determine the usefulness of the CT through the study of the PT:Ao ratio to detect presence and severity of PH in dogs with HWD, as well as to determine the concordance between PT:DAo and PT:AAo ratios.

2. Materials and Methods

2.1. Studied Animals

A cross-sectional and prospective study was developed using 59 dogs referred to the Cardiorespiratory Service of the Veterinary Teaching Hospital of the University of Las Palmas de Gran Canaria (Canary Islands, Spain), between September 2020 and July 2021. All dogs were tested for the presence of circulating *D. immitis* antigens by using a commercial immunochromatographic test kit (Urano test *Dirofilaria*[®], Urano Vet SL, Barcelona, Spain). Dogs were further divided into groups: 30 (50.8%) healthy dogs and 29 (49.2%) heartworm-infected dogs. Inclusion criteria for healthy dogs were: a negative result to the antigen test, no record of previous disease, and absence of signs of cardiorespiratory disease based on anamnesis, physical examination, two-view thoracic radiographs and echocardiographic examination. Inclusion criteria for dogs with HWD were: the presence of *D. immitis* circulating antigens and never having received treatment for HWD. The study was performed before starting the adulticide treatment; however, nine heartworm-infected dogs were previously treated with pimobendane, benazepril, furosemide, torsemide, spironolactone, prednisolone, budesonide, sildenafil or doxycycline, after verifying echocardiographically that the PH persisted unchanged once the animals were stabilized [4]. A complete record was kept for each animal, including identification (age, sex, and breed), clinical history, and demographic data. The dog owners were informed and consented to participate in the study.

2.2. Echocardiography

Standardized transthoracic echocardiograms were performed in right and left lateral recumbent positions using ultrasound equipment (Vivid Iq, General Electric, Boston, USA) with spectral probes, color Doppler and multi-frequency (2.5–10 MHz). The dogs

were conscious, without use of anesthesia and under electrocardiographic control throughout the test. For each measurement, six continuous cardiac cycles were recorded. All echocardiographic recordings were performed by a single cardiologist.

The diagnosis of the presence and severity of PH was echocardiographically determined, based on the determination of the right pulmonary artery distensibility index (RPAD index). Moderate to severe PH was considered when the RPAD index was $<29.5\%$, as previously described and validated in dogs with HWD [5,15,16]. Complete echocardiograms were performed in all cases, and included the peak of tricuspid regurgitation velocity to obtain the tricuspid regurgitation pressure gradient (TRPG), the relationship between the diameter of the main pulmonary artery and the diameter of the aortic root (MPA: Ao), the right ventricular outflow tract velocity, and the relationship between acceleration times (AT) and ejection times (ET) using the AT:ET ratio. Furthermore, worm load (classified from 1—low burden, to 4—high burden) was assessed by the presence of visible worms in the pulmonary arteries and the right heart chambers using the guidelines previously described [17].

2.3. Computed Tomography

CT examinations were performed by a 16-slice multi-detector row scanner (Toshiba Astelion, Toshiba Medical System, Madrid, Spain). In all cases, a standard anesthesia protocol was used, based on propofol (up to 4 mg/kg) administered after alfaxalone IM (1 mg/kg) and butorphanol IM (0.2 mg/kg). Subsequently, isoflurane and 100% FiO₂ were maintained with continuous monitoring of vital parameters (oxygen saturation, blood pressure, temperature, heart rate, etc.). Dogs were kept in sternal recumbency and postcontrast positive-pressure CT scans were performed after administration of 2.0 ml/kg of iobitridol (300 mgI/ml) through a catheter placed in the left or right cephalic vein. The study protocol included hyperventilation-induced apnea and positive pressure ventilation at 10 mm Hg. Helical cross-sectional images were acquired using a 0.625 slice thickness at 120 kVp, 200 Ma, 1 s tube rotation time, 512 × 512 array size, and 0.9375: 1 pitch. To obtain optimal CT images and better assess mediastinal structures, a soft tissue window setting was used by adjusting the window widths (WW = 360) and window levels (WL = 60).

For the evaluation of the PT:Ao ratio, two different measurements were made to obtain the relationship between the PT and the ascending (PT:AAo) and descending (PT:DAo) portions of the aorta. The images of the soft tissue algorithm were used and the ratios were determined following previously established protocols [9,10]. To this aim, the cross-sectional image in which the diameter of the PT was widest was selected. The measurement of the PT was performed by tracing a transverse axis over the widest diameter of the PT, ventrally to the widening and branching in the left and right pulmonary arteries. Furthermore, the dimensions of the short axis of the DAo and the AAo were also measured. The diameters of DAo, AAo and PT were measured on the same image, so that all structures were in the same phase of the cardiac cycle. In all cases, the inner diameters of the vascular lumen was measured, not considering the vascular walls (Figure 1). The DICOM CT images were transferred to a computer and analyzed using an imaging software program (Osirix™ v. 5.6, Geneva, Switzerland). The interobserver variability of PT:Ao image acquisition and PT:DAo/PT:AAo measurement was evaluated separately in 10 dogs by two different cardiologists trained and supervised by a radiology consultant, obtaining comparable values. Measurements for all dogs were performed by a single cardiologist.

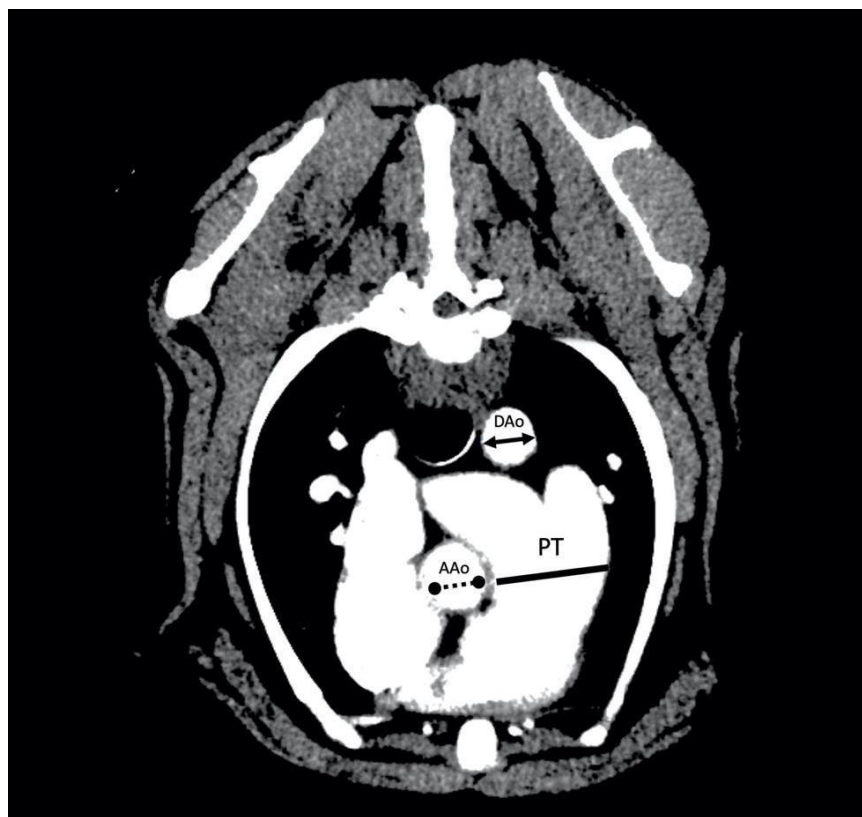


Figure 1. Arterial-phase postcontrast transverse thoracic angiogram CT image at the level of the pulmonary trunk (PT) in a 16 kg male beagle with an RPAD index of 17%. The PT to aorta ratio measurement technique consists of the measure of the maximum diameter of the PT measured immediately ventral to the bifurcation into left and right pulmonary arteries (solid line) and the measure of the short axis of the diameter of the descending part of the aorta (DAo) (solid line double arrow) or the short axis of the diameter of the ascending part of the aorta (AAo) (no solid line double arrow). The PT:DAo ratio of this dog was 1.72 and the PT:AAo ratio was 1.47.

2.4. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using commercially available software (BM SPSS Statistics 25.0, New York, NY, USA). Continuous variables were reported as the median and standard deviation and categorical data as proportions. The Shapiro–Wilk test was applied to evaluate the normality of the distribution of continuous variables. Differences in continuous variables between groups were determined by ANOVA, Kruskal–Wallis and Chi² test analyses. When significant differences were identified, post hoc pairwise comparisons were made using the Pearson P test with Bonferroni corrections (for non-normal data). The intraclass correlation coefficient was calculated to measure the concordance between PT:DAo and PT:AAo. The results of the statistical procedures were also graphed by scatter plot. A simple linear regression was performed between the RPAD index values and the other variables studied to identify the best one-variable model, and a regression analysis of all subsets was performed with a maximum improvement of R² as a selection criterion. Receiver operator characteristic curve (ROC) analyses were performed to determine the optimal cut-off values for the prediction of the RPAD index being < 29.5% (moderate or severe hypertension). For all results, $p < 0.01$ was considered statistically significant.

3. Results

A total of 59 animals (31 males and 28 females) of 22 different breeds were analyzed, with a mean age of 8.72 years and a mean weight of 18.44 kg. Based on the RPAD index, all healthy animals (Group A, $n = 30$) were normotensive. Dogs with heartworm were further

divided into two groups: normotensive dogs (Group B, $n = 11$) and dogs with PH (Group C, $n = 18$). There were no statistically significant differences in sex, age, and weight between the three groups studied (Table 1). Right-sided congestive heart failure was only present in dogs from Group C. Moreover, the presence of respiratory symptoms was significantly increased in dogs from Group C. Obviously no parasites were found in the control dogs (Group A). Burdens were similar in the dogs with heartworm (Groups B and C), being slightly higher in dogs from Group C.

Table 1. Clinical characteristics and parameters of the studied dogs ($n = 59$).

Clinical Parameters	All Dogs ($n = 59$)	Control ($n = 30$)	RPADi $\geq 29.5\%$ ($n = 11$)	RPADi $< 29.5\%$ ($n = 18$)	<i>p</i> -Value
Body weight (kg)	18.44 \pm 11.84	16.14 \pm 11.15	24.35 \pm 12.30	18.65 \pm 12.03	0.232 ^b
Age (years)	8.72 \pm 3.46	8.86 \pm 3.94	8.33 \pm 1.85	8.73 \pm 3.51	0.915 ^a
Female: number (%)	28 (47.5%)	14 (46.67%)	4 (36.36%)	10 (55.56%)	0.59 ^c
Respiratory symptom (%)	14 (23.73%)	0 (0%)	3 (27.27%)	11 (61.11%)	0.00 ^c
Right-sided CHF (%)	7 (24.13%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (38.9%)	0.00 ^c
TRPG (mmHg)	27.02 \pm 34.51	7.88 \pm 6.75	10.24 \pm 7.93	69.15 \pm 35.22	0.00 ^a
RPAD index (%)	34.4 \pm 10.1	41.9 \pm 4.9	34.9 \pm 2.0	21.8 \pm 6.3	0.00 ^a
MPA:Ao	1.08 \pm 0.23	0.95 \pm 0.07	0.947 \pm 0.07	1.357 \pm 0.21	0.00 ^a
PT:DAo	1.21 \pm 0.41	0.97 \pm 0.09	1.02 \pm 0.12	1.72 \pm 0.39	0.00 ^a
PT:AAo	1.08 \pm 0.363	0.90 \pm 0.09	0.84 \pm 0.11	1.53 \pm 0.34	0.00 ^a
AT:ET	0.34 \pm 0.09	0.39 \pm 0.05	0.37 \pm 0.06	0.22 \pm 0.06	0.00 ^a
Parasite burden (1-4)	2.27 \pm 1.34	0	2.09 \pm 1.47	2.56 \pm 1.22	0.00 ^c

Legend: Results for body weight, age, tricuspid pressure gradient (TRPG), right pulmonary artery distensibility index (RPAD index), main pulmonary artery to aorta ratio (MPA:Ao), pulmonary trunk to descending aorta ratio (PT:DAo), pulmonary trunk to ascending aorta ratio (PT:AAo), right acceleration time to ejection time ratio (AT:ET) and parasite burden are expressed as mean \pm standard deviation. Results for female, respiratory symptoms, and right sided congestive heart failure (CHF) are expressed as n (%). *p* values: ^a $p < 0.01 =$ ANOVA; ^b $p < 0.01 =$ Kruskal–Wallis; ^c $p < 0.01 =$ Chi-squared test.

Figure 2 illustrates the PT:DAo and PT:AAo ratios obtained for each group. The ANOVA tests indicated that there were significant differences between the values of the studied parameters and the groups of dogs. Bonferroni post hoc tests for multiple comparisons indicated that for PT:DAo, PT:AAo, MPA:Ao, AT:ET, and TRPG, there were significant differences between Group C when compared to Groups A and B. Furthermore, the results of Group A and Group B did not differ significantly. The median of the AT:ET ratio was significantly lower in dogs from Group C, while the median of the other parameters (TRPG, MPA:Ao, PT:DAo, PT:AAo) was higher in dogs from Group C. Moreover, statistically significant differences were found for the RPAD index between the three groups, being lower in Group C and higher in Group A (Table 1).

To measure the concordance between PT:DAo and PT:AAo, the Pearson correlation was performed between the two ratios, resulting in a very high correlation: 0.976 (*p*-value 0.000). Moreover, since correlation does not imply concordance, the intraclass correlation coefficient was also calculated. The results showed that both absolute agreement and consistency were excellent, with values > 0.95 . Therefore, the concordance of both measures was demonstrated.

Linear regressions were performed through Pearson correlations. The R^2 of the regressions that allowed comparison of the quality of the studied measures with the RPAD index were obtained. The method that best correlated was AT:ET ($R^2 > 0.8$), followed by PT:DAo and TRPG with $R^2 > 0.7$, and PT:AAo and MPA:Ao with $R^2 > 0.65$ (Table 2). Finally, five ROC curves were determined for each method in which the event to be studied was having PH (RPAD index $< 29.5\%$). The AUCs of all five parameters were excellent (> 0.95) (Table 3). For PT:DAo, any value > 1.111 concurred with PH in 95.1% of cases, and a value < 1.111 concurred with normotension in 100% of cases. For PT:AAo, any value > 1.057 corresponded to PH in 100% of cases and a value < 1.057 corresponded to normotension in 100% of cases. Cut-off values, sensitivity, and specificity for the other studied parameters are shown in Table 3.

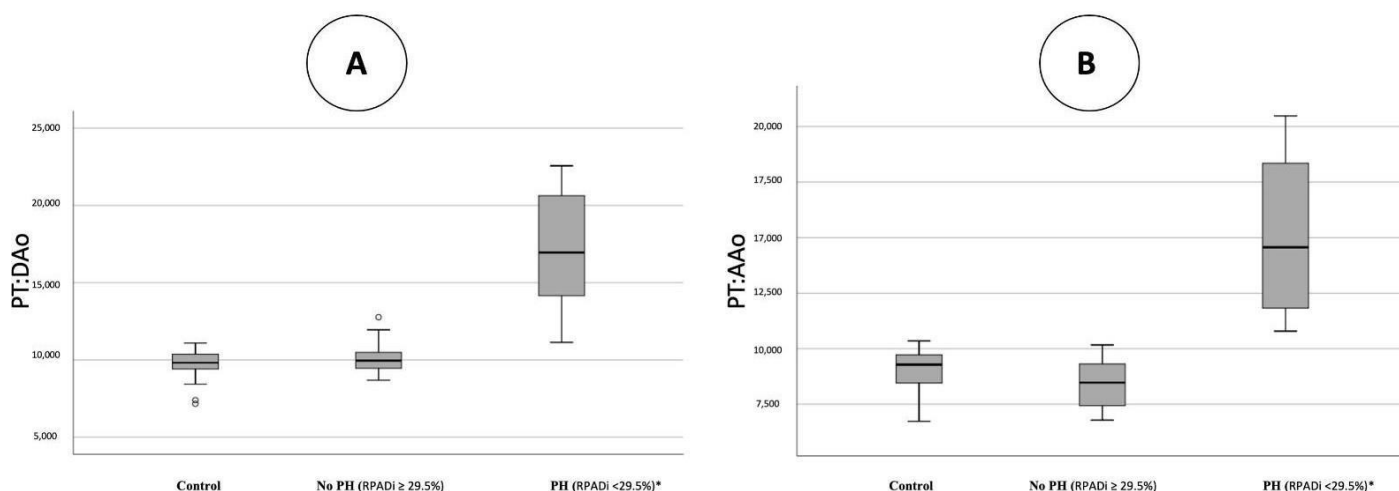


Figure 2. Scatterplots illustrating pulmonary trunk to descending aorta ratio (PT:DAo) (A) and pulmonary trunk to ascending aorta ratio (PT:AAo) (B), obtained in healthy dogs (control), in dogs with heartworm and no presence/mild pulmonary hypertension (RPADi ≥ 29.5%), and dogs with heartworm and moderate to severe pulmonary hypertension (RPADi < 29.5%). The box plots represent median (solid horizontal lines within boxes), 25th, and 75th percentiles (boxes) and minimum and maximum values (whiskers). Statistically significant differences (*) were observed between control and RPADi ≥ 29.5% dogs when compared to RPADi < 29.5% dogs.

Table 2. Results of simple regression analyses for the prediction of RPAD index.

Method	Pearson Correlation	R ²	p-Value	CI 95%	Regression Equation
PT:DAo	0.845 **	0.709	0.000	(−0.244;−0.174)	RPADIndex = 0.597 − 0.209 * PT/DAo
PT:AAo	0.824 **	0.674	0.000	(−0.272;−0.188)	RPADIndex = 0.593 − 0.230 * PT/AAo
AT:ET	0.898 **	0.803	0.000	(0.812;1.054)	RPADIndex = 0.030 + 0.933 * AT:ET
MPA:AO	0.830 **	0.684	0.000	(−0.433;−0.301)	RPADIndex = 0.738 − 0.367 * MPA/AO
TRPG	0.847 **	0.712	0.000	(−0.003;−0.002)	RPADIndex = 0.412 − 0.002 * TRPG

Legend: PT:DAo: pulmonary trunk to descending aorta ratio; PT:AAo: pulmonary trunk to ascending aorta ratio; AT:ET: right acceleration time to ejection time ratio; MPA:AO: main pulmonary artery to aorta ratio; TRPG: tricuspid pressure gradient; CI 95%: 95% confidence interval; R²: coefficient of determination; RPADIndex: right pulmonary artery distensibility index. On the one hand, “***” means that the correlation is significant at the 0.01 level (bilateral). On the other hand, “*” is used in regression equations as a multiplication sign.

Table 3. Sensitivity (Se), specificity (Sp), and Youden index of cut-off points of the studied parameters/measures to predict PH estimate based on the right pulmonary artery distensibility index (RPAD index) < 29.5%.

Method	AUC	CI 95%	Cut-Off	Se	Sp	Youden Index (Se + Sp-1)
PT:DAo	0.993	(0.980; 1.000)	≥1.111	0.951	1.000	0.951
PT:AAo	1.000	(1.000; 1.000)	≥1.057	1.000	1.000	1.000
AT:ET	0.983	(0.958; 1.000)	≤0.325	0.854	1.000	0.854
MPA:AO	1.000	(1.000; 1.000)	≥1.098	1.000	1.000	1.000
TRPG	0.999	(0.994; 1.000)	≥25.874	0.976	1.000	0.976

Legend: PT:DAo: pulmonary trunk to descending aorta ratio; PT:AAo: pulmonary trunk to ascending aorta ratio; AT:ET: right acceleration time to ejection time ratio; MPA:AO: main pulmonary artery to aorta ratio; TRPG: tricuspid pressure gradient; AUC: area under receiver operating characteristic curve; CI 95%: 95% confidence interval; Se: sensitivity; Sp: specificity.

4. Discussion

PH is a frequently occurring and severe condition in dogs with HWD. It is a consequence of the presence of adult parasites of *D. immitis*, which produce severe lesions in the pulmonary arteries that lead to proliferative endarteritis. These endothelial alterations start as soon as the worms arrive at the pulmonary arteries and the chronic consequences

cause a marked decrease in quality of life and life span [1,18,19]. This fact is observable in the results of this study, in which dogs with PH showed significantly higher clinical signs of disease and presence of congestive heart failure. Moreover, it has been reported that endarteritis may not be reversible once the parasites have been eliminated and chronic PH has been described in dogs up to 10 months after completion of adulticide treatment [4,20]. Therefore, it is extremely important to find different diagnostic methods for its detection. The damage produced by *D. immitis* to the endothelium cause a reduction in elasticity of the pulmonary arteries, being associated with an impaired distensibility of the vessel [20]. For this reason, the RPAD index has been described as a valuable echocardiographic method to detect and assess severity of PH in dogs with HWD, compared to other echocardiographic variables including AT:ET, TRPG y MPA:Ao [3–5,20]. The results of the present study confirmed the utility of the RPAD index as a gold standard for the echocardiographic detection of PH in dogs with HWD. Furthermore, the RPAD index was the only studied parameter that is significantly modified for dogs with heartworm but the absence of HP or the presence of mild PH (RPAD index $\geq 29.5\%$), compared to healthy dogs, which demonstrates its utility as an early marker of endothelial damage in this pathology.

Moreover, the results of the additional echocardiographic techniques used to compare and detect PH have demonstrated their usefulness in determining the presence of PH, finding satisfactory strong correlations compared to the RPAD index [5,16,17]. The proportions observed and the values obtained in the present study show similar data to results published in other echocardiographic investigations, producing promising results for the non-invasive diagnosis of PH in HWD [21,22].

The evaluation of PH in dogs can be a challenge in veterinary medicine and the use of new useful and easily repeatable diagnostic methods is of utmost importance to confirm the finding of PH. Studies carried out during the last decade have reported the growing use of thoracic CT for the diagnosis and management of dogs with cardiorespiratory diseases that may predispose to PH, including heartworm. Concerning the latter, previous studies have shown the usefulness of the CT study to diagnose pulmonary arterial and parenchymal changes as a consequence of heartworm infection [23,24]. Thus, the diagnostic utility of CT-derived measurement of the PT and Ao diameter to predict the presence of PH in HWD may be advantageous, as shown in the results of this study.

Furthermore, the intraclass correlation study developed to determine the usefulness of measuring the ratio using the two portions of the thoracic aorta, ascending and descending, reported that both methods were equally valid to study the presence of PH by CT. The results showed lower mean values when using the ascending portion (PT:AAo ratio) as a result of larger aortic measurement diameters in this portion compared to the descending portion (PT:DAo). Based on the clinical experience of the authors, the values obtained through the PT:AAo ratio are easily comparable to the echocardiographic MPA:Ao measure, since both measures are determined at the same vascular level. Moreover, both techniques are simple and reproducible. The presence of adult parasites was not observed in any of the animals studied, demonstrating that this technique is not useful for quantifying or diagnosing the presence of adult parasites in the pulmonary arteries of infected dogs.

The study of the PT:Ao ratio via CT in humans has previously been reported [12–14], in which the increase in the diameter of the pulmonary trunk compared with the descending and the ascending portions of the thoracic aorta have been shown to have a strongly predictive value of PH, and cut-off points were established to determine the presence of even mild PH [14]. In veterinary medicine, recent studies have also been published on the PT:Ao ratio with the objective of establishing physiological measures in healthy animals and to establish cut-off points to diagnose the presence and severity of PH [9–11]. In this study, unlike the RPAD index, the PT:Ao ratio did not show significant differences between healthy dogs and dogs with heartworm without hypertension or mild PH. These results are similar to those reported in previous investigations, which showed a high degree of overlap between PT:Ao ratios of the non-PH and mild-PH groups [9–11].

On the other hand, the results displayed a great usefulness of this ratio to detect moderate to severe HP in dogs with heartworm, showing cut-off values with high sensitivity and specificity for PT:DAo and PT:AAo. The cut-off point to diagnose moderate or severe PH reported for PT:DAo in this study (≥ 1.11) was slightly lower than previously reported by other authors (> 1.4) in dogs with PH of undescribed etiology [10]. Moreover, the mean PT:AAo and PT:DAo obtained for healthy dogs were slightly lower than the values presented in previous studies (1.14 ± 0.15 and 0.97 ± 0.12 for PT:AAo, and 1.26 ± 0.11 for PT:DAo) [9–11]. These differences could be due to the different methodologies established to determine the presence or absence of PH in the studies mentioned. In addition, differences in cross-sectional measurements of vascular diameters from previously published articles may lead to small differences in the determination of the PT:Ao ratio. Moreover, an optimal PT:Ao ratio thresholds for the diagnosis of PH have been poorly defined and the diagnostic value for evaluating PH using both the ascending and descending parts of the Ao have not been accomplished in HWD, so the results of this study are of great novelty and clinical usefulness.

As has been previously reported in dogs with pulmonary arterial hypertension produced for other precapillary causes, an increase in the relationship between PT and Ao was associated with the severity of PH diagnosed by echocardiography [9–11]. These findings are consistent with the results of the present study, which showed an excellent correlation between the RPAD index and the PT:Ao ratios in dogs with heartworm. However, the lack of utility to detect mild PH is an important limiting factor, since the detection of early endothelial damage in heartworm is important for gaining good control and implementing early therapeutic measures for a better prognosis.

The main limitation of the present study was the size of the canine population analyzed, and the cross-sectional anatomy between dogs' size, weight and breed, so further studies with higher number of animals are warranted. In addition, the pulmonary arterial pressure was not directly measured by right heart catheterization, but instead used the RPAD index as the gold standard in the measurement of HP in dogs with *D. immitis*.

The phase of respiration must be considered if measurement of PT:Ao through CT is anticipated because a statistically significant difference was seen between the vascular measurements on the expiratory CT scans when compared to both the pre- and postcontrast inspiratory CT protocols [9]. For this study, based on recent publications, the use of postcontrast protocols was chosen [10,11]; however, the respiratory cycle could not be defined and the influence of inspiration and expiration on the size of the PT and the portions of Ao was not analyzed. Uniform tomographic studies were not obtained in all cases, so multiplanar reconstructions were not used to determine vascular measurements. The fact that dogs were anesthetized during CT is an important limitation, but was mandatory and reflects real clinical practice. Anesthesia alters hemodynamics with potential repercussions on the measures of CT indices of PH tested in this study. Premedication based on alfaxalone and butorphanol has proven to be hemodynamically very stable in other cardiorespiratory disorders, and the use of propofol and isoflurane makes it possible to standardize the method used, since they are drugs widely used in anesthetic induction and maintenance in veterinary practice [12]; therefore, the results obtained are subject to the particular use of the anesthetic protocol used.

5. Conclusions

In conclusion, the results of the present study highlight the potential utility of the PT:Ao ratio, using PT:AAo or PT:DAo PT:Ao ratios, to diagnose moderate to severe PH in dogs with heartworm. Although the RPAD index remains the gold standard for the diagnosis of PH in these dogs, dogs undergoing CT for any other clinical indication could benefit from the study and standardization of the PT:Ao ratio. However, further studies with a larger number of animals are needed to evaluate and identify whether the TC parameters studied have clinical utility for the early diagnosis of PH in dogs with heartworm.

Author Contributions: J.A.M.-A. and E.C. designed the study. J.I.M., Y.F.-C. and E.C. wrote the manuscript. J.I.M., Y.F.-C., S.N.G.-R. and N.C.-R. performed the fieldwork, collected the data and performed the experiments. All authors participated in the discussion of the results, corrected, read, and approved the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The presented study was supported by own funds from the Servicio de Medicina Veterinaria FULP/ULPGC (SD-240/030/0026). N.C.-R. was supported by the ‘Grants for the predoctoral training program for researchers’ program of the Government of the Canary Islands (TESIS2021010010) and J.I.M. and S.N.R.-G. was supported by the “Grants for the financing of predoctoral contracts” program of the Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; J.I.M. (PIFULPGC-2017-CCSALUD-3); S.N.R.-G. (PIFULPGC-2020-2-CCSALUD-2).

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were not required for the animal in this study. All blood samples were routinely collected for prescribed diagnostic purposes or official monitoring studies and subsequently made available to this study. All of the dog owners were informed about the present study and consented to participate. The study was carried out in accordance with the current Spanish and European legislation on animal protection (Spanish Royal Decree 53/2013 and 2010/63/UE Directive).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Hospital Clínico Veterinario of the Universidad de Las Palmas de Gran Canaria for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. McCall, J.W.; Genchi, C.; Kramer, L.H.; Guerrero, J.; Venco, L. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* **2008**, *66*, 193–285.
2. Simón, F.; Siles-Lucas, M.; Morchón, R.; González-Miguel, J.; Mellado, I.; Carretón, E.; Montoya-Alonso, J.A. Human and animal dirofilariasis: The emergence of a zoonotic mosaic. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25*, 507–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Serrano-Parreño, B.; Carretón, E.; Caro-Vadillo, A.; Falcón-Cordón, Y.; Falcón-Cordón, S.; Montoya-Alonso, J.A. Evaluation of pulmonary hypertension and clinical status in dogs with heartworm by Right Pulmonary Artery Distensibility Index and other echocardiographic parameters. *Parasit Vectors* **2017**, *10*, 106–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Falcón-Cordón, Y.; Montoya-Alonso, J.A.; Caro-Vadillo, A.; Matos, J.I.; Carretón, E. Persistence of pulmonary endarteritis in canine heartworm infection 10 months after the eradication of adult parasites of *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* **2019**, *273*, 1–4. [[CrossRef](#)]
5. Venco, L.; Mihaylova, L.; Boon, J.A. Right Pulmonary Artery Distensibility Index (RPAD Index). A field study of an echocardiographic method to detect early development of pulmonary hypertension and its severity even in the absence of regurgitant jets for Doppler evaluation in heartworm-infected dogs. *Vet. Parasitol.* **2014**, *206*, 60–66. [[PubMed](#)]
6. Jung, J.; Chang, J.; Oh, S.; Yoon, J.; Choi, M. Computed tomography angiography for evaluation of pulmonary embolism in an experimental model and heartworm infested dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2010**, *51*, 288–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Reiner, C.; Visser, L.C.; Kellihan, H.B.; Masseau, I.; Rozanski, E.; Clercx, C.; Williams, K.; Abbott, J.; Borgarelli, M.; Scansen, B.A. ACVIM consensus statement guidelines for the diagnosis, classification, treatment, and monitoring of pulmonary hypertension in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2020**, *34*, 549–573. [[CrossRef](#)]
8. Drees, R.; Christopher, J.; Jimmy, H. Invited review-computed tomographic angiography (CTA) of the thoracic cardiovascular system in companion animals. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2014**, *55*, 229–240. [[CrossRef](#)]
9. Granger, L.A.; Pariat, R.; Vila, J.; Coulter, C.E.; Rademacher, N.; Queiroz-Williams, P. Computed tomographic measurement of the main pulmonary artery to aortic diameter ratio in healthy dogs: A comparison to echocardiographically derived ratios. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2016**, *57*, 376–386. [[CrossRef](#)]
10. Sutherland-Smith, J.; Hankin, E.J.; Cunningham, S.M.; Sato, A.F.; Barton, B.A. Comparison of a computed tomographic pulmonary trunk to aorta diameter ratio with echocardiographic indices of pulmonary hypertension in dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2018**, *59*, 18–26. [[CrossRef](#)]
11. Soliveres, E.; Mc Entee, K.; Couvreur, T.; Fastrès, E.; Roles, E.; Merveille, A.C.; Tutunaru, A.C.; Clercx, C.; Bolen, G. Utility of Computed Tomographic Angiography for Pulmonary Hypertension Assessment in a Cohort of West Highland White Terriers with or without Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Vet. Sci* **2021**, *8*, 732133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ng, C.S.; Wells, A.U.; Padley, S.P. A CT sign of chronic pulmonary arterial hypertension: The ratio of main pulmonary artery to aortic diameter. *J. Thorac. Imaging* **1999**, *14*, 270–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Iyer, A.S.; Wells, J.M.; Vishin, S.; Bhatt, S.P.; Wille, K.M.; Dransfield, M.T. CT scan-measured pulmonary artery to aorta ratio and echocardiography for detecting pulmonary hypertension in severe COPD. *Chest* **2014**, *145*, 824–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Compton, G.L.; Florence, J.; MacDonald, C.; Yoo, S.J.; Humpl, T.; Manson, D. Main pulmonary artery-to-ascending aorta diameter ratio in healthy children on MDCT. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2015**, *205*, 1322–1325. [[CrossRef](#)]
15. Ping, C.; Min-Chieh, W.; Tung, H.; Yun-Chang, L.; Shiun-Long, L. Prognostic value of right pulmonary artery distensibility in dogs with pulmonary hypertension. *J. Vet. Sci.* **2019**, *20*, 34–49.
16. Visser, L.C.; Im, M.K.; Johnson, L.R.; Stern, J.A. Diagnostic Value of Right Pulmonary Artery Distensibility Index in Dogs with Pulmonary Hypertension: Comparison with Doppler Echocardiographic Estimates of Pulmonary Arterial Pressure. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 543–552. [[CrossRef](#)]
17. Venco, L.; Genchi, C.; Vigevani Colson, P.; Kramer, L. Relative utility of echocardiography, radiography, serologic testing and microfilariae counts to predict adult worm burden in dogs naturally infected with heartworms. In *Recent Advances in Heartworm Disease, Symposium'01*; Seward, R.L., Knight, D.H., Eds.; American Heartworm Society: Batavia, IL, USA, 2003; pp. 111–124.
18. Maerz, I. Clinical and diagnostic imaging findings in 37 rescued dogs with heartworm disease in Germany. *Vet. Parasitol.* **2020**, *283*, 174–181. [[CrossRef](#)]
19. Romano, A.E.; Saunders, A.B.; Gordon, S.G.; Wesselowski, S. Intracardiac heartworms in dogs: Clinical and echocardiographic characteristics in 72 cases (2010–2019). *J. Vet. Intern. Med.* **2021**, *35*, 88–97. [[CrossRef](#)]
20. Serrano-Parreño, B.; Carretón, E.; Caro-Vadillo, A.; Falcón-Cordón, S.; Falcón-Cordón, Y.; Montoya-Alonso, J.A. Pulmonary hypertension in dogs with heartworm before and after the adulticide protocol recommended by the American Heartworm Society. *Vet. Parasitol.* **2017**, *236*, 34–37. [[CrossRef](#)]
21. Paradies, P.; Spagnolo, P.P.; Amato, M.E.; Pulpito, D.; Sasanelli, M. Doppler echocardiographic evidence of pulmonary hypertension in dogs: A retrospective clinical investigation. *Vet. Res. Commun.* **2014**, *38*, 63–71. [[CrossRef](#)]
22. Miru, C.; Won-Kyoung, Y.; Sang-IL, S.; Changbaig, H. Assessment of Clinical Outcome in Dogs with Naturally Infected with *Dirofilaria immitis* after American Heartworm Society Protocol vs. Slow Kill Method. *J. Vet. Clin.* **2017**, *34*, 1–6.
23. Seiler, G.S.; Nolan, T.J.; Withnall, E.; Reynolds, C.; Lok, J.B.; Sleeper, M.M. Computed tomographic changes associated with the prepatent and early patent phase of dirofilariasis in an experimentally infected dog. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2010**, *51*, 136–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fina, C.; Vignoli, M.; Terragni, R.; Rossi, F.; Wisner, E.; Saunders, J.H. Computed tomographic characteristics of eosinophilic pulmonary granulomatosis in five dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2014**, *55*, 16–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Research paper

Persistence of pulmonary endarteritis in canine heartworm infection 10 months after the eradication of adult parasites of *Dirofilaria immitis*

Y. Falcón-Cordón^a, J.A. Montoya-Alonso^{a,*}, A. Caro-Vadillo^b, J.I. Matos-Rivero^a, E. Carretón^a

^a Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Research Institute of Biomedical and Health Sciences (IUIBS), University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

^b Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Heartworm

Dirofilaria immitis

Pulmonary hypertension

Proliferative endarteritis

Echocardiographic exam

Pulmonary thromboembolism

ABSTRACT

Pulmonary endarteritis caused by *Dirofilaria immitis* and pulmonary hypertension (PH) are closely linked and the determination of PH could be validated to assess the severity and chronicity of the vascular damage, i.e. by the use of the Right Pulmonary Artery Distensibility (RPAD) Index. The aim was to evaluate the RPAD Index in dogs 10 months after the last dose of adulticide. The study included 23 client-owned dogs with heartworm brought for adulticide treatment. Echocardiographic exam was carried out to estimate worm burden, RPAD Index as well as other routine echocardiographic values on day 0 (diagnosis), day 120 (discharge), and 10 months after the last dose of adulticide. No significant differences were observed in the RPAD Index over time, neither when microfilaremic status and parasite burden were evaluated. An RPAD Index < 29% was found in 52.2% of the dogs on day 0, day 120, and 10 months after the last dose of adulticide. Regarding other echocardiographic parameters, only significant differences were observed on tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) values between day 0:day 120 ($p = 0.008$), and day 0:end of the study ($p = 0.037$). There was not significant improvement in pulmonary damage 10 months after the elimination of the parasites ($p = 0.296$), suggesting that, once the endarteritis has developed, the vascular changes are chronic and may not be reversible. The modifications of the TAPSE value suggest an improvement in the systolic function of the right ventricle after the disappearance of the worms, independently of the presence of PH. The endarteritis causes a decrease in the elasticity in the pulmonary vasculature and an increase in the resistance that, chronically, and depending on the severity, will cause the development of PH and later right heart failure. This complication of the disease is one of the most damaging and frequent, so it is necessary to adequately monitor PH in dogs undergoing adulticide treatment. Furthermore, knowing the pulmonary status could provide valuable information to help provide an objective prognosis and help assess the need to add additional treatments, once the worms have been eliminated.

1. Introduction

Heartworm disease is caused by the nematode *Dirofilaria immitis*, which mainly affects canids and felids. It is a vector-borne disease whose adults lodge in pulmonary arteries and right heart chambers. During heartworm infection, damage to the endothelium occurs which, as consequence, produces intimal proliferation, which begins immediately after the arrival of the parasites (Schaub et al., 1981; Keith et al., 1983; Simón et al., 2012). This is due to the multiplication and migration of smooth muscle cells to the intima, which creates a villous proliferation in the inner surface of the artery (Atwell et al., 1985, 1988; McCall et al., 2008). As a consequence, there is a thickening of the wall of the arteries and the intimal surface presents a rough texture, causing a narrowing of the vessel lumen, especially in the small

branches. As lesions develop, the arteries become stiffer and lose compliance, so there is an increase in pulmonary arterial pressure that leads to a chronic development of pulmonary hypertension (PH). Furthermore, the death of parasites triggers pulmonary thromboembolism, which also causes acute episodes of PH and contributes to the chronic development of PH (Bowman and Atkins, 2009; Simón et al., 2012).

PH is a serious condition that is frequently found in heartworm disease. It is one of the main causes that produce clinical signs in the infected dog and, if it is not treated correctly, will lead chronically to the development of right-sided cardiac disease. Moreover, there is an intimate association between pulmonary endarteritis and the presence of PH; therefore, the determination of PH can be fruitful to determine the severity and chronicity of the endarteritis (Sasaki et al., 1992; Uchida and Saida, 2005; Venco et al., 2014a).

* Corresponding author.

E-mail address: alberto.montoya@ulpgc.es (J.A. Montoya-Alonso).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.07.008>

Received 27 March 2019; Received in revised form 24 July 2019; Accepted 25 July 2019

0947-2098/\$ - see front matter © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

For this, the echocardiographic exam is the method of choice, which provides a simple non-invasive procedure to estimate pulmonary artery pressure in animals. In dogs with heartworm disease, previous studies have supported the usefulness of the Right Pulmonary Artery Distensibility (RPAD) Index as a useful and objective method to estimate the existence and severity of PH (Venco et al., 2014b; Visser et al., 2016), which is calculated as the difference in diameter of the right pulmonary artery in systole and diastole as measured by M-mode (Venco et al., 2014b; Serrano-Parreño et al., 2017a). This method constitutes an advantage over other echocardiographic determinations, which are based mainly on subjective and indirect parameters. The RPAD Index is especially useful when there is not tricuspid regurgitation or pulmonary regurgitation.

An earlier study showed that there was no significant worsening or recovery of damage to the pulmonary arteries in dogs with heartworm, one month after the last dose of adulticide treatment with melarsomine (Serrano-Parreño et al., 2017b), concluding that, if a significant improvement were possible after eliminating the worms and finishing the treatment, it would probably take more time before observing positive changes after the elimination of the parasites.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the RPAD Index in dogs 10 months after the last dose of adulticide treatment, to determine changes in pulmonary pressure and, consequently, the progression of pulmonary endarteritis in these patients.

2. Materials and methods

The study recruited 23 dogs living in Gran Canaria, a hyperendemic island (Montoya-Alonso et al., 2016) diagnosed with heartworm by the detection of circulating *D. immitis* antigens (Urano test Dirofilaria®, Urano Vet SL, Barcelona, Spain) and attended the Veterinary Medicine Service of the University of Las Palmas de Gran Canaria for adulticide treatment. Microfilaremic status was assessed by a modified Knott test (Genchi et al., 2007). None of the animals received previous treatment against the disease, presented previous or concomitant pathologies and none participated in other studies.

The dogs underwent an echocardiographic exam as described previously (Serrano-Parreño et al., 2017a). Echocardiographic exams were

performed on day 0 – the day of the diagnosis and when the study began –, on day 120 – one month after the last dose of melarsomine and when the dog was discharged – and 10 months after the last dose of adulticide. The worm burden was estimated by echocardiographic exam according to the guidelines established by Venco et al. (2003) and a grade from 1 to 4 was designated from low to high parasite burden.

The RPAD Index was assessed following the methodology established by Venco et al. (2014b), as well as other echocardiographic parameters were measured. By M-mode these were: fractional shortening (FS), ejection fraction (EF), right ventricular internal diameter in telediastole (RVIDD) and left ventricular internal diameter in telediastole (LVIDD), RVIDD/LVIDD ratio, right ventricle wall thickness (RVWT), left ventricle posterior wall thickness (LVPWT), RVWT/LVPWT ratio, and tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE). By standard two-dimensional mode, main pulmonary artery/aorta ratio (PA/Ao ratio), left atrial (LAV) and right atrial (RAV) volumes, left atrial (LAA) and right atrial (RAA) areas were determined. Finally, by means of spectral Doppler the following parameters were assessed: pulmonary flow acceleration time (AT), pulmonary flow ejection time (ET), AT/ET ratio, maximum velocity of the blood flow through the pulmonary artery (PAVmax) and pulmonary deceleration time (DT).

Adulticide treatment was administered to the recruited dogs following the current recommended management protocol (European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2018), with the administration of doxycycline (10 mg/kg BID) for four weeks, monthly heartworm preventative (ivermectin:

6 µg/kg) and intramuscular administration of three doses of melarsomine on days 60, 90 and 91.

On day 120, the Knott test and echocardiographic exam were performed and the dogs were discharged. Six months after the last dose of melarsomine, the efficacy of the treatment was verified with tests for the detection of antigens (Urano test Dirofilaria®, Urano Vet SL, Barcelona, Spain) and microfilariae (modified Knott test). Exercise restriction was prescribed throughout the treatment, especially from the first dose of immiticide until the dog was discharged. The monthly prophylaxis was not interrupted during the study.

The data were analysed using the SPSS Base 20.0 software for Windows. Continuous variables were expressed as median ± standard deviation. Qualitative variables are expressed as percentage. The non-parametric test of Wilcoxon was used to determine the differences between days 0, 120 and the end of the study. The Chi square test or Fisher's exact test were used to assess the association between categorical variables. In all cases, a p value < 0.05 was determined as significant.

All the owners were informed about the present study and consented to participate. The study was approved by the ethical committee of the Veterinary Medicine Service of the University of Las Palmas de Gran Canaria (MV-2015/04) and was executed in accordance with the current European legislation on animal protection.

3. Results

All the animals finished the adulticide treatment without significant complications. Nine dogs were male and 14 were female, with a range from 2 to 7 years; eight were mongrel dogs while 15 were pure-bred dogs. According to the results of the Knott test on day 0, microfilaremia was present in 11 dogs (47.8%) while 12 (52.2%) were amicrofilaremic. The day of discharge and six months after the last adulticide dose, all dogs were amicrofilaremic.

On day 0, 20 dogs (87%) showed a low parasite burden (scores 1 or 2) while three (13%) presented a high burden (scores 3 or 4) (Venco et al., 2003). On day 120 and 10 months after the last adulticide dose, no worms were echocardiographically detected in any of the dogs. Also, all dogs showed absence of circulating heartworm antigens six months after completion of the treatment.

Presence or absence of PH, as well as severity, were assessed based on the measurement of the RPAD Index. A RPAD Index < 29% [presence of PH according to Visser et al. (2016) and presence of severe-moderate PH, according to Venco et al. (2014b)] was present in 52.2% of the dogs on day 0, day 120 and 10 months after the last dose of adulticide. Fig. 1 and 2 show the evolution of RPAD Index in dogs with/ without PH based on the cut-off of Visser et al. (2016).

On day 0, mean RPAD Index was 27.4% (median: 27.22%, min: 7.9%, max: 44.6%), on day 120 it was 29.2% (median: 28.4%, min: 7.9%, max: 50%) and 10 months after the last dose of adulticide, the mean RPAD Index was 27.9% (median: 28.2%, min: 7.8%, max: 42%). No statistically significant differences were observed between the measurements of the RPAD Index when all dogs were evaluated (p = 0.296), neither between those dogs with RPAD Index > 29% (p = 0.268) or between dogs with RPAD Index < 29% on day 0 (p = 0.174). No statistically significant differences were found in the RPAD Index when the microfilaremic status (p = 0.118 on day 0; p = 0.740 on days 120 and 10 months) and parasite burden (p = 1.000 on day 0; p = 0.698 on day 120; p = 0.635 after 10 months) were evaluated.

Furthermore, when the other echocardiographic values were evaluated, only significant differences were found in the TAPSE measurements between day 0 and day 120 (p = 0.008), and between day 0 and 10 months after the last dose of adulticide (p = 0.037), when all dogs were evaluated. When the RPAD Index was assessed, only statistically significant differences were observed in the measurement of TAPSE of dogs with an RPAD Index < 29%, between day 0 and day 120 (p = 0.027). Table 1 shows the TAPSE values observed in dogs throughout the study.

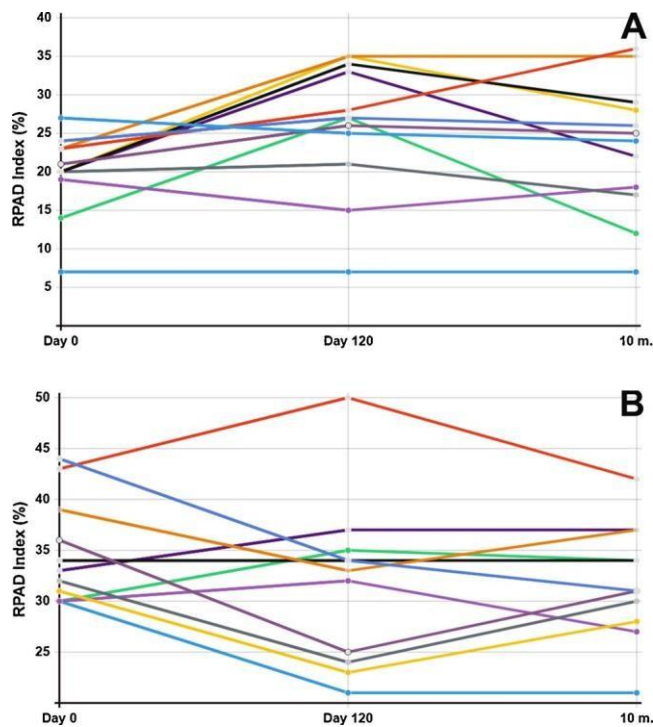


Fig. 1. Evolution of the Right Pulmonary Artery Distensibility (RPAD) Index in the studied dogs, represented by different colours. A) represents dogs with RPAD Index < 29% on day 0. This would correspond to dogs with pulmonary hypertension (PH) according to Visser et al. (2016) or dogs with severe-moderate PH according to Venco et al. (2014b). B) represents those dogs with RPAD Index > 29% on day 0, which would correspond to dogs without PH (Visser et al., 2016) or dogs with mild PH/no PH (Venco et al., 2014b). The ordinate axis of the image represents the RPAD Index (%). The axis of the abscissa shows the different measurements taken during the study (Day 0: the day of the diagnosis of the disease and beginning of the study; Day 120: one month after the last dose of melarsomine and when the dog was discharged; 10 m.: 10 months after the last dose of melarsomine).

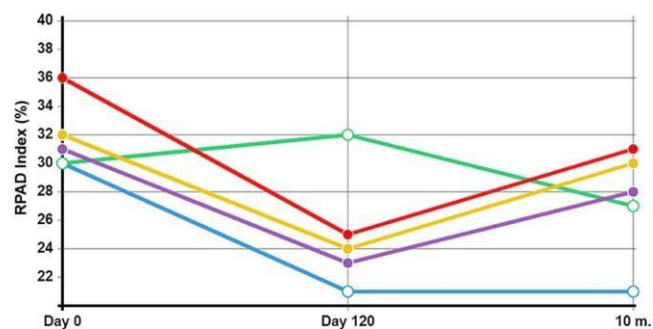


Fig. 2. Dogs with Right Pulmonary Artery Distensibility (RPAD) Index > 29% on day 0 which showed a decrease of the index below 29% at some point in the study. The ordinate axis of the image represents the RPAD Index (%). The axis of the abscissa shows the different measurements taken during the study (Day 0: the day of the diagnosis of the disease and beginning of the study; Day 120: one month after the last dose of melarsomine and when the dog was discharged; 10 m.: 10 months after the last dose of melarsomine).

No statistically significant differences were present in any of the echocardiographic parameters due to microfilaremic status or worm burden on day 0.

4. Discussion

Immediately after the arrival of the worms to the pulmonary

Table 1

Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) values on day 0 (Measurement 1: the day of the diagnosis of the disease and beginning of the study), day 120 (Measurement 2: one month after the last dose of melarsomine and when the dog is discharged) and 10 months after the last dose of melarsomine (Measurement 3). Results are expressed in cm as median, minimum and maximum values. Statistically significant differences were observed between measurement 1 and measurement 2 (p = 0.008) and between measurement 1 and measurement 3 (p = 0.037), but not between measurement 2 and measurement 3 (p = 1.000).

All dogs (n = 23)	Measurement 1	Measurement 2	Measurement 3
Median	1.20 cm	1.50 cm	1.40 cm
Min	0.68 cm	0.62 cm	0.81 cm
Max	1.98 cm	2.02 cm	2.17 cm

arteries, arterial damage and development of proliferative endarteritis begin, which leads to vascular remodelling with the formation of intravascular microvilli, intimal thickening and narrowing of the lumen of the arterial vessels (Munnell et al., 1980; Schaub et al., 1981). Endarteritis worsens with the chronicity of the disease, the intensity of exercise and the immune response of the host to the parasite (Dillon et al., 1995). The influence of the parasitic load is not clear; there are studies that support its influence (Dillon et al., 1995; Méndez et al., 2015), while others state that parasite burden does not influence the development of vascular damage (Venco et al., 2014a; Serrano-Parreño et al., 2017a). In the present study, the RPAD Index was similar in dogs with high and low parasite load. However, given the low number of dogs with high load, the results should be interpreted with caution.

The endarteritis causes a decrease in the elasticity in the pulmonary vasculature, as well as an increase in the resistance that, chronically and depending on the severity, will cause the development of PH and the subsequent right heart failure. Also, the death of the worms causes pulmonary thromboembolisms, which worsens vascular deterioration and the presence of PH (McCall et al., 2008; Bowman and Atkins, 2009). Thus, this complication of the disease is one of the most harmful and frequent. Due to the close relationship between the presence of endarteritis and PH, it is necessary to adequately monitor this condition; for this, the RPAD Index has been useful (Venco et al., 2014b; Visser et al., 2016; Serrano-Parreño et al., 2017a).

The mechanisms of vascular damage caused by the presence of adult parasites are being widely studied (González-Miguel et al., 2015; Martini et al., 2019). However, there are no studies that assess the reaction of the pulmonary vasculature once the parasites are removed from the infected animal. So far, only one study has reported that no worsening or improvement in the evolution of PH was observed one month after the last dose of adulticide (Serrano-Parreño et al., 2017b). However, the authors reported that it may be necessary to wait longer after the adult worms, *Wolbachia* and the inflammatory response have been eliminated from the pulmonary arteries, before showing any significant improvement.

The results of the present study showed that the differences in the RPAD Index and, therefore, endarteritis, did not vary significantly 10 months after the death of the parasites. This suggests that, once endarteritis has developed, the vascular changes are chronic and may not be reversible. Furthermore, although the variations are not statistically significant, some of the dogs with RPAD Index > 29% on day 0 showed a decrease of the index below 29% at some point in the study (Fig. 3). Neither the parasite burden nor the presence/absence of microfilaremia influenced in the RPAD Index, similar to Serrano-Parreño et al. (2017b). A previous study showed evidence that, after eliminating adult parasites, endarteritis and intimal proliferation were partially reversed (Rawlings et al., 1981); however, the results of the present study suggest that the damage persists, at least 10 months after the elimination of the worms. Thus, more research should now be done to discover other indicators of endothelial damage and vascular remodelling, study other

parameters to determine the presence and severity of vascular damage, as well as to find ways to improve the dysfunction, similar to what is being done in human medicine (Mordi and Tzemos, 2014; 2016).

In a previous study, all dogs with heartworm showed anomalous TAPSE values, independently of the absence or presence of PH, similar to our results (Serrano-Parreño et al., 2017a). The current results showed that the TAPSE value presented significant differences between day 0 and day 120, as well as between day 0 and the end of the study. This may reflect an improvement in the systolic function of the right ventricle after the disappearance of the worms, despite the fact that no significant variation in pulmonary pressure was present. Likewise, it could also be due to an adaptation of the right ventricle to the chronic status of PH, as described in humans (Ghio et al., 2016). The presence of greater tricuspid insufficiency with maintained right ventricular systolic function may be another cause (Hsiao et al., 2006); however, in the present study, the presence of tricuspid insufficiency was not evaluated. These results could be beneficial for the patient since abnormal or low TAPSE values have been correlated with an increased risk of death in humans (Ghio et al., 2016).

The presence and severity of PH should be determined in dogs undergoing adulticide treatment. Knowing the pulmonary status could provide valuable information to help provide an objective prognosis and also to evaluate the need to add additional treatments to the patient, once the worms have been eliminated. For this, the RPAD Index has proven useful (Venco et al., 2014b; Serrano-Parreño et al., 2017a, 2017b).

The results obtained in this study point to the lack of significant improvements in the damage that occurs in the pulmonary arteries in dogs with heartworm, once the parasites have been eliminated using the recommended adulticide protocols, 10 months after the elimination of the worms. Additional research should be done to determine other indicators of endothelial damage and vascular remodelling.

All authors have participated in (a) conception and design, or analysis and interpretation of the data; (b) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (c) approval of the final version.

Declaration of Competing Interest

All authors have participated in (a) conception and design, or analysis and interpretation of the data; (b) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (c) approval of the final version.

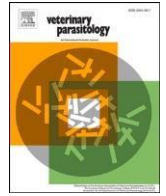
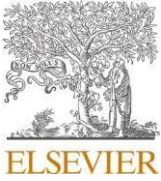
This manuscript has not been submitted to, nor is under review at, another journal or other publishing venue.

The authors have no affiliation with any organization with a direct or indirect financial interest in the subject matter discussed in the manuscript.

References

- Atwell, R.B., Buoro, I.B., Sutton, R.H., 1985. Experimental production of lesions in canine pulmonary arteries similar to those produced by *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Res.* 116, 539–541.
- Atwell, R.B., Sutton, R.H., Moodie, E.W., 1988. Pulmonary changes associated with dead filariae (*Dirofilaria immitis*) and concurrent antigenic exposure in dogs. *J. Comp. Pathol.* 98, 349–361.
- American Heartworm Society, 2018. Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs. Available at: (accessed 18.03.19). <http://www.heartwormsociety.org>.
- Bowman, D.D., Atkins, C.E., 2009. Heartworm biology, treatment, and control. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 39, 1127–1158 vii.
- Dillon, R.A., Brawner, W.R., Hanrahan, L., 1995. Influence of number of parasites and exercise on the severity of heartworm disease in dogs. In: Sol, M.D., Knight, D.H.

- (Eds.), *Proceedings of the Heartworm Symposium '95*. American Heartworm Society, Vavaria, IL, pp. 113.
- European Society of Dirofilariasis and Angiostrongylosis, 2017. Guidelines for Clinical Management of Canine Heartworm Disease. Available at: (accessed 18.03.19). <https://www.esda.vet>.
- Genchi, C., Venco, L., Genchi, M., 2007. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline dirofilariasis infections. In: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), *Dirofilaria immitis and D. repens in Dog and Cat and Human Infections*. Rolando Editore, Naples, Italy, pp. 137–144.
- Ghio, S., Pica, S., Klersy, C., Guzzafame, E., Scelsi, L., Raineri, C., Turco, A., Schirizzi, S., Viscioni, L.O., 2016. Prognostic value of TAPSE after therapy optimisation in patients with pulmonary arterial hypertension is independent of the haemodynamic effects of therapy. *Open Heart* 3, e000408. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2016-000408>.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., 2015. Can the activation of plasminogen/plasmin system of the host by metabolic products of *Dirofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis? *Parasit. Vectors* 8, 194.
- Hsiao, S.H., Lin, S.K., Wang, W.C., Yang, S.H., Gin, P.L., Liu, C.P., 2006. Severe tricuspid regurgitation shows significant impact in the relationship among peak systolic tricuspid annular velocity, tricuspid annular plane systolic excursion, and right ventricular ejection fraction. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 19, 902–910.
- Keith, J.C., Schaub, R.G., Rawlings, C., 1983. Early arterial injury-induced myointimal proliferation in canine pulmonary arteries. *Am. J. Vet. Res.* 44, 181–186.
- Martini, F., Eckmair, B., Štefanić, S., Jin, C., Garg, M., Yan, S., Jiménez-Castells, C., Hykollari, A., Neupert, C., Venco, L., Varón Silva, D., Wilson, I.B.H., Paschinger, K., 2019. Highly modified and immunoreactive N-glycans of the canine heartworm. *Nat. Commun.* 10, 75.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* 66, 193–285.
- Méndez, J.C., Carretón, E., Martínez-Subiela, S., Tvarijonavičiute, A., Cerón, J.J., Montoya-Alonso, J.A., 2015. Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment. *Vet. Parasitol.* 209, 197–201.
- Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Morchón, R., Silveira-Viera, L., Falcón, Y., Simón, F., 2016. The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. *Vet. Parasitol.* 216, 66–71.
- Mordi, I., Mordi, N., Delles, C., Tzemos, N., 2016. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. *J. Hypertens.* 34, 1464–1472.
- Mordi, I., Tzemos, N., 2014. Is reversal of endothelial dysfunction still an attractive target in modern cardiology? *World J. Cardiol.* 6, 824–835.
- Munnell, J.F., Weldon, J.S., Lewis, R.E., Thrall, D.E., McCall, J.W., 1980. Intimal lesions of the pulmonary artery in dogs with experimental dirofilariasis. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1108–1112.
- Rawlings, C.A., Keith, J.C., Schaub, R.G., 1981. Development and resolution of pulmonary disease in heartworm infection: illustrated review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 17, 711–720.
- Sasaki, Y., Kitagawa, H., Hirano, Y., 1992. Relationship between pulmonary arterial pressure and lesions in the pulmonary arteries and parenchyma, and cardiac valves in canine dirofilariasis. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 739–744.
- Schaub, R.G., Rawlings, C.A., Keith, J.C., 1981. Platelet adhesion and myointimal proliferation in canine pulmonary arteries. *Am. J. Pathol.* 104, 13–22.
- Serrano-Parreño, B., Carretón, E., Caro-Vadillo, A., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Montoya-Alonso, J.A., 2017a. Evaluation of pulmonary hypertension and clinical status in dogs with heartworm by right pulmonary artery distensibility index and other echocardiographic parameters. *Parasit. Vectors* 10, 106.
- Serrano-Parreño, B., Carretón, E., Caro-Vadillo, A., Falcón-Cordón, S., Falcón-Cordón, Y., Montoya-Alonso, J.A., 2017b. Pulmonary hypertension in dogs with heartworm before and after the adulticide protocol recommended by the American heartworm society. *Vet. Parasitol.* 236, 34–37.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 507–544.
- Uchida, T., Saida, K., 2005. Elevated endothelin-1 expression in dogs with heartworm disease. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 1155–1161.
- Venco, L., Bertazzolo, W., Giordano, G., Paltrinieri, S., 2014a. Evaluation of C-reactive protein as a clinical biomarker in naturally heartworm-infected dogs: a field study. *Vet. Parasitol.* 206, 48–54.
- Venco, L., Genchi, C., Vigevani Colson, P., Kramer, L., 2003. Relative utility of echocardiography, radiography, serologic testing and microfilariae counts to predict adult worm burden in dogs naturally infected with heartworms. In: Seward, R.L., Knight, D.H. (Eds.), *Recent Advances in Heartworm Disease. Symposium '01*. American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 111–124.
- Venco, L., Mihaylova, L., Boon, J.A., 2014b. Right pulmonary artery distensibility index (RPAD index). A field study of an echocardiographic method to detect early development of pulmonary hypertension and its severity even in the absence of regurgitant jets for doppler evaluation in heartworm-infected dogs. *Vet. Parasitol.* 206, 60–66.
- Visser, L.C., Im, M.K., Johnson, L.R., Stern, J.A., 2016. Diagnostic value of right pulmonary artery distensibility index in dogs with pulmonary hypertension: comparison with doppler echocardiographic estimates of pulmonary arterial pressure. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 543–552.



Evaluation of acute phase proteins, adiponectin and endothelin-1 to determine vascular damage in dogs with heartworm disease (*Dirofilaria immitis*), before and after adulticide treatment

Y. Falcón-Cordón^a, A. Tvarijonaviciute^b, J.A. Montoya-Alonso^a, A. Muñoz-Prieto^b, A. Carro-Vadillo^c, E. Carretón^{a,*}

^a Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Research Institute of Biomedical and Health Sciences (IUIBS), University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

^b Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis (Interlab-UMU), Veterinary School, Regional Campus of International Excellence Mare Nostrum, University of Murcia, Spain

^c Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Dirofilaria immitis
Pulmonary hypertension
Proliferative endarteritis
Acute phase response
Endothelin
Adiponectin

ABSTRACT

Previous studies have shown the existence of an acute phase response in dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*), probably caused by the vascular inflammation that occurs during the pathogenesis of this disease. In addition, it has been seen that this acute phase response persists after finishing treatment, especially in dogs with pulmonary hypertension (PH). Furthermore, echocardiographic studies have shown that PH and endarteritis appear to persist for at least 10 months after completion of adulticide treatment, suggesting that the vascular changes in these dogs may not be reversible. Therefore, the objective of this study was to evaluate the serum concentrations of different positive acute phase proteins (APP) [C reactive-protein (CRP), haptoglobin and ferritin] and negative APP (albumin and paraoxonase-1 (PON-1)), and the usefulness of the endothelin-1 (ET-1) and adiponectin, in dogs infected by *D. immitis* to evaluate their usefulness as diagnostic biomarkers of vascular damage and PH and their progression throughout therapy up to 7 months after the end of adulticide treatment. Twenty-five heartworm-infected dogs received adulticide treatment, and serum measurements were performed on the day of diagnosis (day 0), day of discharge (day 90), and 6 months after discharge (day 270). In addition, presence or absence of PH was also echocardiographically determined using the Right Pulmonary Artery Distensibility Index. PH was present in 44% of the dogs on day 0 and day 90, and in 48% of dogs on day 270. Alterations were observed in the concentrations of all APP throughout the study, persisting the alterations in PON-1 and ferritin on day 270. Depending on the presence or absence of PH, CRP showed significant differences throughout the study, as did ET-1. On the other hand, adiponectin did not show variations throughout the study, so it did not seem a useful marker in this disease. These results could reflect the possible persistence of vascular inflammation up to 7 months after finishing treatment, whether or not there was PH, and consolidate the study of APP as useful markers in heartworm disease. Moreover, persistent PH could be the consequent clinical manifestation in dogs with more severe vascular alterations so the study of APP, especially CRP, and ET-1 could be especially advantageous in these patients in the early evaluation of the disease, as well as for the determination of disease severity, monitoring therapeutic responses, and predicting outcomes.

1. Introduction

Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) is characterised by the damage caused by the presence of adult worms in the pulmonary arteries and right heart chambers. As soon as they reach their final

location, their presence initiates the production of proliferative endarteritis, causing the onset of vascular remodelling that will chronically produce a series of pathological alterations, mainly pulmonary hypertension (PH) and heart failure (Simón et al., 2012; McCall et al., 2008a, 2008b; Ames and Atkins, 2020) This pathogenic reaction is caused both

* Correspondence to: Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas (Las Palmas), Spain.
E-mail address: elena.carreton@ulpgc.es (E. Carretón).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109759>

Received 1 June 2022; Received in revised form 21 June 2022; Accepted 23 June 2022

Available online 25 June 2022

0304-4017/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

by the presence of adult worms and by the endosymbiont bacterium *Wolbachia pipientis*, which triggers the release of pro-inflammatory and chemotactic cytokines, inducing cell infiltration and amplification of the inflammatory response (Kramer et al., 2008; McCall et al., 2008a, 2008b). PH is one of the most serious complications that can occur in dogs with heartworm disease and for this reason many studies have focused on its diagnosis and assessment, mainly by using diagnostic imaging or serological techniques (Vencko et al., 2014b; Carretón et al., 2017; Serrano-Parreño et al., 2017a).

These vascular and inflammatory alterations have also been observed through the existence of an acute phase response in dogs with heartworm (Vencko et al., 2014a; Méndez et al., 2014, 2015; Carretón et al., 2017). It was reported that some positive and negative acute phase proteins (APP) were pathologically increased or decreased, respectively, in those dogs with PH, both at the time of diagnosis and at the end of adulticide treatment (Vencko et al., 2014a; Carretón et al., 2017). These studies showed the possibility that APP, especially C-reactive protein (CRP), could be used to stage and monitor heartworm disease in dogs and that could also serve as an early biomarker of PH.

Endothelin-1 (ET-1) is a biomarker that has also been shown to be useful in detecting the presence of PH in dogs, both in heartworm disease and in other pathologies (Barman and Isales, 1998; Uchida and Saida, 2005; Hanazono et al., 2016). ET-1 is a powerful vasoconstrictor and promoter of cell proliferation, causing chronic structural changes that lead to cardiopulmonary tissue remodelling and, therefore, a promoter of the development of PH in dogs and humans (Galié et al., 2004; Shao et al., 2011). Furthermore, it has been observed that ET-1 concentrations strongly correlated with the severity of PH (Rubens et al., 2001; Chester and Yacoub, 2014).

Adiponectin is a factor derived from adipocytes that exists in high concentrations in serum and presents systemic vascular anti-inflammatory and protective properties (Ouchi and Walsh, 2007; Villarreal-Molina and Antuna-Puente, 2012). Previous studies have reported that adiponectin has shown an important role in inflammation and remodelling of the pulmonary vasculature and the development of PH in animal models (Matsuda et al., 2002; Medoff et al., 2009; Weng et al., 2010). For this reason, the evaluation of this biomarker is proposed in this study.

Previous studies have shown that PH persists in dogs with heartworm disease, at least up to 10 months after the end of adulticide treatment, demonstrating that this endarteritis may not be reversible after the removal of the parasites (Falcón-Cordón et al., 2019). Thus, given the severity and high prevalence of PH in dogs with heartworm, it would be of interest to carry out more studies focused on the diagnosis and follow-up of PH in these dogs. Therefore, the objective of this study was to evaluate the serum concentrations of different positive APP [CRP, (haptoglobin and ferritin) and negative APP albumin and paraoxonase-1 (PON-1)], as well as ET-1 and adiponectin, in dogs infected by *D. immitis* to evaluate their usefulness as diagnostic biomarkers of vascular damage and PH, and their progression throughout therapy up to 6 months after the end of adulticide treatment.

2. Materials and methods

The study included 25 heartworm-infected dogs living in a hyper-endemic area of *D. immitis* (Montoya-Alonso et al., 2016, 2020). None of the animals had received previous treatment for heartworm infection. A complete record was kept for each animal, including identification (age, sex, and breed), clinical history and demographic data. A complete anamnesis and examination was performed on each patient to rule out the presence of other pathologies that could affect the results; animals with concomitant diseases were excluded from the study. Their body condition was determined based on the nine-scale body condition scoring system, with 1 corresponding to underweight and 9 to obesity (Laflamme, 1997). All were positive to circulating *D. immitis* antigens using a commercial immunochromatographic test kit (Urano test

Dirofilaria®, Urano Vet SL, Barcelona, Spain).

The infected dogs were subjected to adulticide treatment following the treatment protocol recommended by the international Heartworm Societies, applying the recently proposed modifications (European Society of Dirofilariasis and Angiostrongylosis, 2017; American Heartworm Society, 2018; Carretón et al., 2019). In summary, on day 0 the dog is diagnosed and begins the administration of doxycycline (10 mg / kg BID) for 4 weeks and the monthly preventive against heartworm in oral tablets based on ivermectin (6 µg/kg of ivermectin and 5 mg/kg of pyrantel pamoate). On days 30, 60 and 61 the dog is treated with intramuscular doses of melarsomine (2.5 mg / kg). On day 90, the dog is examined and discharged if no abnormalities are found (echocardiographic presence of adult parasites, radiographic abnormalities or cardiorespiratory symptoms). On day 270, 6 months after patient discharge, adulticidal efficacy was confirmed with an antigen detection test. Exercise restriction is recommended throughout treatment, especially from the first dose of melarsomine until the day of discharge.

On the day of diagnosis (day 0), at the end of the treatment (day 90), and 6 months after discharge (day 270), the dogs were subjected to an echocardiographic examination using an ultrasound equipment with spectral and colour Doppler and multi-frequency probes (5.5–10 MHz) (Logic P5, General Electric, New York, United States). The presence or absence of PH was determined using the Right Pulmonary Artery Distensibility Index (RPAD Index) as previously described (Vencko et al., 2014b; Visser et al., 2016; Serrano-Parreño et al., 2017a). The presence of visible adult worms in the pulmonary arteries and the right heart chambers was also assessed by echocardiography. Dogs were further evaluated for the presence or absence of microfilariae using a modified Knott test.

Blood was drawn from the cephalic vein of each animal on day 0, day 90, and day 270, to measure CRP, haptoglobin, ferritin, albumin, PON-1, adiponectin, and ET-1. Blood was collected in tubes without anticoagulant, serum was obtained and frozen (−20 °C) until analysis. CRP concentrations were measured using a human immunoturbidimetric test (CRP OSR 6147 Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Lismeehan, O'Callaghan Mills, Co. Clare, Ireland), haptoglobin concentrations were measured using a colorimetric method (haptoglobin kit Trideltaphase range, Tridelta Development Ltd.), albumin was determined using a bromocresol green reagent [Albumin OSR 6102 Olympus Life and Material Science Europe GmbH (Irishbranch) Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland], PON-1 activity was determined using p-nitrophenyl acetate as substrate, and ferritin concentrations were measured using an immunoturbidimetric assay with polyclonal anti-human ferritin antibodies (Tina-quant Ferritin, Boehringer Mannheim, Germany). For the determination of adiponectin, the commercially available canine sandwich ELISA (Canine Adiponectin ELISA Kit; Millipore, St. Charles, Missouri, USA) was used. ET-1 was determined by using the kit Endothelin (1–21) EIA (ALPCO Diagnostics, Windham, NH). All techniques had been previously validated for use in dogs (Prosek et al., 2004; Caldin et al., 2009; Martínez-Subiela and Cerón, 2005; Tvarijonavičiute et al., 2010, 2012; Martínez-Subiela et al., 2014).

The results were analysed using the SPSS Base 22.0 software for Windows. The non-parametrical Mann-Whitney U test was used to compare results obtained for dogs negative and positive to heartworm disease and also for the comparison between diseased dogs with PH and without PH. Wilcoxon signed rank test was used to compare the results obtained for the different analytes at three different times (day 0 - day 90 - day 270). In all cases, a p value < 0.05 was determined as significant.

For this study, no ethical approvals were required, since all blood samples were routinely collected for official diagnostic and monitoring purposes and subsequently made available to this study. The study was carried out in accordance with the current Spanish and European legislation on animal protection.

3. Results

Of the dogs that participated in the study, 15 (60%) were female and 10 (40%) were male, with an age between 2 and 10 years (mean: 4.3 years) and an average body condition of 4.3. The modified Knott test showed 12 (48%) dogs with circulating microfilariae. Absence or presence of PH, as well as PH severity, was based on the determination of the RPAD index, and an index < 29% was correlated with PH (Visser et al., 2016). On day 0 of the study, 11 (44%) of the dogs had PH with a mean RPDA index of 21.6%.

All dogs tolerated adulticide treatment with no adverse reactions or showing mild symptoms which did not require treatment or close monitoring. At the end of the treatment (day 90), all the dogs presented absence of microfilariae and no worms were visualised by echocardiography in any of the studied dogs. Animals presented an average body condition of 5.4. Moreover, 11 (44%) presented PH with a mean RPAD index of 21.9%. Six months after discharge (day 270), all dogs had a negative antigen test; furthermore, the absence of microfilariae in the Knott test and adult worms in the echocardiographic study persisted. PH was present in 12 (48%) of them, with a mean RPAD of 22% while their average body condition was 5.2. No significant differences were found in body condition between dogs with PH and dogs without PH on day 0, 90 and 270.

The results obtained in the serological measurements can be seen in Table 1. On day 0 of the study, the concentrations of the APP CRP and ferritin were significantly above the reference values (p = 0.001 for both), and the concentrations of albumin and PON-1 were significantly

Table 1
Serum concentrations of the different biomarkers studied, in the total number of dogs evaluated, and divided according to the presence or absence of pulmonary hypertension. Results expressed as mean ± standard deviation.

Biomarkers	Animals	Day 0	Day 90	Day 270
CRP (µg/mL)	Total dogs	18.3 ± 14.2	7.2 ± 7.7	4.7 ± 4.5
	Pulmonary hypertension	24.6 ± 15.9	10.2 ± 10	6.5 ± 5.9
	Normotense	13.3 ± 10.8	4.9 ± 4.5	3.1 ± 1.8
Haptoglobin (mg/dL)	Total dogs	233.2 ± 153.1	319.1 ± 131.6	229.4 ± 159.4
	Pulmonary hypertension	248.1 ± 158.8	338.3 ± 126.1	265.9 ± 169.4
	Normotense	221.6 ± 153.4	303.9 ± 138.5	195.7 ± 148.2
Ferritin (µg/L)	Total dogs	242.7 ± 221.6	186.2 ± 80.4	170.9 ± 71.3
	Pulmonary hypertension	274.6 ± 203.7	178.4 ± 103.1	153.6 ± 58.5
	Normotense	217.6 ± 239.3	192.3 ± 60.5	186.8 ± 80.3
PON1 (IU/mL)	Total dogs	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.5
	Pulmonary hypertension	1.6 ± 0.5	1.9 ± 0.6	2.0 ± 0.4
	Normotense	1.7 ± 0.4	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.5
Albumin (g/dL)	Total dogs	2.8 ± 0.3	2.9 ± 0.4	3.2 ± 0.5
	Pulmonary hypertension	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.3 ± 0.2
	Normotense	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.6	3.1 ± 0.7
Adiponectin (µg/L)	Total dogs	17.3 ±	14.8 ± 9.4	18 ± 11.5
	Pulmonary hypertension	16.4		

below the reference values (p = 0.002 and p = 0.000, respectively). Only the haptoglobin concentrations, although increased, did not differ significantly from the reference values.

Figs. 1 and 2 shows the evolution of the APP studied throughout the study. On day 90, only albumin presented concentrations similar to the reference values; the concentrations of CRP (p = 0.002), haptoglobin (p = 0.009) and ferritin (p = 0.002) remained increased, while the concentrations of PON-1 remained significantly low (p = 0.000). When compared to day 0, a marked decrease in CRP and an elevation in haptoglobin were observed (p = 0.006 for both); the rest of the APP studied did not show statistically significant differences with respect to the concentrations obtained on day 0.

On day 270 it was observed that ferritin remained above (p = 0.006) and PON-1 below (p = 0.000) reference values. On the other hand, albumin also appeared significantly increased (p = 0.014). When compared to the concentrations obtained on day 90, there were statistically significant differences in the concentrations of albumin (p = 0.031) and haptoglobin (p = 0.023), while the concentrations of the rest of the APP evaluated remained at similar values.

When the dogs were evaluated according to whether or not they presented PH, it was observed that throughout the entire study, only increased CRP concentrations on day 0 (p = 0.044), the day of discharge (p = 0.038) and 6 months later (p = 0.03), as well as decreased albumin concentrations the day of discharge (p = 0.038), showed significant differences between both groups.

On the other hand, adiponectin and ET-1 concentrations did not vary throughout the 3 time point measurements (Fig. 2). Likewise, adiponectin concentrations did not show significant variations between dogs with presence or absence of PH in any of the measurements. However, in the case of ET-1, concentrations were significantly higher in dogs that presented PH on day 0 (p = 0.001), day 90 (p = 0.001) and day 240 (p = 0.007).

4. Discussion

Previous studies have already shown the existence of an acute

response in dogs with heartworm disease before beginning the treatment, probably caused by the vascular inflammation that occurs during the pathogenesis of this disease. Thus, previous results showed eleva-

tions of the positive APP CRP and decrease of the negative APP PON-1 and albumin (Méndez et al., 2014, 2015). The results obtained in this

study support those previously obtained, consolidating the study of APP as useful markers in heartworm disease. In the case of haptoglobin, a

paradoxical decrease has always been observed in canine heartworm attributed to the possible presence of haemolytic anaemia (Méndez et al., 2014, 2015); although in this study is not statistically significant, the decrease is still observed.

Ferritin was evaluated for the first time in canine heartworm. The

results show that the concentrations of this positive APP were also

increased in canine heartworm disease, showing a moderate increase (2-3 times greater than the upper reference value). Ferritin is a ubiquitous iron storage protein and considered as an APP although the

precise mechanism underlying increases in serum ferritin is not well understood (Torti and Torti, 2002; Mahroum et al., 2022). Ferritin has been studied in other parasitic diseases, such as *Leishmania*, in which hyperferritinemia was found (Martinez-Subiela et al., 2014; Pardo-Marin et al., 2020).

On the day of discharge, the behaviour of the APPs was similar to

	hypertension	15.9 ± 18.6	14.7 ± 8.0	16 ± 8.2
	Normotense	18.3 ±	14.8 ±	19.8 ±
Endothelin (pg/ mL)	Total dogs	15.2 33.3 ± 34.6	10.7 33.5 ± 31.7	14.0 37.2 ± 39.3
	Pulmonary			
	hypertension	52.5 ± 35.1	58.8 ± 29.5 13.7 ±	55.0 ± 39.5 20.8 ±
	Normotense	18.3 ± 26.6	14.6	32.5

previous studies, in which significant changes were observed in CPR and haptoglobin, including the paradoxical increase in haptoglobin at the end of adulticide treatment (Mendez et al., 2015; Carretón et al., 2017) and, except for albumin, values significantly different from the reference values persisted. Regarding ferritin, the increased values persisted.

These results show the persistence of vascular inflammation caused by the presence of the parasite; furthermore, thromboembolic processes may still be occurring.

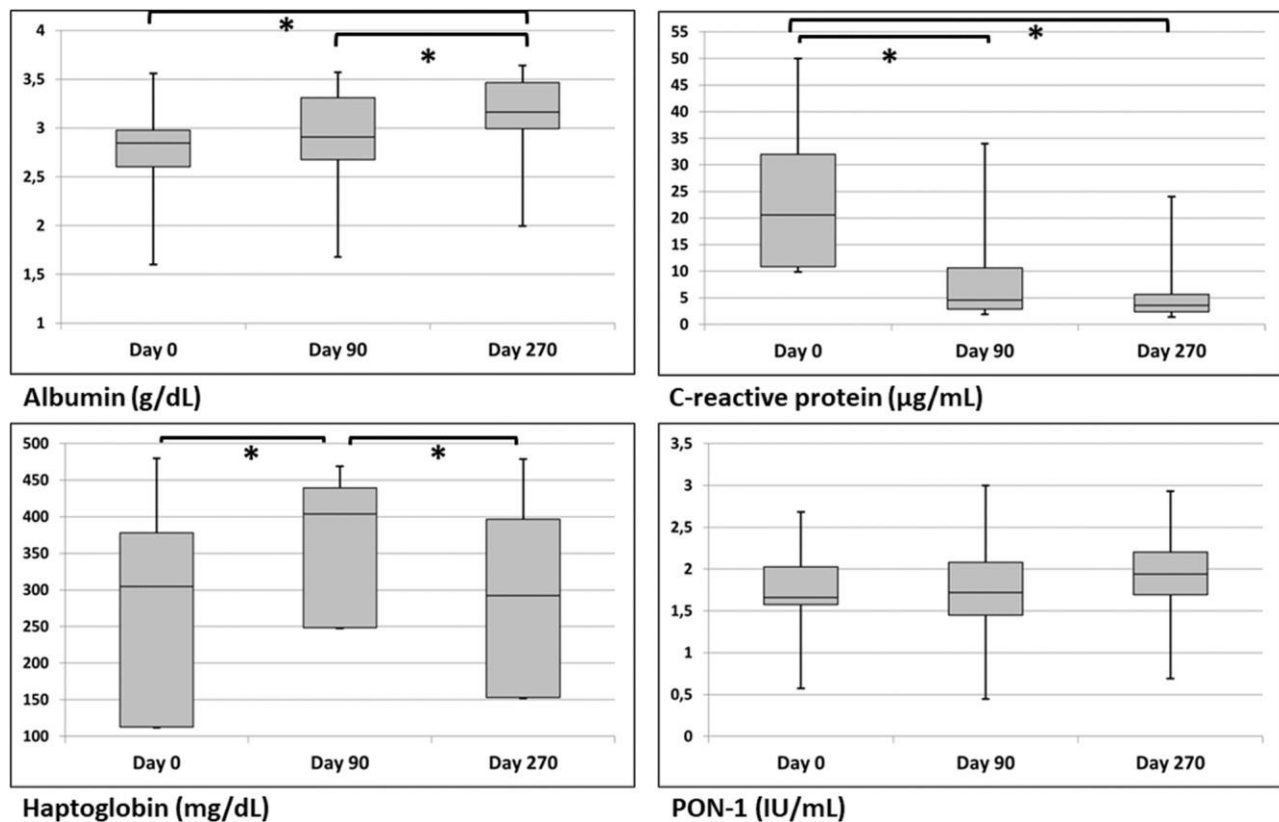


Fig. 1. Serum concentrations of albumin, C-reactive protein, haptoglobin and PON-1 on day 0, day 90 and day 270. The box plots represent median (solid horizontal lines within boxes), 25th and 75th percentiles (boxes) and minimum and maximum values (whiskers). (*): significant differences between groups.

The alterations in ferritin and PON-1 persisted on day 270, indicating that there is still a constant inflammatory component 6 months after the patient is discharged. Noting that remodelled pulmonary arteries often demonstrate inflammation (Farber and Loscalzo, 2005), and that the vascular changes seem to be chronic and not reversible in heartworm-treated dogs (Serrano-Parreño et al., 2017b; Falcón-Cordón et al., 2019), the measurement of APP could be useful to evaluate these patients in the long term. It is the first time that APP have been evaluated in dogs several months after the end of the treatment, so it would be necessary to carry out more studies to determine the repetition of these results.

When the results were evaluated based on the presence or absence of PH, it was observed that CPR appeared significantly higher in dogs with PH, as previously described (Venco et al., 2014a; Carretón et al., 2017). Furthermore, it has also been observed that on the day of discharge, dogs that had PH showed significant increases in CRP concentrations, also previously described (Carretón et al., 2017; Serrano-Parreño et al., 2017b), which is indicative of persistence of the vascular damage one month after the end of the adulticide treatment. Moreover, despite CRP concentrations were within the reference values on day 270, it was observed that the CRP remained significantly elevated in hypertensive dogs.

Adiponectin is a known modulator of pulmonary vascular remodeling (Medoff, 2013), and various studies have shown that there is an enhanced inflammation and vascular remodelling in the vasculature in animal models with adiponectin deficiency, suggesting that adiponectin deficiency could play a role significant in the development of arterial remodelling and PH (Matsuda et al., 2002; Medoff et al., 2009; Weng et al., 2010). However, association between plasma adiponectin levels and PH had not been studied in canine heartworm. Moreover, is an inflammatory cytokine and is involved in the modulation of inflammation and the immune response (Berg and Scherer, 2005) acting as a negative

APP during inflammatory conditions (Tvarijonaviute et al., 2011). In this study, no difference was observed in adiponectin concentrations between dogs with or without PH, nor significant evolution in time. Since there were no significant differences in the body condition of the dogs with or without PH, the influence of obesity on the results can be ruled out, so the results obtained suggest that this biomarker has limited utility in this disease.

ET-1 concentrations did not vary significantly throughout treatment; however, in all time points a significant increase was detected in dogs with PH. Another previous study determined the usefulness of ET-1 to detect PH in canine heartworm (Uchide and Saida, 2005). The results of this study seem to corroborate the convenience of this biomarker in determining PH, and suggest that ET-1 plays an important role in the pathophysiology of canine heartworm as an aggravating factor by inducing PH. The presence of ET-1 in dogs with heartworm may be the result of the immunological reaction against the parasite, with the release of cytokines, as well as hypoxia and physical stress due to their presence which would consequently cause PH (Barton and Yanagisawa, 2019). As discussed before, previous studies carried out by diagnostic imaging techniques have shown that PH persists in the patient once the parasite has been eliminated (Serrano-Parreño et al., 2017b; Falcón-Cordón et al., 2019); therefore, it is possible that the ET-1 values had remained constant in these animals even after elimination of the parasites. Therefore, this biomarker may be useful in the clinical evaluation of PH in heartworm. To know the true usefulness of this biomarker, it is necessary to carry out more studies assessing this biomarker, and comparing it with reference values in healthy animals.

In conclusion, the results suggest the persistence of vascular damage in dogs in the long term after finishing treatment, so that persistent PH could be the clinical manifestation observed in dogs with more severe vascular alterations (Serrano-Parreño et al., 2017b; Falcón-Cordón et al., 2019). The alterations in some APP confirm that heartworm disease has

CRediT authorship contribution statement

Y. Falcón-Cordón: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft. **A. Tvarijonavičiute:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft, Supervision of the research. **J.A. Montoya-Alonso:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft, Supervision of the research. **A. Muñoz-Prieto:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft. **A. Caro-Vadillo:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft, Formal analysis of the data. **E. Carretón:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft, Supervision of the research.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank UranoVet for providing the heartworm diagnostic tests.

References

- American Heartworm Society, 2018. Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs. Available at: <http://www.heartwormsociety.org>. (Accessed 24 May 2022).
- Ames, M.K., Atkins, C.E., 2020. Treatment of dogs with severe heartworm disease. *Vet. Parasitol.* 283, 109131.
- Barman, S.A., Isales, C.M., 1998. Fenfluramine potentiates canine pulmonary vasoreactivity to endothelin-1. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 11, 183-187.
- Barton, M., Yanagisawa, M., 2019. Endothelin: 30 years from discovery to therapy. *Hypertension* 74, 1232-1265.
- Berg, A.H., Scherer, P.E., 2005. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 96, 939-949.
- Caldin, M., Tasca, S., Carli, E., Bianchini, S., Furlanello, T., Martínez-Subiela, S., Cerón, J., 2009. Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Vet. Clin. Pathol.* 38, 63-68.
- Carretón, E., Cerón, J.J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonavičiute, A., Caro-Vadillo, A., Montoya-Alonso, J.A., 2017. Acute phase proteins and markers of oxidative stress to assess the severity of the pulmonary hypertension in heartworm-infected dogs. *Parasit. Vectors* 10 (Suppl. 2), S477.
- Carretón, E., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Morchón, R., Matos, J.I., Montoya-Alonso, J.A., 2019. Variation of the adulticide protocol for the treatment of canine heartworm infection: can it be shorter? *Vet. Parasitol.* 271, 54-56.
- Chester, A.H., Yacoub, M.H., 2014. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2014, 62-78.
- European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017. Guidelines for Clinical Management of Canine Heartworm Disease. Available at: <http://www.esda.vet>. (Accessed 25 May 2022).
- Falcón-Cordón, Y., Montoya-Alonso, J.A., Caro-Vadillo, A., Matos-Rivero, J.I., Carretón, E., 2019. Persistence of pulmonary endarteritis in canine heartworm infection 10 months after the eradication of adult parasites of *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* 273, 1-4.
- Farber, H.W., Loscalzo, J., 2005. Mechanism of disease: pulmonary hypertension. *Discov. Med.* 5, 80-87.
- Galié, N., Manes, A., Branzi, A., 2004. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc. Res.* 61, 227-237.
- Hanazono, K., Fukumoto, S., Ogawa, Y., Yoshida, T., Yoshida, K., Iwano, H., Miyasho, T., Uchide, T., 2016. An attempt to detect pulmonary hypertension in canine mitral valve disease with tricuspid valve regurgitation on serum big endothelin-1 concentrations. *Adv. Anim. Cardiol.*, 49, pp. 1-9.
- Kramer, L., Grandi, G., Leoni, M., Passeri, B., McCall, J., Genchi, C., Mortarino, M., Bazzocchi, C., 2008. Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Parasitol.* 158, 191-195.
- Laflamme, D., 1997. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Pract.* 22, 10-15.
- Mahroum, N., Alghory, A., Kiyak, Z., Alwani, A., Seida, R., Alrais, M., Shoenfeld, Y., 2022. Ferritin - from iron, through inflammation and autoimmunity, to COVID-19. *J. Autoimmun.* 126, 102778.
- Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J., Strauss-Ayali, D., García-Martínez, J.D., Teclés, F., Tvarijonavičiute, A., Caldin, M., Baneth, G., 2014. Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniasis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 23-29.

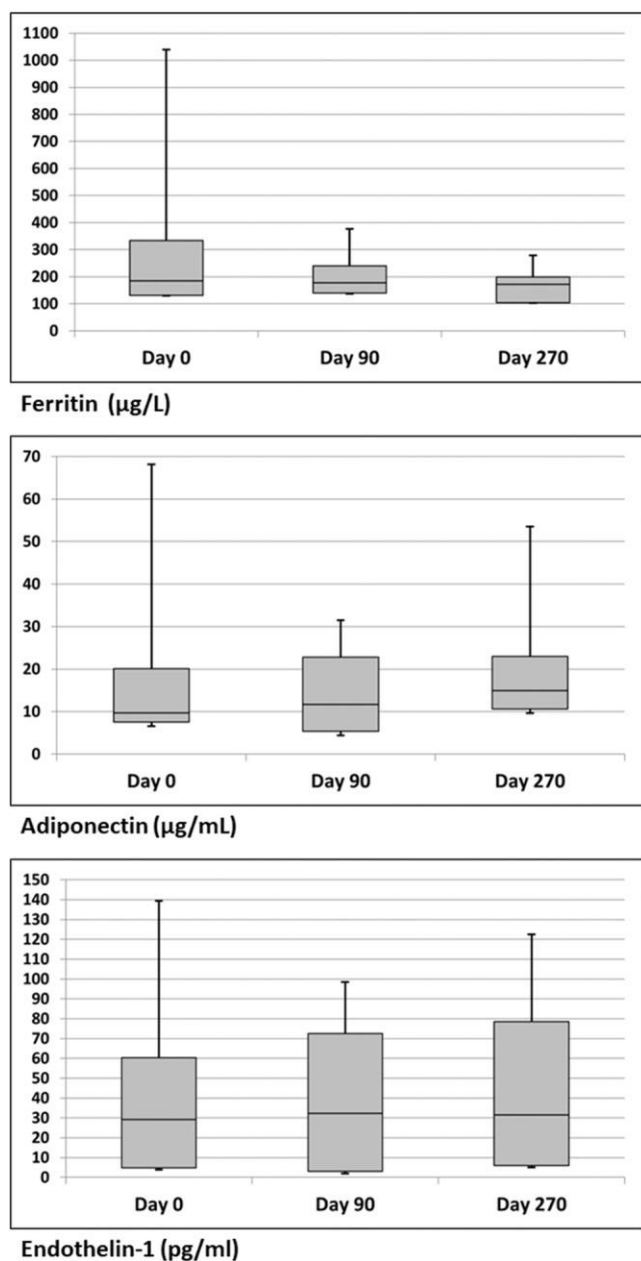


Fig. 2. Serum concentrations of ferritin, adiponectin and endothelin-1 on day 0, day 90 and day 270. The box plots represent median (solid horizontal lines within boxes), 25th and 75th percentiles (boxes) and minimum and maximum values (whiskers). (*): significant differences between groups.

a strong inflammatory component and that part of the inflammatory component of the disease is likely to persist for at least 6 months after discharge, whether or not there is PH. In addition, the persistence of PH previously described by diagnostic imaging techniques is confirmed serologically with the presence of higher levels of endothelin-1 and, possibly, higher concentrations of CRP. So, the clinical use of these biomarkers could play an important role in the early evaluation of the disease, as well as for the determination of disease severity, monitoring therapeutic responses, and predicting outcomes of these patients.

Funding

This research has been financed with own funds from the Servicio Medicina Veterinaria FULP/ULPGC SD-240/030/0026.

- Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J., 2005. Validation of commercial assays for the determination of haptoglobin, C-reactive protein and serum amyloid A in dogs. *Arch. Med. Vet.* 37, 61–66.
- Matsuda, M., Shimomura, I., Sata, M., Arita, Y., Nishida, M., Maeda, N., Kumada, M., Okamoto, Y., Nagaretani, H., Nishizawa, H., Kishida, K., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Nagai, R., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., 2002. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipovascular axis. *J. Biol. Chem.* 277, 37487–91.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J., Dzimiński, M.T., Supakorndej, P., Mansour, A.M., McCall, S.D., Supakorndej, N., Grandi, G., Carson, B., 2008a. Heartworm and *Wolbachia*: therapeutic implications. *Vet. Parasitol.* 158, 204–214.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008b. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* 66, 193–285.
- Medoff, B.D., 2013. Fat, fire and muscle—the role of adiponectin in pulmonary vascular inflammation and remodeling. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 26, 420–426.
- Medoff, B.D., Okamoto, Y., Leyton, P., Weng, M., Sandall, B.P., Raheer, M.J., Kihara, S., Bloch, K.D., Libby, P., Luster, A.D., 2009. Adiponectin deficiency increases allergic airway inflammation and pulmonary vascular remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 397e406.
- Méndez, J.C., Carretón, E., Martínez, S., Tvarijonavičiute, A., Cerón, J.J., Montoya-Alonso, J.A., 2014. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* 204, 420–425.
- Méndez, J.C., Carretón, E., Martínez-Subiela, S., Tvarijonavičiute, A., Cerón, J.J., Montoya-Alonso, J.A., 2015. Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment. *Vet. Parasitol.* 209, 197–201.
- Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Morchón, R., Silveira-Viera, L., Falcón, Y., Simón, F., 2016. The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. *Vet. Parasitol.* 216, 66–71.
- Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., Costa-Rodríguez, N., Matos, J.J., Falcón-Cordón, Y., Carretón, E., 2020. Current distribution of selected vector-borne diseases in dogs in Spain. *Front. Vet. Sci.* 7, 564429.
- Ouchi, N., Walsh, K., 2007. Adiponectin as an antiinflammatory factor. *Clin. Chim. Acta* 380, 24–30.
- Pardo-Marin, L., Cerón, J.J., Tecles, F., Baneth, G., Martínez-Subiela, S., 2020. Comparison of acute phase proteins in different clinical classification systems for canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 219, 109958.
- Prosek, R., Sisson, D.D., Oyama, M.A., Biondo, A.W., Solter, P.F., 2004. Plasma endothelin-1 immunoreactivity in normal dogs and dogs with acquired heart disease. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 840–844.
- Rubens, C., Ewert, R., Halank, M., Wensel, R., Orzechowski, H.D., Schultheiss, H.P., Hoeffken, G., 2001. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* 120, 1562–1569.
- Serrano-Parreño, B., Carretón, E., Caro-Vadillo, A., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Montoya-Alonso, J.A., 2017a. Evaluation of pulmonary hypertension and clinical status in dogs with heartworm by Right Pulmonary Artery Distensibility Index and other echocardiographic parameters. *Parasit. Vectors* 10, 106.
- Serrano-Parreño, B., Carretón, E., Caro-Vadillo, A., Falcón-Cordón, S., Falcón-Cordón, Y., Montoya-Alonso, J.A., 2017b. Pulmonary hypertension in dogs with heartworm before and after the adulticide protocol recommended by the American Heartworm Society. *Vet. Parasitol.* 236, 34–37.
- Shao, D., Park, J.E., Wort, S.J., 2011. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol. Res.* 63, 504–511.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 507–544.
- Torti, F.M., Torti, S.V., 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99, 3505–3516.
- Tvarijonavičiute, A., Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J., 2010. Validation of 2 commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for adiponectin determination in canine serum samples. *Can. J. Vet. Res.* 74, 279–285.
- Tvarijonavičiute, A., Eralp, O., Kocaturk, M., Yilmaz, Z., Cerón, J.J., 2011. Adiponectin and IGF-1 are negative acute phase proteins in a dog model of acute endotoxaemia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140, 147–151.
- Tvarijonavičiute, A., Tecles, F., Caldin, M., Tasca, S., Cerón, J.J., 2012. Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 73, 34–41.
- Uchida, T., Saida, K., 2005. Elevated endothelin-1 expression in dogs with heartworm disease. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 1155–1161.
- Venco, L., Bertazzolo, W., Giordano, G., Paltrinieri, S., 2014a. Evaluation of C-reactive protein as a clinical biomarker in naturally heartworm-infected dogs: a field study. *Vet. Parasitol.* 206, 48–54.
- Venco, L., Mihaylova, L., Boon, J.A., 2014b. Right Pulmonary Artery Distensibility Index (RPAD Index). A field study of an echocardiographic method to detect early development of pulmonary hypertension and its severity even in the absence of regurgitant jets by Doppler evaluation in heartworm-infected dogs. *Vet. Parasitol.* 206, 60–66.
- Villarreal-Molina, M.T., Antuna-Puente, B., 2012. Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie* 94, 2143–2149.
- Visser, L.C., Im, M.K., Johnson, L.R., Stern, J.A., 2016. Diagnostic value of right pulmonary artery distensibility index in dogs with pulmonary hypertension: comparison with Doppler echocardiographic estimates of pulmonary arterial pressure. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 543–552.
- Weng, M., Raheer, M.J., Leyton, P., Combs, T.P., Scherer, P.E., Bloch, K.D., Medoff, B.D., 2010. Adiponectin decreases pulmonary arterial remodeling in mouse models of pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 340–347.

CONCLUSIONES

1. Los resultados muestran la utilidad potencial del ratio PT:Ao (tronco pulmonar: aorta), utilizando las relaciones PT:AoA (tronco pulmonar: aorta ascendente) o PT:AoD (tronco pulmonar: aorta descendente), para diagnosticar hipertensión pulmonar de moderada a grave en perros con dirofilariosis cardiopulmonar. Aunque el índice de distensibilidad de la arteria pulmonar derecha sigue siendo el método estándar de elección para el diagnóstico de hipertensión pulmonar en estos pacientes, los perros sometidos a una tomografía axial computarizada (TAC) por cualquier otra indicación clínica, podrían beneficiarse del estudio y estandarización de la relación PT:Ao. Sin embargo, se necesitan más estudios con un mayor número de animales para evaluar e identificar si los parámetros de TAC estudiados tienen utilidad clínica para el diagnóstico precoz de hipertensión pulmonar en perros con dirofilariosis.

2. Las determinaciones ecocardiográficas del índice de distensibilidad de la arteria pulmonar derecha y otros indicadores ecocardiográficos en perros con dirofilariosis cardiopulmonar apuntan a una falta de mejoras significativas en el daño que se produce en las arterias pulmonares en perros una vez eliminados los parásitos mediante los protocolos adulticidas recomendados, al menos hasta 10 meses después de la eliminación de los vermes, lo que podría indicar que el daño vascular es irreversible.

3. Las concentraciones obtenidas en las proteínas de fase aguda estudiadas sugieren la persistencia del daño vascular en perros a largo plazo tras finalizar el tratamiento, por lo que la hipertensión pulmonar persistente podría ser la manifestación clínica observada en perros con alteraciones vasculares más severas. Las alteraciones en algunas proteínas de fase aguda confirman que la dirofilariosis tiene un fuerte componente inflamatorio y que parte del componente inflamatorio de la enfermedad es probable que persista al menos 6 meses después del alta, haya o no hipertensión pulmonar. Además, la persistencia de esta hipertensión pulmonar se confirma serológicamente con la presencia de niveles significativamente más altos de endotelina-1 y, posiblemente, concentraciones más altas de proteína C-reactiva. Por lo tanto, el uso clínico de estos biomarcadores podría

desempeñar un papel importante en la evaluación temprana de la enfermedad, así como para la determinación de la gravedad de la enfermedad, el seguimiento de las respuestas terapéuticas y la predicción de los resultados de estos pacientes.

RESUMEN

La hipertensión pulmonar (HP) es una condición frecuente, grave y potencialmente fatal, que sucede en perros con dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*). Se produce como consecuencia crónica de la endarteritis pulmonar proliferativa que causa la presencia de los parásitos adultos en las arterias pulmonares. En la actualidad, su diagnóstico se lleva a cabo mediante técnicas de diagnóstico por imagen, siendo la ecocardiografía considerada la técnica de elección. Si bien todavía se está estudiando los índices más sensibles y específicos para su determinación en perros con dirofilariosis, hasta la fecha se considera que el índice de distensibilidad de la arteria pulmonar derecha (DAPD) es uno de los índices ecocardiográficos más sensibles para su detección temprana; además, se están estudiando otros métodos diagnósticos complementarios, como otras técnicas de diagnóstico por imagen y algunos biomarcadores serológicos, que han recogido resultados muy prometedores hasta la fecha. Por otro lado, no existen estudios que evalúen la reacción de la vasculatura pulmonar una vez que los parásitos han sido eliminados. Por ello, el objetivo de esta tesis fue determinar la validez y utilidad de la tomografía axial computarizada (TAC) a través de la medición del ratio TP:Ao (tronco pulmonar: aorta), para detectar la presencia y severidad de HP en perros con *D. immitis*, así como determinar la correlación entre los ratios TP:AoD (tronco pulmonar: aorta descendente) y TP:AoA (tronco pulmonar: aorta ascendente). Además, se propuso evaluar el índice DAPD, junto con otros parámetros ecocardiográficos, en perros 10 meses después de la última dosis del tratamiento adulticida para determinar los cambios en la presión pulmonar y, por tanto, la progresión de la endarteritis pulmonar en dichos pacientes. Asimismo, se planteó evaluar las concentraciones séricas de proteínas de fase aguda positivas (proteína C-reactiva, haptoglobina y ferritina), negativas (albúmina y paraoxonasa-1), adiponectina y endotelina-1, para determinar su progresión a lo largo del tratamiento adulticida hasta seis meses después de finalizar el mismo, así como valorar su utilidad diagnóstica como biomarcadores de HP en perros con dirofilariosis. Para ello, se evaluó la presencia y gravedad de HP en 59 perros (30 perros sanos y 29 diagnosticados de dirofilariosis) mediante la medición de los ratios TP:Ao, TP:AoD y TP:AoA a partir de imágenes obtenidas mediante TAC, y comparándolos con el índice DAPD obtenido mediante ecocardiografía. Además, para estudiar la presencia, gravedad y evolución de

HP, también se determinaron varios índices ecocardiográficos (índice DAPD, TAPSE, grosor de pared de ventrículos izquierdo y derecho, ratio arteria pulmonar: aorta, volumen de aurículas izquierda y derecha, tiempos de aceleración y eyección de flujo pulmonar y velocidad pico del flujo pulmonar) en 23 perros con *D. immitis* sometidos a tratamiento adulticida, realizando las mediciones el día del inicio del tratamiento, el día del alta y 10 meses tras el alta. Finalmente, se determinó ecocardiográficamente la presencia o ausencia de HP mediante el índice DAPD y se midieron las concentraciones de proteínas de fase aguda positivas (proteína C reactiva, haptoglobina, ferritina), negativas (albúmina, paraxonasa-1), endotelina-1 y adiponectina en 25 perros con *D.immitis* al inicio del tratamiento, el día del alta y 6 meses tras finalizar el tratamiento. Los resultados mostraron una alta correlación entre los indicadores de HP obtenidos mediante ecocardiografía y los obtenidos mediante TAC, así como una buena correlación entre los ratios TP:AoD y TP:AoA. Sin embargo, los resultados también mostraron que el índice DAPD sigue siendo el indicador más fiable para la detección de HP leve en estos pacientes y continúa siendo el método de elección. Por otro lado, los resultados también mostraron que las diferencias en el índice DAPD y, por tanto, la endarteritis, no variaron significativamente 10 meses después de la muerte de los parásitos. Esto sugiere que, una vez que se ha desarrollado la endarteritis, los cambios vasculares son crónicos y pueden no ser reversibles. Estos resultados se vieron corroborados por la evaluación de proteínas de fase aguda, que mostraron la existencia de una respuesta de fase aguda en perros con dirofilariosis al inicio del tratamiento, al finalizar el mismo y que persistía 6 meses más tarde. Además, la proteína C-reativa estaba incrementada significativamente en perros con HP en todas las mediciones llevadas a cabo. Si bien la medición de adiponectina no ofreció ningún resultado relevante, la medición de endotelina-1 demostró diferencias significativas entre los perros hipertensos y normotensos en todas las mediciones, lo que corrobora la conveniencia de este biomarcador en la determinación de HP. En conclusión, los estudios demuestran la gran utilidad de los biomarcadores serológicos y técnicas de diagnóstico por imagen, como la ecocardiografía y la TAC, para valorar la presencia y gravedad de HP en pacientes infectados con *D. immitis*. Además, se demuestra que la endarteritis y, por tanto, la HP en los casos más graves, persisten en los perros tras la resolución de la infección, al menos hasta 10 meses después. La HP es una consecuencia grave y frecuente en perros con dirofilariosis; por ello, es necesario continuar los estudios enfocados a mejorar las técnicas de diagnóstico temprano que permitan una intervención

precoz, así como a estudiar las consecuencias de esta infestación a largo plazo en los animales tratados.

Palabras clave: *Dirofilaria immitis*, dirofilariosis cardiopulmonar canina, hipertensión pulmonar, ecocardiografía, proteínas de fase aguda, endotelina, adiponectina, índice de distensibilidad de arteria pulmonar, tomografía axial computarizada.

SUMMARY

Pulmonary hypertension (PH) is a common, serious and potentially fatal condition that occurs in dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*). It occurs as a chronic consequence of proliferative pulmonary endarteritis caused by the presence of the adult parasites in the pulmonary arteries. Currently, its diagnosis is carried out by means of imaging techniques, with echocardiography being considered the technique of choice. Although the most sensitive and specific indices for its determination in dogs with heartworm are still being studied, to date it is considered that the right pulmonary artery distensibility index (RPDA) is one of the most sensitive echocardiographic indices for its early detection; in addition, other complementary diagnostic methods are being studied, such as other imaging techniques and some serological biomarkers, which have gathered very promising results to date. On the other hand, there are no studies that evaluate the reaction of the pulmonary vasculature once the parasites have been eliminated. Therefore, the aim of this PhD thesis was to determine the validity and usefulness of computed axial tomography (CT) through the measurement of the PT:Ao ratio (pulmonary trunk: aorta), to detect the presence and severity of PH in dogs with *D. immitis*, as well as to determine the correlation between PT:DAo (pulmonary trunk: descending aorta) and PT:AAo (pulmonary trunk: ascending aorta) ratios. In addition, the evaluation of the RPDA index and other echocardiographic parameters is proposed in dogs 10 months after the last dose of adulticide treatment to determine the changes in pulmonary pressure and, therefore, the progression of pulmonary endarteritis in these patients. Likewise, the evaluation of serum concentrations of positive acute phase proteins (C-reactive protein, haptoglobin and ferritin), negative (albumin and paraoxonase-1), adiponectin and endothelin-1 was proposed, to determine their progression throughout the adulticide treatment until 6 months after finishing it, as well as to assess its diagnostic utility as biomarkers of PH in dogs with heartworm.

For this purpose, the presence and severity of PH in 59 dogs (30 healthy dogs and 29 with dirofilariasis) was evaluated by measuring PT:Ao, PT:DAo and PT:AAo ratios from images obtained by CT, and comparing them with the RPDA index obtained by echocardiography. In addition, to study the presence and severity of PH, several

echocardiographic indices (RPDA index, TAPSE, left and right ventricular wall thickness, pulmonary artery:aorta ratio, left and right atrial volume, pulmonary flow acceleration and ejection times, and peak pulmonary flow velocity) were also determined in 23 dogs with *D. immitis* subjected to adulticide treatment, with measurements taken on the day of initiation of treatment, the day of discharge, and 10 months after discharge. Finally, the presence or absence of PH was determined echocardiographically using the RPDA index and the concentrations of positive (C-reactive protein, haptoglobin, ferritin), negative (albumin, paraxonase-1), endothelin-1 and adiponectin acute phase proteins were measured in 25 dogs with *D.immitis* at the beginning of treatment, on the day of discharge and 6 months after the end of treatment. The results showed a high correlation between HP indicators obtained by echocardiography and those obtained by CT, as well as a good correlation between PT:DAo and PT:AAo ratios. However, the results also showed that the RPDA index remains the most reliable indicator for the detection of mild PH in these patients and continues to be the method of choice. On the other hand, the results also showed that the differences in the RPDA index, and thus endarteritis, did not significantly vary 10 months after parasite death. This suggests that, once endarteritis has developed, vascular changes are chronic and may not be reversible. These results were corroborated by the evaluation of acute-phase proteins, which showed the existence of an acute-phase response in dogs with heartworm at baseline, at the end of treatment, and persisting 6 months later. In addition, C-reactive protein was significantly increased in dogs with PH in all measurements performed. While adiponectin measurement did not provide any relevant results, endothelin-1 measurement demonstrated significant differences between hypertensive and normotensive dogs in all measurements, which corroborates the appropriateness of this biomarker in the determination of PH. In conclusion, the studies demonstrate the great utility of serological biomarkers and imaging techniques, such as echocardiography and CT, in assessing the presence and severity of PH in patients infected with *D. immitis*. In addition, it is shown that endarteritis, and therefore PH in the most severe cases, persists in dogs after resolution of the infection, at least up to 10 months later. PH is a serious and frequent consequence in dogs with heartworm; therefore, it is necessary to continue studies focused on improving early diagnostic techniques that allow early intervention, as well as to study the long-term consequences of this infestation in treated animals.

Key words: *Dirofilaria immitis*, canine heartworm, pulmonary hypertension, echocardiography, acute phase proteins, endothelin, adiponectin, right pulmonary artery distensibility index, axial computed tomography.

BIBLIOGRAFÍA

Abramowsky, C.R., Powers, K.G., Aikawa, M., Swinehart, G., 1981. *Dirofilaria immitis*. Immunopathology of filarial nephropathy in dogs. *Am J Pathol.* 104, 1-12.

Adams DS, Marolf AJ, Valdes-Martinez A, et al. 2017. Associations between thoracic radiographic changes and severity of pulmonary arterial hypertension diagnosed in 60 dogs via Doppler echocardiography: a retrospective study. *Vet Radiol Ultrasound.* 58:454-462.

Adcock, J.L., 1961. Pulmonary arterial lesions in canine dirofilariosis. *Am. J. Vet. Res.* 22, 655-662.

Acevedo, R.A., Theis, J.H., Kraus, J.F., Longhurst, W.M., 1981. Combination of filtration and histochemical stain for detection and differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in the dog. *Am. J. Vet. Res.* 42, 537-540.

American Heartworm Society, 2020. Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs. Disponible online en: <https://www.heartwormsociety.org> (último acceso 30 de octubre 2022).

Ames MK, Atkins CE, Pitt B. 2019. The reninangiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med.* 33: 363–382.

Ames, M.K.; Atkins, C.E. 2020. Treatment of dogs with severe heartworm disease. *Vet. Parasitol.* 283, 109131.

Aresu, L., Valenza, F., Ferroglia, E., Pregel, P., Uslenghi, F., Tarducci, A., Zanatta, R., 2007. Membranoproliferative Glomerulonephritis Type III in a Simultaneous Infection of *Leishmania Infantum* and *Dirofilaria Immitis* in a Dog. *J Vet Diagn Invest.* 19, 569-572.

Atkins, C.E., Keene, B.W., McGuirk, S.M., 1988. Investigation of Caval Syndrome in Dogs Experimentally Infected with *Dirofilaria immitis*. *J. Vet. Int. Med.* 2, 36-40.

Atkins, CE. 1990. Pathophysiology of heartworm caval syndrome: recent advances. In Otto GF, editor: Proceedings of the 1989 American Heartworm Symposium, Batavia, IL, American Heartworm Society, pp 27-321.

Atkins, C., Miller, M.W., 2003. Is there a better way to administer heartworm adulticidal therapy? *Vet med.* 98, 310-317.

Atkins, C., 2005. Canine heartworm disease. En: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6th ed. Elsevier, St. Louis, pp. 1118-1136.

Atkins, C.E., 2009. Heartworm Disease, in Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7a Edición. Ed. Elsevier Health Sciences. pp 1353-72. Vol 2, Seventh edition Edition. Elsevier Health Sciences.

Atkins, C., 2011. Heartworm disease in dogs: an update. Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, October 14th-17th, 2011, Jeju, Korea, pp. 162-165.

Atkinson KJ, Fine DM, Thombs LA, Gorelick JJ, Durham HE. 2009. Evaluation of pimobendan and N-terminal probrain natriuretic peptide in the treatment of pulmonary hypertension secondary to degenerative mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 23:1190-1196.

Atwell, R.B., Farmer, T.S., 1982. Clinical pathology of the caval syndrome in canine dirofilariasis in northern australia. *J. Small Anim. Pract.* 23, 675-685.

Augustine DX, Coates-Bradshaw LD, Willis J. 2018 Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography. *Echo Res Pract.* 5:G11-g24.

Bach JF, Rozanski EA, MacGregor J, Betkowski JM, Rush JE. 2006. Retrospective evaluation of sildenafil citrate as a therapy for pulmonary hypertension in dogs. *J Vet Intern Med.* 20:1132-1135.

Bahr, R.J., Thrall, DE. 2009, Corazón y vasos pulmonares. *Tratado de Diagnóstico Radiológico Veterinario*, 5th. pp 584-506 (Inter-Medica. Buenos Aires).

Barr, M.C., Boynton, E.P., Schmidt, P.L., Bossong, F., Johnston, G.R., 2011. Diagnosis of canine heartworm infection. *Today's Veterinary Practice* Jul/Aug 30–37.

- Ballesteros, C., Pulaski, C.N., Bourguinat, C., Keller, K., Prichard, R.K., Geary, T.G., 2018. Clinical validation of molecular markers of macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 8, 596–606.
- Bandi, C., McCall, J.W., Genchi, C., Corona, S., Venco, L., Sacchi, L., 1999. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbiont *Wolbachia*. *Int. J. Parasitol.* 29, 357-364.
- Benza, R.L., Gomberg-Maitland, M., Demarco, T., Frost, A.E., Torbicki, A., Langleben, D., Pulido, T., Correa-Jaque, P., Passineau, M.J., Wiener, H.W., Tamari, M., Hirota, T., Kubo, M., Tiwari, H.K., 2015. Endothelin-1 Pathway Polymorphisms and Outcomes in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 192, 1345-1354.
- Boon, J., 2012. *Ecocardiografía Veterinaria, Segunda Edición.* Edit. Multimedia Ediciones Veterinarias, Barcelona España.
- Borgeat K, Sudunagunta S, Kaye B, Stern J, Luis Fuentes V, Connolly D J. 2015. Retrospective evaluation of moderate to severe pulmonary hypertension in dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum*. *J Small Anim Pract* 56:196–202.
- Bossone E, D'Andrea A, D'Alto M, et al. 2013. Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from diagnosis to prognosis. *J Am Soc Echocardiogr.* 26:1-14.
- Boswood A, Dukes-McEwan J, Loureiro J, James RA, Martin M, Stafford-Johnson M, Smith P, Little C, Attree S. 2008. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract* 49:26–32.
- Boudreaux, M.K., Dillon, A.R., 1991a. Platelet function, antithrombin-III activity, and fibrinogen concentration in heartworm-infected and heartworm-negative dogs treated with thiacetarsamide. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1986-1991.
- Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. 2004. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif.* 37:207-220.
- Bourguinat, C., Lee, A.C., Lizundia, R., Blagburn, B.L., Liotta, J.L., Kraus, M.S., Keller, K., Epe, C., Letourneau, L., Kleinman, C.L., Paterson, T., Gomez, E.C., Montoya-Alonso, J.A., Smith, H., Bhan, A., Peregrine, A.S., Carmichael, J., Drake, J., Schenker, R., Kaminsky, R., Bowman, D.D., Geary, T.G., Prichard, R.K., 2015. Macrocyclic

lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Vet. Parasitol.* 210, 167–178.

Bové, C.M., Gordon, S.G., Saunders, A.B., Miller, M.W., Roland, R.M., Achen, S.E., Drourr, L.T., Boggess, M.M., 2010. Outcome of minimally invasive surgical treatment of heartworm caval syndrome in dogs: 42 cases (1999-2007). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 236, 187-192.

Bowman, D.D., Atkins, C.E., 2009. Heartworm biology, treatment, and control. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 39, 1127-1158, vii.

Bressollette E, Dupuis J, Bonan R, Doucet S, Cernacek P, Tardif JC. 2001. Intravascular ultrasound assessment of pulmonary vascular disease in patients with pulmonary hypertension. *Chest.* 120(3):809–815.

Brilla CG, Rupp H, Funck R, Maisch B. 1995. The renin-angiotensinaldosterone system and myocardial collagen matrix remodelling in congestive heart failure. *Eur Heart J.* 16(Suppl O):107-109.

Brinkmann, U.K., Krämer, P., Presthus, G.T., Sawadogo, B., 1976. Transmission in utero of microfilariae of *Onchocerca volvulus*. *Bull World Health Organ.* 54, 708-709.

Brown AJ, Davison E, Sleeper MM. 2010 Clinical efficacy of sildenafil in treatment of pulmonary arterial hypertension in dogs. *J Vet Intern Med.* 24:850-854.

Buchanan, J.W., Bucheler, J., 1995. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc.* 206, 194-199.

Buoro, I.B., Atwell, R.B., 1984. Development of a model of caval syndrome in dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *Aust. Vet. J.* 61, 267-268.

Caivano D, Rishniw M, Biretoni F. 2018 Right ventricular outflow tract fractional shortening: an echocardiographic index of right ventricular systolic function in dogs with pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol.* 20:354-363.

Calvert CA, Rawlings CA. 1988. Canine heartworm disease. Fox PR. *Canine and feline cardiology.* Churchill Livingstone: New York; 541-549.

Campbell FE. 2007. Cardiac effects of pulmonary disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 37:949-962.

Cancrini, G., Kramer, L., 2001. Insect vectors of *Dirofilaria* spp. Heartworm infection in humans and animals. Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, España. 78, pp 63-76.

Carretón, E., Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A., 2012. *Dirofilariosis* cardiopulmonar canina. En: Montoya-Alonso, J.A., Carretón-Gómez, E. (Eds.), *Dirofilariosis*, pautas de manejo clínico. Multimédica Ediciones Veterinarias, España, pp. 1-130

Carretón, E., Morchon, R., González-Miguel, J., Simón, F., Juste, M.C., Montoya-Alonso, J.A., 2013. Variation of D-dimer values as assessment of pulmonary thromboembolism during adulticide treatment of heartworm disease in dogs. *Vet. Parasitol.* 195, 106–111.

Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Juste, M.C., Mendez, J.C., Montoya-Alonso, J.A., 2014. Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in the assessment of the severity of canine *dirofilariosis*. *Vet parasitol.* 206, 43-47.

Carretón, E.; Falcón-Cordón, Y.; Falcón-Cordón, S.; Morchón, R.; Matos, J.I.; Montoya-Alonso, J.A. 2019. Variation of the adulticide protocol for the treatment of canine heartworm infection: Can it be shorter?. *Vet Parasitol.* 271, 54-56.

Carretón, E, Falcón-Cordón, Y., Rodon, J., Matos, J.I., Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A. 2020. Evaluation of serum biomarkers and proteinuria for the early detection of renal damage in dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*). *Vet Parasitol.* 283.

Carretón, E., Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Matos, J. I., & Montoya-Alonso, J. A. 2020b. Evaluation of different dosages of doxycycline during the adulticide treatment of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Vet Parasitol.* 283, 109-141.

Cavaliere L, Romito G, Domenech O, Venco L. 2017. Heartworm removal guided by transesophageal echocardiography in a dog with naturally acquired caval syndrome. *J Am Vet Med Assoc.* 53(2): 96-100.

Chester, A.H., Yacoub, M.H., 2014. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2014, 62–78.

Confer, A.W., Qualls, C.W., Jr., MacWilliams, P.S., Root, C.R., 1983. Four cases of pulmonary nodular eosinophilic granulomatosis in dogs. *Cornell Vet.* 73, 41-51.

Courtney, C.H., Cornell, J.A., 1990. Evaluation of heartworm immunodiagnostic tests. *J Am Vet Med Assoc.* 197, 724-729.

Courtney, C.H., Zeng, Q., 2001. Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens. *Vet. Parasitol.* 96, 317-322.

Da Silva, C. M., Silva, H., Ramos, R.A.N, Da Gloria Faustino, M.A., Camara Alves, L., De Carvalho, B.G.A., 2014. *Vet Parasitol., Jaboticabal* 23 (2), 200-205.

DeLaforcade A, Bacek L, Blais MC, et al. 2019 Consensus on the rational use of antithrombotics in veterinary critical care (CURATIVE): domain 1-defining populations at risk. *J Vet Emerg Crit Care.* 29(1):37-48.

Diana A, Guglielmini C, Pivetta M, Sanacore A, Di Tommaso M, Lord PF, Cipone M. 2009. Radiographic features of cardiogenic pulmonary edema in dogs with mitral regurgitation: 61 cases (1998-2007). *J Am Vet Med Assoc* 235:1058–1063.

Diaz, J.H., 2015. Increasing Risks of Human *Dirofilariasis* in Travelers. *J Travel Med.* 22, 116-123.

Dillon, A.R., Brawner, W.R., Hanrahan, L., 1995. Influence of number of parasites and exercise on the severity of heartworm disease in dogs. American Heartworm Society, Batavia, 113-113 pp.

Dillon, R., 2000. *Dirofilariosis in dogs and cats.* En: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. *Textbook of veterinary internal medicine. Disease of the dog and cat.* 5th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia. USA.

Di Sacco, B., Vezzoni, A., 1992. Clinical classification of heartworm disease for the purpose of adding objectivity to the assessment of therapeutic efficacy of adulticidal drugs in the field. En: Soll, M.D. (Ed.), *Proceedings of the Heartworm Symposium'92,* American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 09–214.

Ettinger, S.J., Feldman, E.C., 2009a. Pulmonary hypertension and pulmonary thromboembolism, in *Textbook of veterinary internal medicine.* pp 1138-41, Vol 2, Seventh edition, Edit. Elsevier Health Sciences.

Ettinger, S.J., Feldman, E.C., 2009b. Heartworm Disease, in *Textbook of veterinary internal medicine.* pp 1353-80, Vol 2, Seventh edition, Edit. Elsevier Health Sciences.

Ettinger, S.J., Feldman, E.C., 2009c. Glomerular Diseases, in Textbook of veterinary internal medicine. pp. 2021-7, Vol 2, Seventh edition. Edit. Elsevier Health Sciences.

European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis, 2017. Guidelines for Clinical Management of Canine Heartworm Disease. Disponible online en: <https://www.esda.vet> (último acceso, 30 de octubre 2022).

Faunt KK, Turk JR, Cohn LA, et al. 1998. Isolated right-ventricular hypertrophy associated with severe pulmonary vascular apolipoprotein A1-derived amyloidosis in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 34:35-37.

Feldhütter, E.K.; Domenech, O.; Vezzosi, T.; Tognetti, R.; Sauter, N.; Bauer, A.; Eberhard, J.; Friederich, J.; Wess, G. 2022. Echocardiographic reference intervals for right ventricular indices, including 3-dimensional volume and 2-dimensional strain measurements in healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 36, 8–19

Fleming E, Ettinger SJ. 2006. Pulmonary hypertension. *Compendium.* 720–731.

Fonfara, S., Loureiro, J., Swift, S., James, R., Cripps, P., Dukes-McEwan, J., 2010. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. *The Vet J.* 184, 334-339.

Fontes-Sousa AP, Silvestre-Ferreira AC, Carretón E, Esteves-Guimarães J, Maia-Rocha C, Oliveira P, et al. 2019. Exposure of humans to the zoonotic nematode *Dirofilaria immitis* in northern Portugal. *Epidemiol Infect.* 147:e282.

Fukumoto, S., Hanazono, K., Miyasho, T., Endo, Y., Kadosawa, T., Iwano, H., Uchide, T., 2014. Serum big endothelin-1 as a clinical marker for cardiopulmonary and neoplastic diseases in dogs. *J Life Sci.* 118, 329-332.

Furlanello, T., Caldin, M., Vezzoni, A., Venco, L., Kitagawa, H., 1998. Patogenesi. En: Genchi, C., Venco, L., Vezzoni, A. (Eds.). 2004. *La filariosi cardiopulmonare del cane e del gatto*, Editorial Scivac, Italia, pp: 31-46. Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular research.* 61(2):227–237.

Galvani, M., Ottani, F., Ferrini, D., Ladenson, J.H., Destro, A., Baccos, D., Rusticali, F., Jaffe, A.S., 1997. Prognostic influence of elevated values of cardiac troponin I in patients with unstable angina. *Circulation* 95, 2053-2059.

Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M., Cringoli, G., 2005. Is heartworm disease really spreading in Europe? *Vet Parasitol.* 133, 137-148.

Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G., 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet. Parasitol.* 163, 286-292.

Genchi, C., Mortarino, M., Rinaldi, L., Cringoli, G., Traldi, G., Genchi, M., 2011. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: The example of *Dirofilaria* in Europe. *Vet Parasitol.* 176, 295-299.

Geyer, J., Janko, C., 2012. Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.* 13, 969–986.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine.* 328(24):1732–1739.

Giaid, A.; Saleh, D. 1995. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 333, 214–221

Glaus, T.M., Soldati, G., Maurer, R., Ehrensperger, F., 2004. Clinical and pathological characterisation of primary pulmonary hypertension in a dog. *Vet Rec.* 154, 786-789.

Gomez, M., Rojo, F.A., Guerrero, J., 1999. Filariosis. En: Cordero, M. Rojo, F.A, Sánchez, M.C., Hernández, S., Navarrete, I., Diez, P., Quiroz, H., Carvalho, M. (Eds.). *Parasitología Veterinaria.* McGraw-Hill Interamericana, Madrid. España.

González-Miguel, J.; Morchón, R.; Carretón, E.; Montoya-Alonso, J.A.; Simón, F. Can the activation of plasminogen/plasmin system of the host by metabolic products of *Dirofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis? *Parasites Vectors* 2015, 8, 194.

Gossett, K.A., Root, C.R., Cleghorn, B., Church, G.E., Turk, J.R., Turk, M.A., 1987. Effects of heartworm and intestinal parasitic infections on hematology and peripheral lymph node cytology in Louisiana dogs. *Vet Clin Pathol.* 16, 97-101.

Granger, L.A.; Pariaut, R.; Vila, J.; Coulter, C.E.; Rademacher, N.; Queiroz-Williams, P. 2016. Computed tomographic measurement of the main pulmonary artery to aortic diameter ratio in healthy dogs: A comparison to echocardiographically derived ratios. *Vet.Radiol. Ultrasound* 57, 376–386

Grant, T., Wiseman, S., Snyder, D.E., 2018. Effects of milbemycin oxime, combined with spinosad, when administered orally to microfilaremic dogs infected with adult heartworms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 252, 1084–1089.

Grauer, G.F., Culham, C.A., Dubielzig, R.R., Longhofer, S.L., Grieve, R.B., 1989. Experimental *Dirofilaria immitis*-associated glomerulonephritis induced in part by in situ formation of immune complexes in the glomerular capillary wall. *J Parasitol.* 75, 585-593.

Grieve, R.B., Mika-Johnson, M., Jacobson, R.H., Cyfers, R.H., 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Am. J. Vet. Res.* 42, 66-69.

Guazzi M, Naeije R. 2017. Pulmonary hypertension in heart failure: pathophysiology, pathobiology, and emerging clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol.* 69:1718-1734.

Guedes, M.L.P., 2012. Culicidae (Diptera) no Brasil: relacoes entre diversidade, distribuicao e enfermidades. *Oecologia Australis:* 16 (2), 283-93.

Guglielmini, C., Civitella, C., Diana, A., Di Tommaso, M., Cipone, M., Luciani, A., 2010. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with precapillary and postcapillary pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med.* 24, 145-152.

Hatano S, Strasser T: Primary pulmonary hypertension. WHO. world Meet. 1975, 1-43.

Henry, L.G., Brunson, K.J., Walden, H.S., Wenzlow, N., Beachboard, S.E., K, L.B., Long, M.T., 2018. Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. *Vet. Parasitol.* 254, 178–182.

Hsieh CM, Mishkel GJ, Cardoso PFG, Rakowski H, Dunn SC, Butany J, Weisel RD, Patterson GA, Cooper JD. 1992. Production and reversibility of RV hypertrophy and RHF in dogs. *Ann Thorac.* 54:104-10.

Hogan DF, Green HW 3rd, Van Alstine WG. 2002. Total anomalous pulmonary venous drainage in a dog. *J Vet Intern Med.* 16:303-308.

Jacobson, L.S., DiGangi, B.A., 2021. An accessible alternative to melarsomine: "moxidoxy" for treatment of adult heartworm infection in dogs. *Front. Vet. Sci.* 8, 702018.

Johnson LR, Boon J, Orton EC. 1999. Clinical characteristics of 53 dogs with Doppler-derived evidence of pulmonary hypertension: 1992–1996. *J Vet Intern Med.* 13:440-447.

Johnson LR, Lappin MR, Baker DC. 1999. Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. *J Vet Intern Med* 13:338–345.

Jung J, Chang J, Oh S, Yoon J, Choi M. 2010. Computed tomography angiography for evaluation of pulmonary embolism in and experimental model and heartworm infected dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 51:288-93.

Kamiie, J., Shirota, K., Yamaki, M., Kitagawa, H., Wasaki, M., Ooi, H.K., 2000. Abnormal distribution of anionic sites in the glomerular basement membrane in glomerulonephritis of dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *J Vet Med Sci.* 62, 1193-1195.

Kellum HB, Stepien RL. 2007. Sildenafil citrate therapy in 22 dogs with pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med.* 21,1258-1264.

Kelliham, H.B., Mackie, B.A., Stepien, R.L., 2011. NT-proBNP, NT-proANP and cTnI concentrations in dogs with pre-capillary pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol.* 13, 171-182.

Kelliham, H.B., Stepien, R.L., 2010. Pulmonary hypertension in dogs: diagnosis and therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 40, 623-641.

Kelliham, H.B., Stepien, R.L., 2012. Pulmonary hypertension in canine degenerative mitral valve disease. *J Vet Cardiol.* 14 (1), 149-164.

Kelliham HB, Waller KR, Pinkos A, et al. 2015. Acute resolution of pulmonary alveolar infiltrates in 10 dogs with pulmonary hypertension treated with sildenafil citrate: 2005-2014. *J Vet Cardiol.* 17: 182-191

Kemp BK, Smolich JJ, Cocks TM. 1997. Evidence for specific regional patterns of responses to different vasoconstrictors and vasodilators in sheep isolated pulmonary arteries and veins. *Br. J. Pharmacol.* 121(3):441–450.

Kerbaul F, Brimiouille S, Rondelet B, et al. 2007. How prostacyclin improves cardiac output in right heart failure in conjunction with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 175:846-850.

- Kim H, Yung GL, Marsh JJ, et al. 2000. Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Eur Resp* 15:640-648.
- Kitabatake A, Inoue M, Asao M, et al. 1983. Noninvasive evaluation of pulmonary hypertension by pulsed Doppler technique. *Circulation* 68(2):302-309.
- Kittleson, M.D., 1998. Heartworm infestation and disease (dirofilariasis). En: Kittleson, M.D., Kienle, R.D. (Eds), *Small Animal Cardiovascular Medicine*. 1st ed. Mosby, St Louis, 370-401 pp.
- Knight, D.H., 1987. Heartworm infection. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 17, 1463-1518.
- Knight, D.H., 1995. Guidelines for diagnosis and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. En: Bonagura, J.D. (Ed.), *Kirk's Current Veterinary Therapy XII, Small Animal Practice*, WB Saunders Co, Philadelphia, pp. 879–887.
- Knott, J., 1939. A method for making microfilaria surveys on dog blood. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 33, 191-196.
- Kozek, W.J., 2005. What is new in the Wolbachia *Dirofilaria* interaction? *Vet. Parasitol.* 133, 127-132.
- Kramer, L.H., Passeri, B., Corona, S., Simoncini, L., Casiraghi, M., 2003. Immunohistochemical/ immunogold detection and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* of *D. immitis* and *Brugia pahangi* using a polyclonal antiserum raised against WSP (*Wolbachia* surface protein). *Parasitol. Res.* 89, 381-386.
- Kramer, L., Simón, F., Tamarozzi, F., Genchi, M., Bazzocchi, C., 2005. Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? *Vet. Parasitol.* 133, 133-136.
- Kramer LH. 2006. Treating canine heartworm infection. *N Amer Vet Conf: Clin Brief.* 4,19–20.
- Kramer, L., Grandi, G., Leoni, M., Passeri, B., McCall, J., Genchi, C., Mortarino, M., Bazzocchi, C., 2008. *Wolbachia* and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Parasitol.* 158, 191-195.

Kramer, L., Grandi, G., Passeri, B., Gianelli, P., Genchi, M., Dzimianski, M.T., Supakorndej, P., Mansour, A.M., Supakorndeg, N., McCall, S.D., McCall, J.D., 2011. Evaluation of lung pathology in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs treated with doxycycline or a combination of doxycycline and ivermectin before administration of melarsomine dihydrochloride. *Vet. Parasitol.* 176, 357–360.

Kramer, L., Genchi, C., 2014. Where are we with Wolbachia and doxycycline: An in-depth review of the current state of our knowledge. *Vet Parasitol.* 206, 1-4.

Kravchenko, V; Itin, G; Kartashev, V; Ermakov, A; Kartashov, S; Diosdado, A; González-Miguel, J; Simón, F. 2016. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in sylvatic reservoirs of Krasnodar Krai (Russian Federation). *Vet. Parasitol.* 6, 35-38.

Labarthe NV, Almosny NR, Guerrero J, Duque-Araújo AM. 1997. Description of the occurrence of canine dirofilariasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92,47–51.

Lan, N.; Massam, B.; Kulkarni, S.; Lang, C. Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases* 2018, 6, 38.

Lee, A.C., Bowman, D.D., Lucio-Forster, A., Beall, M.J., Liotta, J.L., Dillon, R., 2011. Evaluation of a new in-clinic method for the detection of canine heartworm antigen. *Vet Parasitol.* 177, 387-391.

Le Roux A, Rademacher N, Saelinger C, Rodriguez D, Pariaut R, Gaschen L. 2012. Value of tracheal bifurcation angle measurement as a radiographic sign of left atrial enlargement in dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 53,28–33.

Lewczuk J, Ajlan AW, Piszko P, Jagas J, Mikulewicz M, Wrabec K. 2004. Electrocardiographic signs of right ventricular overload in patients who underwent pulmonary embolism event(s). Are they useful in diagnosis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension? *J Electrocardiol.* 37,219–225.

Litster, A., Atkins, C., Atwell, R., Buchanan, J., 2005. Radiographic cardiac size in cats and dogs with heartworm disease compared with reference values using the vertebral heart scale method: 53 cases. *J Vet Cardiol.* 7, 33-40.

- Little, S.E., Beall, M.J., Bowman, D.D., Chandrashekar, R., Stamaris, J., 2014. Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma spp.*, and *Ehrlichia spp.* in the United States, 2010-2012. *Parasites Vectors* 7, 257.
- Little, S., Saleh, M., Wohltjen, M., Nagamori, Y., 2018. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. *Parasites Vectors* 11, 186
- Lombard CW, Ackerman N. 1984. Right heart enlargement in heartworm infected dogs. A radiographic, electrocardiographic and echocardiographic correlation. *Vet Radiol.* 25:210.
- Losonsky, J.M., Thrall, D.E., Lewis, R.E., 1983. Thoracic radiographic abnormalities in 200 dogs with heartworm infestation. *Vet. Radiol.* 24, 120-123.
- Ludders, J.W., Grauer, G.F., Dubielzig, R.R., Ribble, G.A., Wilson, J.W., 1988. Renal microcirculatory and correlated histologic changes associated with dirofilariasis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 49, 826-830.
- Luscher TF, Barton M. 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation.* 102, 2434–2440.
- Manfredi, M.T., Di Cerbo, A., Genchi, M., 2007. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats, pp 39-47.
- Mantovani, A., Jackson, R.F., 1966. Transplacental transmission of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. *J. Parasitol.* 52, 116.
- Marquardt W.C., Demaree R.S., Grieve R.B., 2000. *Parasitology and Vector Biology*. Second edition. Edit. Harcourt Academic Press, pp 702.
- Martini, M., Capelli, G., Poglayen, G., Bertotti, F., Turilli, C., 1996. The validity of some haematological and ELISA methods for the diagnosis of canine heartworm disease. *Vet. Res. Commun.* 20, 331-339.
- Masaki T. 1998. The discovery of endothelins. *Cardiovascular research.* 39,530–533.

Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. 1989. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochemical and biophysical research communications*. 164, 74–80.

Mazzotta, E.; Guglielmini, C.; Menciotti, G.; Contiero, B.; BaronToaldo, M.; Berlanda, M.; Poser, H. 2016. Red blood cell distribution width, hematology, and serum biochemistry in dogs with echocardiographically estimated precapillary and postcapillary pulmonary arterial hypertension. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 1806–1815.

Maxwell, E.; Ryan, K.; Reynolds, C.; Pariaut, R. 2014. Outcome of a Heartworm Treatment Protocol in Dogs Presenting to Louisiana State University from 2008 to 2011: 50 Cases. *Vet. Parasitol.* 206, 71–77.

McCall, J., Supakorndej, N., Donoghue, A., Turnbull, R., Radecki, S., 2001. Evaluation of the performance of canine heartworm antigen test kits licensed for use by veterinarians and canine heartworm antigen tests conducted by diagnostic laboratories. In: *Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium*. 97-104.

McCall, J.W., Guerrero, J., Genchi, C., Kramer, L., Bazzocchi, C., Simon, F., Martarino, M., Am Heartworm, S., 2004. Recent advances in heartworm disease. *Vet Parasitol.* 125, 105-130.

McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J., Dzimianskia, M.T., Supakorndej, P., Mansoure, A.M., McCall, S.D., Supakorndej, N., Grandi, G., Carsone, B., 2008a. Heartworm and *Wolbachia*: Therapeutic implications. *Vet. Parasitol.* 158, 204-214.

McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008b. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* 66, 193-285.

McCall, J.W., Arther, R., Davis, W., Settje, T., 2014. Safety and efficacy of 10% imidacloprid + 2.5% moxidectin for the treatment of *Dirofilaria immitis* circulating microfilariae in experimentally infected dogs. *Vet Parasitol.* 206, 86-92.

McLaughlin, V.V., Archer, S.L., Badesch, D.B., Barst, R.J., Farber, H.W., Lindner, J.R., Mathier, M.A., McGoon, M.D., Park, M.H., Rosenson, R.S., 2009. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association Developed in Collaboration With the American College of

Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol.* 53, 1573-1619.

McCracken, M.D., Patton, S., 1993. Pulmonary Arterial Changes in Feline *Dirofilariasis*. *Vet. Pathol.* 30, 64-69.

McTier, T.L., Six, R.H., Pullins, A., Chapin, S., McCall, J.W., Rugg, D., Maeder, S.J., Woods, D.J., 2017. Efficacy of oral moxidectin against susceptible and resistant isolates of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Parasites Vectors* 10, 482.

McTier, T.L., Six, R.H., Pullins, A., Chapin, S., Kryda, K., Mahabir, S.P., Woods, D.J., Maeder, S.J., 2019. Preventive efficacy of oral moxidectin at various doses and dosage regimens against macrocyclic lactone-resistant heartworm (*Dirofilaria immitis*) strains in dogs. *Parasites Vectors* 12, 444.

Meissner, M.H., Zierler, B.K., Bergelin, R.O., Chandler, W.C., Manzo, R.A., Strandness, D.E., Jr., 2000. Markers of plasma coagulation and fibrinolysis after acute deep venous thrombosis. *J. Vasc. Surg.* 32, 870-880.

Menda, J., 1989. Transplacental migration of *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Companion Anim. Pract.* 19, 18-20.

Méndez JC, Carretón E, Martínez S, Tvarijonaviciute A, Cerón JJ, Montoya- Alonso JA. 2014. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol.* 204, 420–5.

Méndez, J.C., Carretón, E., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J.J., Montoya-Alonso, J.A., 2015. Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment. *Vet. Parasitol.* 209, 197–201.

Mishima T, Tanimura M, Suzuki G, et al. 2000. Effects of long-term therapy with bosentan on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 35,222-229.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Juste, M.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F., 2010. Epidemiological survey of canine heartworm disease on the island of Gran Canaria (Canary Islands – Spain) between 2000 and 2008. *Vet Parasitol.* 173, 165-168.

Montoya-Alonso, J., Carretón, E., Corbera, J., Juste, M., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F., 2011. Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, cats and humans from the island of Gran Canaria, Spain. *Vet parasitol.* 176, 291-294.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., 2012. *Dirofilariosis* pautas de manejo clínico. Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, España, 1-130 pp.

Montoya-Alonso JA, Carretón E, Morchón R, Silveira-Viera L, Falcón Y, Simón F., 2016. The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. *Vet Parasitol.* 216, 66-71.

Montoya-Alonso JA, Morchón R, Costa-Rodríguez N, Matos JI, FalcónCordón Y, Carretón E. 2020. Current distribution of selected vector-borne diseases in dogs in Spain. *Front Vet Sci.* 7:564429.

Montoya-Alonso, J.A.; Morchón, R.; García-Rodríguez, S.N.; Falcón-Cordón, Y.; Costa-Rodríguez, N.; Matos, J.I.; Rodríguez Escolar, I.; Carretón, E. 2022. Expansion of Canine Heartworm in Spain. *Animals.* 12, 1268.

Moreno, Y., Nabhan, J.F., Solomon, J., Mackenzie, C.D., Geary, T.G., 2010. Ivermectin disrupts the function of the excretory-secretory apparatus in microfilariae of *Brugia malayi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20120–20125.

Moon HS, Lee SG, Choi R, et al. 2007. Primary pulmonary hypertension in a maltese dog. *J Vet Clin.* 24,613-617

Munnell, J.F., Weldon, J.S., Lewis, R.E., Thrall, D.E., McCall, J.W., 1980. Intimal lesions of the pulmonary artery in dogs with experimental dirofilariasis. *Am J Vet Res.* 41, 1108-1112.

Murphy LA, Russell N, Bianco D, Nakamura RK. 2017. Retrospective evaluation of pimobendan and sildenafil therapy for severe pulmonary hypertension due to lung disease and hypoxia in 28 dogs (2007-2013). *Vet Med Sci.* 3,99-106.

Mylonakis, M.E., Papadopoulos, E., Koutinas, A.F., Paitaki, C., Leontides, L., 2004. Comparative methodology for the detection and differentiation of circulating microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. *J Helminthol.* 78, 137-140.

Nakagaki, K., Nogami, S., Hayashi, Y., Hammerberg, B., Tanaka, H., Ohishi, I., 1993. *Dirofilaria immitis*: detection of parasite-specific antigen by monoclonal antibodies in glomerulonephritis in infected dogs. *Parasitol Res.* 79, 49-54.

Nana-Djeunga, H.C., Bourguinat, C., Pion, S.D., Bopda, J., Kengne-Ouafo, J.A., Njiokou, F., Prichard, R.K., Wanji, S., Kamgno, J., Boussinesq, M., 2014. Reproductive

status of *Onchocerca volvulus* after ivermectin treatment in an ivermectin-naïve and a frequently treated population from Cameroon. PLoS Neglected Trop. Dis. 8, e2824.

Nelson, C.T., McCall, J.W., Rubin, S.B., Buzhardt, L.F., Doiron, D.W., Graham, W., Longhofer, S.L., Guerrero, J., Robertson-Plough, C., Paul, A., 2005. 2005 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. Vet. Parasitol. 133, 255-266.

Nelson, O.L., 2005. Use of the D-dimer assay for diagnosing thromboembolic disease in the dog. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 41, 145-149.

Nicolle AP, Chetboul V, Tessier-Vetzel D, Sampedrano CC, Aletti E, Pouchelon JL. 2006. Severe pulmonary arterial hypertension due to *Angiostrongylus vasorum* in a dog. Can Vet J. 47,792–795.

Noack, S.; Harrington, J.; Carithers, D.S.; Kaminsky, R.; Selzer, P.M. 2021. Heartworm Disease—Overview, Intervention, and Industry Perspective. Int. J. Parasitol. Drug 16, 65–89.

Oliveira C, Rademacher N, David A, Vasanjee S, Gaschen L. 2010. Spontaneous pneumothorax in a dog secondary to *Dirofilaria immitis* infection. J Vet Diagn Invest. 22, 991-4.

Okine AAK, Chapman S, Hostutler RA, Livingston R. 2018. Diagnosis of pneumocystis pneumonia in a 2-year-old King Charles cavalier spaniel using the polymerase chain reaction. Vet Clin Pathol. 47,146-149.

Osei-Atweneboana, M.Y., Awadzi, K., Attah, S.K., Boakye, D.A., Gyapong, J.O., Prichard, R.K., 2011. Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*. PLoS Neglected Trop. Dis. 5, e998.

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petric, D., Genchi, C., Capelli, G., 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. Parasit Vectors. 6, 1-14.

Oui, H., Oh, J., Keh, S., Lee, G., Jeon, S., Kim, H., Yoon, J., Choi, J., 2015. Measurements of the pulmonary vasculature on thoracic radiographs in healthy dogs compared to dogs with mitral regurgitation. Vet Radiol. 56, 251-256.

- Oyama, M.A., Sisson, D.D., 2004. Cardiac Troponin-I Concentration in Dogs with Cardiac Disease. *J Vet Intern Med.* 18, 831-839.
- Paes-de-Almeida, E.C., Ferreira, A.M., Labarthe, N.V., Caldas, M.L., McCall, J.W., 2003. Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Vet. Parasitol.* 113, 157-168.
- Paradies, P., Spagnolo, P.P., Amato, M.E., Pulpito, D., Sasanelli, M., 2014. Doppler echocardiographic evidence of pulmonary hypertension in dogs: a retrospective clinical investigation. *Vet Res Commun.* 38, 63-71.
- Pariaut R, Saelinger C, Strickland KN, Beaufrère H, Reynolds CA, Vila J. 2012. Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) in dogs: reference values and impact of pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med.* 26,1148-1154
- Peribáñez, M.A., Lucientes, J., Arce, S., Morales, M., Castello, J.A., Gracia, M.J., 2001. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Achantocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP. *Vet. Parasitol.* 102, 173-175.
- Perros F, Montani D, Dorfmüller P, et al. 2008. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 178, 81–88.
- Poser H, Guglielmini C. 2016. Pulmonary hypertension in the dog. *Acta Veterinaria-Beograd.* 66,1–25.
- Prichard, R.K. 2021. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Risks for prevention of heartworm disease. *Int. J. Parasitol.* 51, 1121–1132.
- Prosek, R., Sisson, D.D., Oyama, M.A., Biondo, A.W., Solter, P.F., 2004. Plasma endothelin-1 immunoreactivity in normal dogs and dogs with acquired heart disease. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 840–844.
- Pulaski, C.N., Malone, J.B., Bourguinat, C., Prichard, R., Geary, T., Ward, D., Klei, T.R., Guidry, T., Smith, G., Delcambre, B., Bova, J., Pepping, J., Carmichael, J., Schenker, R., Pariaut, R., 2014. Establishment of macrocyclic lactone resistant *Dirofilaria immitis* isolates in experimentally infected laboratory dogs. *Parasites Vectors* 7, 494.

- Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L. 1991. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Pathol.* 105, 279-286.
- Pyle, R., Park, R., Alexander, A., Hill, B., 1981. Patent ductus arteriosus with pulmonary hypertension in the dog. *Am Vet Med Assoc.* 178, 565-571.
- Pyle RL, Abbott J, MacLean H. 2004. Pulmonary hypertension and cardiovascular sequelae in 54 dogs. *Intern J Appl Res Vet Med.* 2, 99-109
- Quinn, R.L., Williams, J.G., 2011a. Canine pulmonary hypertension Part 1: An in-depth review of its pathophysiology and classifications. *Veterinary Medicine.* 6, 454-459.
- Quinn, R.L., Williams, J.G., 2011b. Canine pulmonary hypertension, Part 2: Diagnosis and treatment. *Veterinary Medicine.* 6, 26-36.
- Rawlings, C.A., 1982. Clinical laboratory evaluations of seven heartworm infected beagles: during disease development and following treatment. *Cornell Vet.* 72, 49-56.
- Rawlings, C.A., 1986. Heartworm disease in dogs and cats. WB Saunders Co, Philadelphia, 325 pp.
- Rawlings, C.A., Tackett, R.L., 1990. Postadulthood pulmonary hypertension of canine heartworm disease: successful treatment with oxygen and failure of antihistamines. *Am J Vet Res.* 51, 1565-1569.
- Rawlings, C.A., 1990. Pulmonary arteriography and hemodynamics during feline heartworm disease: effect of aspirin. *J. Vet. Intern. Med.* 4, 285-291
- Reiter, P., 2001. Climate change and mosquito-borne disease. *Environ. Health Perspect.* 109,141-61.
- Rhinehart JD, Schober KE, Scansen BA, Yildiz V, Bonagura JD. 2017. Effect of body position, exercise, and sedation on estimation of pulmonary artery pressure in dogs with degenerative atrioventricular valve disease. *J Vet Intern Med.* 31,1611-1621.
- Roels E, Merveille A-C, Moyse E, et al. 2019. Diagnostic value of the pulmonary vein to right pulmonary artery ratio in dogs with pulmonary hypertension of pre-capillary origin. *J Vet Cardiol.* 24,84-94.

Roels, E.; Fastrès, A.; Merveille, A.-C.; Bolen, G.; Teske, E.; Clercx, C.; Mc Entee, K. 2021. The Prevalence of Pulmonary Hypertension Assessed Using the Pulmonary Vein-to-right Pulmonary Artery Ratio and Its Association with Survival in West Highland White Terriers with Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMC Vet. Res.* 17, 171.

Roldan-Alzate A, Frydrychowicz A, Johnson KM, et al. 2014. Non-invasive assessment of cardiac function and pulmonary vascular resistance in a canine model of acute thromboembolic pulmonary hypertension using 4D flow cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 16, 23.

Rose, L.J., Dunn, M.E., Allegret, V., Bedard, C., 2011. Effect of prednisone administration on coagulation variables in healthy Beagle dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 40, 426–434.

Ryan, J.J., Thenappan, T., Luo, N., Ha, T., Patel, A.R., Rich, S., Archer, S.L., 2012. The WHO classification of pulmonary hypertension: A case-based imaging compendium. *Pulm Circ.* 2, 107-121.

Sasaki, Y., Kitagawa, H., Ishihara, K., 1989. Clinical and pathological effects of heartworm removal from the pulmonary arteries using flexible alligator forceps. En: Otto, G.F. (Ed.), *Proceedings of the Heartworm Symposium '89*. American Heartworm Society, Washington DC, pp. 45–51

Schaub, R.G., Rawlings, C.A., Keith, J.C., 1981. Platelet adhesion and myointimal proliferation in canine pulmonary arteries. *Am. J. Pathol.* 104, 13-22.

Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. 2011. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol.* 8,43–55.

Schober KE, Baade H. 2006. Doppler echocardiographic prediction of pulmonary hypertension in West Highland white terriers with chronic pulmonary disease. *J Vet Intern Med.* 20,912-920.

Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R, Paul M, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. 2003. Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *Journal of the American College of Cardiology.* 41,666–673.

Seiler, G.S.; Nolan, T.J.; Withnall, E.; Reynolds, C.; Lok, J.B.; Sleeper, M.M. 2010. Computed tomographic changes associated with the prepatent and early patent phase of dirofilariasis in an experimentally infected dog. *Vet. Radiol. Ultrasound* 51, 136–140.

Serrano-Parreño, B.; Carretón, E.; Caro-Vadillo, A.; Falcón-Cordón, Y.; Falcón-Cordón, S.; Montoya-Alonso, J.A. 2017. Evaluation of pulmonary hypertension and clinical status in dogs with heartworm by Right Pulmonary Artery Distensibility Index and other echocardiographic parameters. *Parasites Vectors* 10, 106.

Serres FJ, Chetboul V, Tissier R, et al. 2006. Doppler echocardiography-derived evidence of pulmonary arterial hypertension in dogs with degenerative mitral valve disease: 86 cases (2001-2005). *J Am Vet Med Assoc.* 229,1772-1778.

Serres F, Chetboul V, Gouni V, Tissier R, Sampedrano CC, Pouchelon JL. 2007. Diagnostic value of echo-Doppler and tissue Doppler imaging in dogs with pulmonary arterial hypertension. *J Vet Intern Med.* 21,1280-1289.

Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev* 25, 507-544.

Simonneau, G., Robbins, I.M., Beghetti, M., Channick, R.N., Delcroix, M., Denton, C.P., Elliott, C.G., Gaine, S.P., Gladwin, M.T., Jing, Z.C., Krowka, M.J., Langleben, D., Nakanishi, N., Souza, R., 2009. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 54, S43-54.

Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. 2013. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62: D34-D41.

Smith KF, Quinn RL, Rahilly LJ. 2015. Biomarkers for differentiation of causes of respiratory distress in dogs and cats: Part 1 - Cardiac diseases and pulmonary hypertension. *J Vet Emerg Crit Care.* 25,311–329.

Souza R, Jardim C, Julio Cesar Fernandes C, Silveira Lapa M, Rabelo R, Humbert M. 2007. NT-proBNP as a tool to stratify disease severity in pulmonary arterial hypertension. *Respir Med.* 101,69-75.

Steele JL, Henik RA. Pulmonary hypertension. 2004. En: King LG (ed). *Textbook of respiratory disease in dogs and cats.* Saunders, St Louis (Missouri) 498-504.

- Stepien, R.L., 2009. Pulmonary arterial hypertension secondary to chronic left-sided cardiac dysfunction in dogs. *J Small Anim Pract.* 50 Suppl 1, 34-43.
- Stiedl, C.P., Weber, K., 2017. Fast and simple detection methods for the 4-base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene by PCR and isothermal amplification. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29, 176–180.
- Storz, J., 1971. *Chlamydia and Chlamydia-induced Diseases.* Charles C. Thomas, Springfield, IL, 358 pp.
- Suga H. 1974. Importance of atrial compliance in cardiac performance. *CircRes.* 35:39–43.
- Su-Jung, K.; Sang, S., II; Changbaig, H. 2020. Evaluation of red blood cell profiles in dogs with heartworm disease. *Can. J. Vet. Res.* 84, 265–271.
- Sutherland-Smith J, Hankin EJ, Cunningham SM, Sato AF, Barton BA. 2018. Comparison of a computed tomographic pulmonary trunk to aorta diameter ratio with echocardiographic indices of pulmonary hypertension in dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 59: 18-26.
- Swann, J.W.; Sudunagunta, S.; Covey, H.L.; English, K.; Hendricks, A.; Connolly, D.J. 2014. Evaluation of red cell distribution width in dogs with pulmonary hypertension. *J. Vet. Cardiol.* 16, 227–235
- Tai TC, Huang HP. 2013. Echocardiographic assessment of right heart indices in dogs with elevated pulmonary artery pressure associated with chronic respiratory disorders, heartworm disease, and chronic degenerative mitral valvular disease. *Vet Med Czech.* 58, 613-620
- Takahashi A, Yamada K, Kishimoto M, Shimizu J, Maeda R. 2008. Computed tomography (CT) observation of pulmonary emboli caused by long-term administration of ivermectin in dogs experimentally infected with heartworms. *Vet Parasitol.* 155, 242-8.
- Taylor, M.J., Bandi, C., Hoerauf, A., 2005. Wolbachia bacterial endosymbionts filarial nematodes. *Adv. Parasitol.* 60, 248-286.

Ten Kate CA, Tibboel D, Kraemer US. 2015. B-type natriuretic peptide as a parameter for pulmonary hypertension in children. A systematic review. Eur J Pediatr. 2015 17,1267-75.

Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. 2018. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. BMJ. 360:5492.

Thrall, D., Losonsky, J., 1976. A method for evaluating canine pulmonary circulatory dynamics from survey radiographs [in cases of cardiopulmonary disease, dogs]. J Am Anim Hosp Assoc. 12, 457-462.

Tidholm A, Hoglund K, Haggstrom J, et al. 2015. Diagnostic value of selected echocardiographic variables to identify pulmonary hypertension in dogs with myxomatous mitral valve disease. J Vet Intern Med. 29,1510-1517.

Tonelli, Q.J., 1989. Factors affecting the accuracy of enzyme immunoassays for *Dirofilaria immitis* adult antigen. En: Otto, G.F. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium '89. American Heartworm Society, Washington DC, pp. 7-12.

Todd, K.S.Jr., Howland, T.P., 1983. Transplacental transmission of *Dirofilaria immitis* microfilariae in the dog. J. Parasitol. 69, 371.

Tudor, N., Ionita, L., Tapaloaga, D., Tudor, P., Ionita, C., Vlagioiu, C., 2014. Radiographic cardiopulmonary changes in dogs with heartworm disease. Rom Biotechnol Lett. 19, 9918-9924

Uchide, T., Saida, K., 2005. Elevated endothelin-1 expression in dogs with heartworm disease. J Vet Med Sci. 67, 1155-1161.

Velasquez, L., Blagburn, B.L., Duncan-Decoq, R., Johnson, E.M., Allen, K.E., Meinkoth, J., Gruntmeir, J., Little, S.E., 2014. Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. Vet Parasitol. 206, 67-70.

Venco, L., Genchi, C., Colson, P.V., Kramer, L., 2001. Relative Utility of Echocardiography, Radiography, Serologic Testing and Microfilariae Counts to Predict Adult Worm Burden in Dogs Naturally Infected with Heartworms. Recent Advances in Heartworm Disease Symposium 1, 111-124.

Venco, L., Vezzoni, A., 2001. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs and cats. En: Simón, F., Genchi, C. (Eds.), Heartworm infection in humans and animals, Ediciones Universidad de Salamanca, España, pp. 161-177.

Venco, L., Bertazzolo, W., Giordano, G., Paltrinieri, S., 2014a. Evaluation of C-reactive protein as a clinical biomarker in naturally heartworm-infected dogs: a field study. *Vet Parasitol.* 206, 48-54.

Venco, L., Mihaylova, L., Boon, J.A., 2014b. Right Pulmonary Artery Distensibility Index (RPAD Index). A field study of an echocardiographic method to detect early development of pulmonary hypertension and its severity even in the absence of regurgitant jets for Doppler evaluation in heartworm-infected dogs. *Vet Parasitol.* 206, 60-66.

Vezzoni, A., Genchi, C., Raynaud, J. P., 1992. Adulticide efficacy of RM 340 in dogs with mild and severe natural infections. En: Soll, M.D. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium '92, American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 231-240.

Vezzosi T, Domenech O, Costa G, et al. 2018. Echocardiographic evaluation of the right ventricular dimension and systolic function in dogs with pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med.* 32,1541-1548.

Visser LC, Im MK, Johnson LR, Stern JA. 2016. Diagnostic value of right pulmonary artery distensibility index in dogs with pulmonary hypertension: comparison with Doppler echocardiographic estimates of pulmonary arterial pressure. *J Vet Intern Med.* 30,543-552.

Wang, L.C., 1998. Comparison of a whole-blood agglutination test and an ELISA for the detection of the antigens of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Ann Trop Med Parasitol* 92, 73-77.

Ware, W.A., 2000. Filariasis. En: Nelson, R.E., Couto, C.G. (Eds), Manual de medicina interna de pequeños animales. Harcourt, Madrid. España.

Weil, G.J., 1987. *Dirofilaria immitis*: Identification and partial characterization of parasite antigens in the serum of infected dogs. *Exp. Parasitol.* 64, 244-251.

Wells, S.M., Sleeper, M., 2008. Cardiac troponins. *J Vet Emerg Crit Care.* 18, 235-245.

West JB. 2012. Blood flow and metabolism. In: Respiratory physiology - the essentials, 9th ed. Philadelphia, US: Lippincott Williams and Wilkins. pp 36–54.

Wolstenholme, A.J. 2013. What do the macrocyclic lactones do to heartworms, and how do they do it?. Heartworms Today: The Search for Solutions Symposium, 14th Triennial Heartworm symposium. New Orleans, USA.22-3., pp. 22-23.

Yoon, W.K., Kim, Y.W., Suh, S.L., Choi, R., Lee, S.G., Hyun, C., 2017. Evaluation of cardiopulmonary and inflammatory markers in dogs with heartworm infection during treatment with the 2014 American Heartworm Society recommended treatment protocol. Parasit. Vectors. 10,173–180.

Zhao, Y.-Y.; Zhao, Y.D.; Mirza, M.K.; Huang, J.H.; Potula, H.-H.S.; Vogel, S.M.; Brovkovich, V.; Yuan, J.X.-J.; Wharton, J.; Malik, A.B. 2009. Persistent enos activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through pkg nitration. J. Clin. Investig. 119, 2009–2018.

Zwissler B, Welte M, Messmer K. 1995. Effects of inhaled prostacyclin as compared with inhaled nitric oxide on right ventricular performance in hypoxic pulmonary vasoconstriction. J Cardiothorac Vasc Anesth 9,283-289.

OTROS TRABAJOS REALIZADOS RELACIONADOS CON LA DIROFILARIOSIS

Publicaciones

Revistas internacionales indexadas.

Carretón, E., J.A, Montoya-Alonso., Morchón, R., Silveira-Viera, L., Falcon, Y., Simón, F. 2016. The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. *Vet. Parasitol.* 216, 66-71.

Serrano Parreno, B., Carretón, E., Caro-Vadillo, A., Falcón Cordón, Y., Falcón Cordón, S., Montoya-Alonso, J.A. 2017. Evaluation of pulmonary hypertension and clinical status in dogs with heartworm by Right Pulmonary Artery Distensibility Index and other echocardiographic parameters. *Parasites. Vectors.* 10:106.

Serrano-Parreño, B.; Carretón, E.; Caro-Vadillo, A.; Falcón-Cordón, S.; Falcón-Cordón, Y.; Montoya-Alonso, J.A. 2017. Pulmonary hypertension in dogs with heartworm before and after the adulticide protocol recommended by the American Heartworm Society. *Vet. Parasitol.*, 236, 34–37.

Montoya-Alonso, José Alberto; Morchón, Rodrigo; Falcón-Cordón, Yaiza; Falcón-Cordón, Soraya; Simón, Fernando; Carretón, Elena. 2017. Prevalence of heartworm in dogs and cats of Madrid, Spain. *Parasites. Vectors*, 10, 354

Cabrera, Elena D.; Carretón, Elena; Morchón, Rodrigo; Falcón-Cordón, Yaiza; Falcón-Cordón, Soraya; Simón, Fernando; Montoya-Alonso, J. Alberto. 2018. The Canary Islands as a model of risk of pulmonary dirofilariasis in a hyperendemic area. *Parasitol. Res.* 117, 933-936.

Falcón-Cordón, Y.; Montoya-Alonso, J.A.; Caro-Vadillo, A.; Matos-Rivero, J.I.; Carretón, E. 2019. Persistence of pulmonary endarteritis in canine heartworm infection

10 months after the eradication of adult parasites of *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.*, 273, 1–4.

Carretón, E.; Falcón-Cordón, Y.; Falcón-Cordón, S.; Morchón, R.; Matos, J.I.; Montoya-Alonso, J.A. 2019. Variation of the adulticide protocol for the treatment of canine heartworm infection: Can it be shorter?. *Vet. Parasitol.* 271, 54-56.

Carretón, E., Morchón, R., Falcón Cordón, Y., Matos, J., Costa-Rodríguez, N., Montoya-Alonso, J.A. 2020. First epidemiological survey of *Angiostrongylus vasorum* in domestic dogs from Spain. *Parasites Vectors*, 13, 306.

Carretón, E., Falcón-Cordón, Y., Rodon, J., Matos, J.I., Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A. 2020. Evaluation of serum biomarkers and proteinuria for the early detection of renal damage in dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*). *Vet. Parasitol.* 283, 109144.

Carretón, E., Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Matos, J.I., Montoya-Alonso, J.A. 2020. Evaluation of different dosages of doxycycline during the adulticide treatment of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Vet. Parasitol.* 283, 109-141

Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., Costa-Rodríguez, N., Matos, J.I., Falcón-Cordón, Y., Carretón, E. 2020. Current Distribution of Selected Vector-Borne Diseases in Dogs in Spain. *Front. Vet. Sci.* 7, 564429

Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., Matos, J.I., Falcón-Cordón, Y., Costa-Rodríguez, N., Carretón, E. 2020. *Dirofilaria immitis* Could Be a Risk Factor for the Development of Allergic Diseases in Humans. *Animals*, 10, 1847.

Revistas no indexadas.

Falcón Cordón, Y., Falcón Cordón, S., Carretón Gómez, E. 2018. *Dirofilariosis cardiorrespiratoria felina, una enfermedad infradiagnosticada*. *Revista Científica Española de Medicina Interna de Pequeños Animales*. Monografía de cardiorespiratorio. Ideant Veterinaria Editoriales. Volumen 2, Nº 3.

Carretón, E., Falcón, Y., Montoya Alonso, J.A. 2019. ¿Qué hacer con? Dirofilariosis. *Ideant Veterinaria*. Volumen 1, N° 10.

Carretón, E., Falcón, Y., Matos, J., Morchón, R. 2019. Diagnóstico de la Dirofilariosis. *Clininfectivet. Revista de enfermedades infecciosas e inmunología veterinaria*. Multimédica Ediciones Veterinarias. Volumen 2 pp. 2-12.

Morchón, R., Hernández de la Fuente, I., Calvo-López, A., Lambea, A., Falcón-Cordón, Y., Carretón, E. 2019. Dirofilariosis felina. Epidemiología y situación actual en España. Suplemento Argos. Grupo Asis Biomedica S.L.

Carretón, E., Falcón, Y., Matos, J., Costa, N., Morchón, R. 2020. *Wolbachia pipientis*: más que una simple bacteria. *Revista de enfermedades infecciosas e inmunología veterinaria*. Multimédica Ediciones Veterinarias. Volumen 5, pp. 2-11.

García Rodríguez, S.N, Matos-Rivero, J.I, Falcón-Cordón, Y., Costa-Rodríguez, N. 2021. Dirofilariosis cardiopulmonar felina: Enfoque clínico para un problema oculto. *Revista Animales de Compañía*. Editorial: Asociación madrileña de veterinarios de animales de compañía. Volumen 97, pp. 16-21.

Contribuciones a congresos internacionales.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Falcón, Y., Serrano, B., Falcón, S. Dirofilariosis felina. II International Workshop of Dirofilarias. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Santa Cruz de Tenerife. 4 de junio de 2016. Santa Cruz de Tenerife (España). Comunicación oral.

Carretón, E., Falcón, Y., Serrano, B., Falcón, S., Montoya-Alonso, J.A. Tratamiento de la dirofilariosis. II International Workshop of Dirofilarias. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Santa Cruz de Tenerife. 4 de junio de 2016. Santa Cruz de Tenerife (España). Comunicación oral.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Falcón, S., Serrano, B., Falcón, Y. Fisiopatología y sintomatología de la dirofilariosis: últimos avances. II International Workshop of Dirofilarias. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Santa Cruz de Tenerife. 4 de junio

de 2016. Santa Cruz de Tenerife (España). Comunicación oral.

Carretón, E., Falcón, S., Serrano, B., Falcón, Y., Montoya-Alonso, J.A. Diagnóstico de la dilofilariosis en el perro. II International Workshop of Dirofilarias. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Santa Cruz de Tenerife. 4 de junio de 2016. Santa Cruz de Tenerife (España). Comunicación oral.

Montoya-Alonso, J.A., Falcón, Y., Carretón, E. Cardiología geriátrica en el perro. Congreso Veterinario de Leon. 7-10 septiembre de 2016. León Guanajato (México). Comunicación oral.

Montoya-Alonso, J.A., Juste, M.C., Falcón, Y., Falcón, S., Carretón, E. Cardiopatías felinas. Congreso Veterinario de Leon. 7-10 de septiembre de 2016. León Guanajato (México). Comunicación oral.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Juste, M.C., Falcón, Y., Falcón, S. Enfermedad del gusano del corazón en animales de compañía. Congreso Veterinario de Leon-2016. 7-10 de septiembre de 2016. León Guanajato (México). Comunicación oral.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Juste, M.C., Falcón, Y., Falcón, S. Síncope cardiogénico en el perro. Congreso Veterinario de Leon-2016. 7-10 de septiembre de 2016. León Guanajato (México). Comunicación oral.

Montoya-Alonso, J.A., Juste, M.C., Falcón, Y., Falcón, S., Carretón, E. Tromboembolismo arterial. Congreso Veterinario de Leon. 7-10 de septiembre de 2016. León Guanajato (México). Comunicación Oral.

Cabrera., E.D., Carretón, E., Morchón, R., Falcón, Y., Falcón, S., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. The influence of Canine Dirofilariosis As Reservior in the Seroprevalence of Feline and Human Dirofilariosis. 15th Triennial Symposium of the American Heartworm Society. American Heartworm Society. 11-13 de septiembre de 2016. Nueva Orleans (Estados Unidos). Póster.

Falcón-Cordón Y, Falcón-Cordón S, Montoya-Alonso J. A, Caro-Vadillo A, Carretón E. Pulmonary hypertension persists in dogs with heartworm 6 months after being treated. VI European Dirofilaria and Angiostrongylos. 5-7 julio de 2018. Belgrado (Serbia). Poster.

Carretón, E., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Morchón, R., Montoya Alonso, J.A. Assessment of a variation of the current adulticide protocol for canine heartworm disease. 5-7 julio de 2018. Belgrado (Serbia). Comunicación oral.

Montoya-Alonso J.A., Carretón, E., Morchón R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Simón, F. Prevalence of canine and feline heartworm in the Balearic Islands (Spain). 5-7 julio de 2018. Belgrado (Serbia). Póster.

Carretón, E., Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Montoya-Alonso J.A. Cardiopulmonary biomarkers: how useful are they for the assessment, treatment and prognosis of heartworm disease?. 5-7 julio de 2018. Belgrado (Serbia). Comunicación oral.

Talavera, T., Falcón Cordón, Y., Falcón Cordón., S., Morchón, R., Montoya Alonso., J.A., Carretón, E. Clinical picture of cats seropositive for *Dirofilaria immitis* in a Hyperendemic area: Is this feline disease still being misdiagnosed? 28ht EVMIC-CA Congress. Septiembre 2018. Rotterdam (Holanda). Póster

Medina, S., Falcón Cordón, Y., Falcón Cordón, S., Morchón, R., Montoya Alonso, J.A., Carretón, E. Evaluation of renal function in dogs infected by *Dirofilaria immitis* in relation to microfilaremia, parasite burden and pulmonary pressure. 28ht EVMIC-CA Congress. Septiembre 2018. Rotterdam (Holanda). Póster.

Carretón, E., Falcón Cordón, Y., Rodon, J., Matos, J.I., Montoya-Alonso, J.A. Early detection of renal damage in heartworm infected dogs. Triennial Symposium American Heartworm Society. 8-11 de septiembre de 2019. Nueva Orleans (Estados Unidos). Póster.

Carretón, E., Falcón Cordón, Y., Falcón Cordón, S., Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A. Can the adulticide for canine heartworm be shorter ?. Triennial Symposium American Heartworm Society. 8-11 de septiembre de 2019. Nueva Orleans (Estados Unidos). Comunicación oral.

Carretón, E., Falcón Cordón, Y., Falcón Cordón, S., Morchón, R., Matos, J.I., Montoya-Alonso, J.A. Evaluation of different dosages of doxycycline during the adulticide treatment of *Dirofilaria immitis* in dogs. Triennial Symposium American Heartworm Society. 8-11 de septiembre de 2019. Nueva Orleans (Estados Unidos). Comunicación oral.

Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., Juste, M.C., Falcón Cordón, Y., Matos, J.I., Carretón, E. *Dirofilariosis* could be a risk factor for the development of allergies in humans. Poster. Triennial Symposium American Heartworm Society. 8-11 de septiembre de 2019. Nueva Orleans (Estados Unidos). Póster.

Falcon-Cordón, Y., Carretón Gómez, E., Morchón, R., Falcón-Cordón, S., Costa Rodríguez, N., Matos Rivero, J.I., García Rodríguez, S., Montoya-Alonso, J.A. Angiostrongylosis in the United Kingdom. Clinical characteristics of an increasingly frequent pathology: description of 5 cases. VII European Society of *Dirofilariosis* and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Comunicación oral.

Martínez-Bencomo, A., Falcón-Cordón, S., Falcón-Cordón, Y., Matos Rivero, J.I., Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E. Usefulness of thoracic radiological signs for the diagnosis and staging of severity in dogs with heartworm. VII European Society of *Dirofilariosis* and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Póster.

Matos, J.I., García Rodríguez, S.N., Costa-Rodríguez, N., Falcón-Cordón, Y., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. Two-dimensional echocardiographic measurements for diagnosis and staging of heartworm. VII European Society of *Dirofilariosis* and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Póster.

Matos, J.I., García-Rodríguez, S.N., Costa-Rodríguez, N., Falcón-Cordón, Y., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. Importance of anamnesis and physical examination in canine heartworm disease. VII European Society of *Dirofilariosis* and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Póster.

García-Rodríguez, S.N., Matos, J.I., Costa-Rodríguez, N., Falcón-Cordón, Y., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. Tomographic study of pulmonary lesions observed in cats

naturally infected by *Dirofilaria immitis*. VII European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Póster.

Matos, J.I., García-Rodríguez, S.N., Costa-Rodríguez, N., Falcón-Cordón, Y., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. Tricuspid regurgitation velocity/pulmonary artery flow velocity time integral measured by echocardiography in canine heartworm disease. VII European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Póster.

Montoya-Alonso, J.A., García-Rodríguez, S.N., Matos, J.I., Costa-Rodríguez, N., Falcón-Cordón, Y., Morchón, R., Carretón, E. Mapping the heartworm infection in the hyperendemic island of Gran Canaria (2018-2020). VII European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Póster.

Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., García-Rodríguez, S.N., Falcón-Cordón, Y., Costa-Rodríguez, N., Matos, J.I., Rodríguez Escolar, I., Carretón, E. Expansion of canine heartworm in Spain. VII European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Póster.

García-Rodríguez, S.N., Matos, J.I., Costa-Rodríguez, N., Falcón-Cordón, Y., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. Clinical and radiological findings in cats naturally affected by heartworm associated respiratory disease. VII European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Comunicación oral.

Costa-Rodríguez, N., Matos, J.I., Falcón-Cordón, Y., Morchón, R., García-Rodríguez, S.N., Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E. Measurement of cortisol in dogs infected by *Dirofilaria immitis*. VII European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Comunicación oral.

Matos, J.I., Falcón-Cordón, Y., García-Rodríguez, S.N., Costa-Rodríguez, N., Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E. Evaluation of thoracic computed tomography findings in dogs naturally infected by *Dirofilaria immitis*. VII European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Comunicación oral.

Carretón, E., Costa-Rodríguez, N., Falcón-Cordón, Y., Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A. New biomarkers in heartworm disease. VII European Society of Dirofilariosis and

Angiostrongylosis. 23-24 de septiembre de 2022. Madrid (España). Comunicación oral.

Falcón Cordón, Y ., Martínez Subiela, S., Franco, L., Caro-Vadillo, A., Montoya-Alonso, J.A., Carretón E. . Serological biomarkers (Serum acute phase proteins, adiponectin, and endothelin-1) for the evaluation of pulmonary hypertension in dogs with heartworm before and after adulticide treatment. 2022. 17th Triennial Symposium of the American Heartworm Society, 8-11 de septiembre, 2022, Nueva Orleans. (Estados Unidos). Comunicación oral.

Contribuciones a congresos nacionales.

Falcón, Y., Falcón, S., Muñoz, M.C., Molina, J.M., Hermosilla, C., Taubert, A., López, M.A., Martín, S., Ruiz, A. Recuentos de ooquistes y niveles de IgG frente a *Eimeria* en suero y leche de caprinos de distintas edades y estados productivos. XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. 23-24-25 de julio de 2015. Vitoria. (España). Póster.

Falcón Cordón, Y., Serrano Parreño, B., Montoya Alonso, J.A., Carretón Gómez, E. Índice cardio-vertebral y valoración radiológica de las arterias pulmonares como indicador pronóstico en perros con dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*). las XI Jornadas Complutenses, X Congreso Nacional Investigación Alumnos Pregraduados en Ciencias de la Salud, XV Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas. 22 de abril de 2016. Madrid. (España). Comunicación oral.

Montoya JA, Carretón E, Falcon Y, Falcón S y Serrano B. Actualización en Dirofilariosis. Congreso: XXXIII Congreso de Asociación Madrileña de Veterinarios de Animales de Compañía. 3-5 de marzo de 2016. Madrid (España). Comunicación oral.

Falcón Cordón, Y; Carretón Gómez, E; Falcón Cordón, S; Montoya Alonso, J.A. Indicadores radiológicos de daño vascular y cardiaco como marcadores clínicos en perros con dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*). Congreso anual Asociación Madrileña de Veterinarios de Animales de Compañía. 16-18 de marzo de 2017. Madrid (España). Comunicación oral.

Falcón Cordón, S; Carretón Gómez, E; Falcón Cordón, Y; Montoya Alonso, J.A. Hipertensión pulmonar en perros con dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*): prevalencia, método de determinación y utilidad clínica. Congreso anual Asociación Madrileña de Veterinarios de Animales de Compañía. 16-8 de marzo de 2017. Madrid (España). Comunicación oral.

Carretón, E., Falcón Cordón, Y., Falcón Cordón, S., Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A. Variación del protocolo adulticida para el tratamiento de la Dirofilariosis canina. ¿Hace falta esperar tanto? Congreso Vetcan. Colegio Oficial de Veterinarios de Santa Cruz de Tenerife. 5 y 6 de octubre de 2018. Tenerife (España). Comunicación oral.

Falcón Cordón, Soraya., Talavera Pérez, T., Falcón Cordón, Y., Montoya Alonso, J.A., Carretón Gómez, E. ¿Seguimos sub-diagnosticando la dirofilariosis felina? Estudio del cuadro clínico en gatos seropositivos en un área hiperendémica. Congreso Vetcan. Colegio Oficial de Veterinarios de Santa Cruz de Tenerife. 5 y 6 de octubre de 2018. Tenerife (España). Comunicación oral.

Matos, J.I., Carretón, E., Falcón, Y., Falcón, S., Montoya-Alonso, J.A. ¿Puede la Dirofilariosis Cardiopulmonar canina incrementar el riesgo de enfermedades atópicas en la población humana?. XV Congreso Andaluz de Veterinarios. 25 y 26 de octubre de 2019. Sevilla (España). Comunicación oral.

Carretón, E., Falcón, Y., Matos, J., Costa Rodríguez, N., Montoya-Alonso, J.A. Dirofilariosis felina. ¿está subdiagnosticada? XV Congreso Andaluz de VeterinarioS. 25 y 26 de octubre de 2019. Sevilla (España). Comunicación oral.

Matos Rivero, J.I., García Rodríguez, S., Costa Rodriguez, N., Carretón Gómez, E., Falcón Cordón, Y., Montoya-Alonso, J.A. Evaluación de la hipertensión pulmonar en perros con dirofilariosis cardiopulmonar mediante el uso del ratio broncoarterial. XVI Congreso Andaluz de Veterinarios Especialistas en Animales de Compañía. 12-13 de noviembre de 2021. Almería (España). Comunicación oral.

Capítulos de libros y monografías.

Carretón, E., Falcón, Y., Falcón, S., Montoya-Alonso, J.A. Manual de Enfermedades Respiratorias en Animales de Compañía. Editorial (año): Multimédica Ediciones Veterinaria, Barcelona, 2016. ISBN: 978-84-96344-61-7.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Falcón, S., Serrano, B., Falcón, Y. Conclusiones II International Workshop of Dirofilarias. Fisiopatología y sintomatología de la Dirofilariosis: últimos avances. Grupo Asis Biomedica S.L. España. pp. 49-54. 2016. ISBN: 978-84-608-9395-0.

Carretón, E., Falcón, S., Serrano, B., Falcón, Y., Montoya-Alonso, J.A. Conclusiones II International Workshop of Dirofilarias. Diagnóstico de la Dirofilariosis en el perro. Grupo Asis Biomedica S.L. España. pp. 57 – 63. 2016. ISBN: 978-84-608-9395-0.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Falcón, Y., Serrano, B., Falcón, S. Conclusiones II International Workshop of Dirofilarias. Dirofilariosis Felina. Grupo Asis Biomedica S.L. España. pp. 65-72. 2016. ISBN: 978-84-608-9395-0.

Carretón, E., Falcón, Y., Serrano, B., Falcón, S., Montoya-Alonso, S. Conclusiones II International Workshop of Dirofilarias. Pautas para el tratamiento y prevención de la dirofilariosis. Grupo Asis Biomedica S.L. España. pp. 75-83. 2016. ISBN: 978-84-608-9395-0.

Carretón, E., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Corbera, J.A., Montoya-Alonso, J.A. Emergencias y cuidados críticos en pequeños animales. Capítulo de Tromboembolismo pulmonar. Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, España, pp. 451-560. 2018. ISBN: 978-84-96344-77-8.

Premios.

Premio a la mejor comunicación oral. Falcón Cordón, Y., Carretón, E., Falcón Cordón, S., Montoya Alonso, J.A. Indicadores radiológicos de daño vascular y cardiaco como marcadores clínicos en perros con Dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*). XXXIV Congreso Anual de la Asociación de Veterinarios de Pequeños Animales de Madrid. 16-18 de marzo de 2017. Madrid (España).

VII Premio laboratorios Boehringer Ingelheim Animal Health España a la Divulgación Científica otorgado por la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España en Madrid en enero de 2020. Carretón, E., Falcón, Y., Matos, J., Morchón, R. Diagnóstico de la Dirofilariosis. Publicado en Clininfectovet, revista de enfermedades infecciosas e inmunología veterinaria, 2, pp 2-12. Editorial Multimédica

Yo Yaiza Falcón Cordón con número de D.N.I. 45775123-V declaro bajo mi responsabilidad que los datos anteriormente consignados son ciertos.

