


Anexo I

DON ALBERTO ARENCIBIA ESPINOSA, SECRETARIO DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que la Comisión de Asesoramiento Docente del programa de Doctorado Clínica e Investigación Terapéutica en su sesión de fecha veintiséis de junio de dos mil quince tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada “Evaluación de las proteínas de fase aguda en perros infectados por *Dirofilaria immitis*” presentada por la doctoranda Doña Jorgelina Carla Méndez y dirigida por los Doctores Don José Alberto Montoya Alonso, Don Juan José Joaquín Cerón Madrigal y Doña Elena Carretón Gómez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a veintiséis de junio de dos mil quince.-

PÁGINA 1 / 1	ID. DOCUMENTO nOTdIZb4V3N6kkLmt5bQ9Q\$\$			
FIRMADO POR		FECHA FIRMA	ID. FIRMA	
42812417X ALBERTO ARENCIBIA ESPINOSA		26/06/2015 08:28:51	NDA0OTc=	

Documento firmado digitalmente. Para verificar la validez de la firma copie el ID del documento y acceda a / Digitally signed document.
To verify the validity of the signature copy the document ID and access to
<https://sede.ulpgc.es:8443/VerificadorFirmas/ulpgc/VerificacionAction.action>

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CLÍNICA E INVESTIGACIÓN
TERAPÉUTICA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

Evaluación de las proteínas de fase aguda en perros
infectados por *Dirofilaria immitis*

Doctoranda

Jorgelina Carla Méndez

Directores

J. Alberto Montoya - Alonso

José Joaquín Cerón Madrigal

Elena Carretón Gómez

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CLÍNICA E INVESTIGACIÓN
TERAPÉUTICA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

Evaluación de las proteínas de fase aguda en perros
infectados por *Dirofilaria immitis*

Doctoranda

Jorgelina Carla Méndez



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Patología Animal, Producción Animal
Bromatología y Tecnología de los Alimentos

José Alberto Montoya Alonso, Doctor en veterinaria y Catedrático de Medicina y Cirugía Animal del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y Director del programa de doctorado “CLÍNICA E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA”

INFORMA:

Que D^a. **Jorgelina Carla Méndez**, Licenciada en Veterinaria, y Master en Clínica e Investigación Terapéutica, ha realizado, bajo mi dirección y asesoramiento, el presente trabajo de tesis doctoral titulado: “**Evaluación de las proteínas de fase aguda en perros infectados por *Dirofilaria immitis***”. Que considero reúne las condiciones y calidad científica necesarias, para su presentación y defensa, para optar al título de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Lo que firmo, a los efectos oportunos, en Arucas (Las Palmas) a cuatro de junio de dos mil quince.

J. Alberto Montoya Alonso

t +34 928 451 099 +34 928 451 137 f +34 928 451 142	e-mail secretaria@dpat.ulpgc.es www.ulpgc.es	Edificio de Veterinaria Campus U. De Montaña Cardones 35413 Arucas – Las Palmas
---	---	---



José Joaquín Cerón Madrigal, Doctor en veterinaria y Catedrático de Medicina y Cirugía Animal del Departamento de Medicina y Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

INFORMA:

Que D^a. **Jorgelina Carla Méndez**, Licenciada en Veterinaria, y Master en Clínica e Investigación Terapéutica, ha realizado, bajo mi dirección y asesoramiento, el presente trabajo de tesis doctoral titulado: **“Evaluación de las proteínas de fase aguda en perros infectados por *Dirofilaria immitis*”**. Que considero reúne las condiciones y calidad científica necesarias, para su presentación y defensa, para optar al título de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Lo que firmo, a los efectos oportunos, en Murcia a seis de junio de dos mil quince.

Jose Joaquín Cerón

Elena Carretón Gómez, Doctora en Veterinaria y Master Universitario en Medicina Veterinaria e Investigación Terapéutica, e Investigadora del Servicio de Medicina Veterinaria de la Fundación Universitaria de Las Palmas,

INFORMA:

Que D^a. **Jorgelina Carla Méndez**, Licenciada en Veterinaria y Master en Clínica e Investigación Terapéutica, ha realizado, bajo mi codirección y asesoramiento, la presente Tesis Doctoral titulada: **“Evaluación de las proteínas de fase aguda en perros infectados por *Dirofilaria immitis*”**, que a mi juicio reúne las condiciones y calidad científica necesarias para su presentación y defensa, para optar al título de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Lo que firmo, para que surta los efectos a que haya lugar, en Las Palmas de Gran Canaria a diecisiete quince



Fdo.: Elena Carretón Gómez

*A esas niñas que perfuman mi alma,
mis hijas, las que me recuerdan cada
día cuán infinito es el don de amar.*

*A Santi, por cobijar mis alas y
empujarme a volar.*

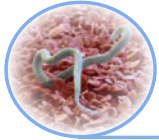
Las ilustraciones de esta tesis han sido cedidas por María Lorena

Esta tesis ha sido parcialmente financiada por la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información a través del Programa de Formación de Personal Investigador.



AGRADECIMIENTOS





AGRADECIMIENTOS

"No hay deber más necesario que el de dar las gracias"

Marco Tulio Cicerón (106-43 a.C.)

Cambiar de continente no es fácil, una vida queda atrás para empezar otra. Las costumbres, la cultura, la gente, nada es igual.

Nunca bajé los brazos por difícil que pareciera el reto. Debía luchar por hacerme un lugar ahí donde nadie sabía de mí.

Una vez que el primer obstáculo fue superado -la burocrática convalidación del título-, comencé mi andadura en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

En la Facultad de Veterinaria, empecé el máster con la ilusión de un niño, pero tímidamente, intentado, al comienzo, simplemente tantear el terreno.

Sin embargo, ese tanteo se dio de bruces con la energía y la incombustión de Alberto Montoya. Un hombre que siempre cargaba con ideas nuevas y las mejores soluciones; sensible, amigo y humano, fue un honor que pensara en mí para trabajar en ese mundo tan apasionante de la investigación

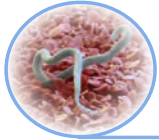
clínica. Le agradezco haber sido mi director y mentor en esta aventura.

El camino ha sido largo, y sin embargo, el no andarlo sola me ha ayudado a que me cargara, cada día, de pasión por el aprendizaje y el descubrimiento. Por eso es justo dar las gracias a todos estos compañeros de viaje.

A José Cerón, un hombre amable que dirige un maravilloso equipo de personas, y con el que fue un verdadero placer trabajar. A día de hoy siento auténtica admiración por ese grupo de profesionales que desde la pasión y la constancia consigue los resultados propios del trabajo bien hecho.

Y es que con José, hasta la pesada estadística o la redacción del artículo parecían sencillas porque, a pesar de los muchos errores que yo cometía, siempre aparecía él diciendo: "corrige esto, pero lo estas haciendo muy bien, ¡ánimo!".

También a Elena, por los 4 años vividos y porque seguramente es la persona que mejor conozca cada renglón de esta tesis. A ellos, Alberto, José y Elena, los directores de esta tesis, gracias.



AGRADECIMIENTOS

A Cande, con la que desempolvé los libros de técnicas de laboratorio, la bata blanca y las botas de goma, los paseos a la granja, el bus y las tantas anécdotas entre vacas y cabras. Las peripecias diarias para poder lograr nuestro objetivo: que los chicos y las chicas aprendieran, son ya un recuerdo inolvidable. Con ella yo misma, desde luego, aprendí. Llevaré en el corazón lo vivido.

A Vane, la nobleza en la tierra. Alumna ejemplar, pero mejor persona aún si cabe. Es la joya que me llevo y que tendré para siempre, en esa colección exquisita de tesoros que me dio la vida, bajo la forma de buenas amigas.

A Yuber, linda, risueña, noble y humilde. Ella fue quien me presto sus oídos y me amenizó los silencios con palabras cargadas de sentido.

A los compañeros del despacho, ese frío y bullicioso rincón, que fue nuestro punto de encuentro. Bernardo, siempre tan simple y tan cargado de paciencia y discreción; Fátima, tan llena de energía. Simplemente gracias compañeros, por darle diferentes matices a mis días.

A los alumnos, sin duda los que mayor motivación y entusiasmo me generaban, porque con sus ganas de

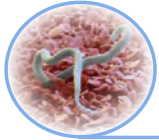
aprender, con sus constantes preguntas y con esa curiosidad insaciable, me obligaban a ser mejor cada día. Cuatro años en los que disfrute a diario y me llene de su energía y juventud. Y por eso son ellos los que mayor provecho sacaran a esta tesis.

A mis pequeñas, que cargan de sentido mis días, ellas que mientras trataban de aprender a dar sus primeros pasos, sus primeras palabras, yo trataba de aprender de filarias y de proteínas. A ellas que me enseñan tanto, con sus sonrisas, con sus abrazos, a ellas que tienen la magia de robar almas con sus besos.

A Santi, mi mejor amigo, compañero incondicional, que no le bastaba con ser el letrado que mas sabía de moquillo canino, que ahora es el que mas sabe de filarias. Gracias por escucharme, por entenderme, y por que estoy convencida de que sin sus ánimos esto no sería posible. A ella, mi familia, gracias por entender mis ausencias y por estar conmigo cuando no todo era bonito.

A mis amigos, por aguantar mis locuras, por las panzadas de mate y las charlas interminables.

Y es que no puedo nombrar a cada una de las personas a



AGRADECIMIENTOS

las que quiero dar las gracias, porque la lista sería interminable, pero ellas lo saben, porque el agradecimiento es la memoria del corazón.

Y por supuesto, un gracias cargado de cariño a mi hermana Lorena, que con su cálida y bella manera de expresarse ha adornado los rincones de esta tesis que hoy usted tiene en sus manos.

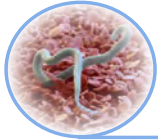


Lorena Ruiz



ÍNDICE

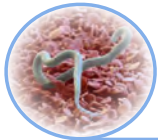




ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	9
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. DIROFILARIOSIS CARDIOPULMONAR CANINA	13
3.1.1. TAXONOMÍA	13
3.1.1.1 Clasificación taxonómica	13
3.1.2. MORFOLOGÍA	14
3.1.3. CICLO BIOLÓGICO	17
3.1.3.1 Desarrollo de las larvas en los vectores	20
3.1.3.2. Desarrollo en los mamíferos hospedadores	22
3.1.4. <i>WOLBACHIA</i>	26
3.1.4.1. Historia	26
3.1.4.2. El hábitat celular de <i>Wolbachia</i> en los nematodos	27
3.1.4.3. Crecimiento y dinámica de la población	29
3.1.4.4. Efecto de <i>Wolbachia</i> sobre el huesped	30
3.1.4.5. Quimioterapia	33
3.1.5. EPIDEMIOLOGÍA	34
3.1.6. FISIOPATOLOGÍA	38
3.1.6.1. Endoarteritis pulmonar proliferativa	38
3.1.6.2. Hipertensión pulmonar	41
3.1.6.3. Insuficiencia cardíaca derecha	43
3.1.6.4. Síndrome de la vena cava	44
3.1.6.5. Alteración del parénquima pulmonar	45
3.1.6.6. Neumonitis alérgica	47
3.1.6.7. La tromboembolización	49

3.1.6.8. Coagulación Intravascular Diseminada (CID)	50
3.1.6.9. Neumotórax	51
3.1.6.10. Lesión renal	51
3.1.6.11. Lesión hepática	53
3.1.6.12. Otras alteraciones orgánicas	53
3.1.7. SIGNOS CLÍNICOS	54
3.1.8. DIAGNÓSTICO	59
3.1.8.1. Examen físico	60
3.1.8.2. Detección de antígenos	60
3.1.8.2.1. Detección de microfilaria en sangre	63
3.1.8.2.2. Diferenciación de las Microfilarias	65
3.1.8.2.3. Identificación morfométrica	66
3.1.8.2.4. Método histoquímico	66
3.1.8.3. Radiografías torácicas	68
3.1.8.4. Ecografía	71
3.1.8.5. Electrocardiografía	75
3.1.9. TRATAMIENTO	77
3.1.9.1. Eliminación de larvas migratorias y microfilarias	80
3.1.9.2. Eliminación de <i>Wolbachia</i>	82
3.1.9.3. Eliminación de los parásitos adultos	84
3.1.9.4. Efectos adversos a melarsomina	86
3.1.9.5. Confirmación de la eficacia del tratamiento adulticida	87
3.1.9.6. Otras consideraciones importantes	88
3.1.9.7. Extracción quirúrgica de los parásitos	89



ÍNDICE

3.1.10. PREVENCIÓN	91
3.1.10.1. Lactónas macrocíclicas	91
3.1.10.2. Administración por vía oral	95
3.1.10.3. Administración por vía tópica	95
3.1.10.4. Administración parenteral	96
3.1.10.5. Falta de eficacia y resistencia parasitaria	96
3.2. INFLAMACIÓN	99
3.2.1. CONCEPTO	98
3.2.2. HITOS EN LA INFLAMACIÓN	100
3.2.2.1. Historia de las proteínas de fase aguda	102
3.2.3. TIPOS DE INFLAMACIÓN	103
3.2.4. RESPUESTA DE FASE AGUDA	108
3.2.4.1. Conceptos generales	108
3.2.4.2. Proteínas de fase aguda	113
3.2.4.3. La inducción y la regulación de la respuesta de fase aguda	114
3.2.4.4. Clasificación de proteínas de fase aguda	118
3.2.5. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA COMO BIOMARCADORES EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA	121
3.2.5.1. Proteínas de fase aguda en medicina humana	121
3.2.5.2. Proteínas de fase aguda en pequeños animales	123
3.2.6. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA OBJETO DEL ESTUDIO	126
3.2.6.1. Proteína C Reactiva (CRP)	126
A. Estructura de la CRP canina	128

B. Las funciones biológicas de la CRP	129
C. Ensayos para la determinación de la CRP	130
3.2.6.2. Haptoglobina (Hp)	132
A. Estructura	135
B. Función biológica	137
C. Ensayos para la determinación de Hp	139
3.2.6.3. Paraxonasa-1 (PON-1)	141
A. Estructura	144
B. Función biológica	145
C. Ensayos para determinación de PON-1	146
3.2.6.4. Albúmina	148
A. Estructura	149
B. Función biológica	150
C. Ensayos para la determinación de albúmina	152
4. ARTÍCULOS	155
Acute phase response in dogs with <i>Dirofilaria immitis</i>	157
Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment	165
5. CONCLUSIONES	173
6. RESUMEN	177
7. BIBLIOGRAFÍA	183
8. CURRÍCULUM VITAE	237



1. INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

La infección generada por el nematodo *Dirofilaria immitis* causa la dirofilariosis cardiopulmonar canina. Otras sinonimias tales como: enfermedad del gusano del corazón, verminosis cardiaca o *heartworm disease* también son utilizadas. Es destacable que a pesar de que todas éstas denominaciones indican su localización exclusivamente cardiaca, el parásito en su estado adulto reside principalmente en las arterias pulmonares del huésped definitivo, llegando al ventrículo derecho en las fases más avanzadas de la enfermedad, y cuando se realizan los exámenes post-mortem es donde se observan los parásitos.

El hospedador definitivo principal de la dirofilariosis cardiopulmonar, es el perro doméstico, aunque otros cánidos silvestres como zorros, coyotes, y lobos también lo son y participan como reservorios. Por otro lado, el gato doméstico y los mustélidos (hurones) son huéspedes definitivos alternativos. En éstos existe una carga parasitaria baja y generalmente son amicrofilarémicos.

Existen diferentes especies de mamíferos que actúan como hospedadores accidentales, entre ellos, osos, mapaches, felinos silvestres, caballos. En general, estos animales pueden resultar infectados, aunque en ellos no se produce microfilaremia y, por lo tanto, no actúan como reservorios.

Cabe destacar que es una zoonosis, y cuando el hombre resultar infectado, desarrolla un nódulo pulmonar benigno y generalmente asintomático, al que se denomina dirofilariosis pulmonar humana. Por otro lado, es posible que contribuya a el desarrollo de reacciones alérgicas en personas residentes en áreas endémicas (Pou-Barreto *et. al.*, 2008).

Esta enfermedad parasitaria es cosmopolita y de distribución mundial. Se localiza en zonas con elevada temperatura y humedad durante, al menos, una parte del año. Aunque, cada vez con mayor frecuencia se presentan casos de la enfermedad en países donde la dirofilariosis no estaba previamente documentada.

La razón podría atribuirse, en parte, al creciente interés de la comunidad científica en la dirofilariosis; así como a otros factores: el cambio climático (provocando que un aumento de la gama de vectores específicos de *Dirofilaria spp.* en algunas regiones), los diferentes aspectos de la actividad humana (como nuevas zonas de cultivo), el transporte libre (con la introducción de nuevas especies de mosquitos potencialmente transmisores), o el comercio de animales reservorios de la enfermedad; que hacen que la expansión de la enfermedad sea una consecuencia inevitable.

1 INTRODUCCIÓN

La finalidad del tratamiento de esta enfermedad es la eliminación de las diferentes fases parasitarias del organismo del animal; lo que conlleva a un procedimiento agresivo que supone un riesgo para la vida del animal. Por esto, el tratamiento supone un desafío para el veterinario sobre todo en las etapas más avanzadas de la enfermedad.

A pesar de los avances en el conocimiento de *D. immitis* y la patología que causa en el perro, dirofilariosis cardiopulmonar canina sigue siendo una prioridad objeto de estudio en la medicina veterinaria, casi 400 años después de su descubrimiento.

Entre estos estudios, destacan aquellos que fueron objeto de esta tesis, como la patología de la enfermedad, la respuesta inmune y el manejo clínico y terapéutico de la enfermedad.

En relación a la respuesta inmune, la respuesta de fase aguda se considera un proceso dinámico que implica cambios sistémicos y metabólicos. Que proporcionan un mecanismo de defensa no específica temprana antes de conseguir la inmunidad específica. Durante la respuesta de fase aguda, toman un papel protagonista las proteínas de fase aguda (PFA), que son proteínas plasmáticas que

modifican sus concentraciones tras un estímulo (atribuible a enfermedades infecciosas, inmunológicas, neoplásicas, traumáticas, o a otras causas), y cuyo propósito es el de restaurar la homeostasis para eliminar la causa del disturbio.

El análisis de PFA en veterinaria está siendo un área de gran interés. Especialmente útil para la valoración del estado de salud de los animales ante las diferentes situaciones que modifican su actividad; como así también, para monitorizar los tratamientos y establecer un pronóstico.

Debido a que cada proteína de fase aguda se comporta de manera distinta ante un daño tisular o estado inflamatorio, se recomienda utilizar dos o más proteínas, (por ejemplo una proteína de fase aguda que rápidamente cambie su concentración plasmática, como la proteína C reactiva (CRP), unida a otra que modifique sus valores más progresivamente, como la haptoglobina (Hp)). De este modo, se obtendrá mayor información sobre la evolución temporal del proceso patológico y se incrementará la capacidad diagnóstica de las PFA para diferenciar entre animales sanos y enfermos. Permite valorar la respuesta al tratamiento, así como ayudar a decidir el protocolo terapéutico adecuado a aplicar en cada caso, y establecer

1 INTRODUCCIÓN

un pronóstico más preciso de la enfermedad.

Por lo tanto, las PFA nos ofrecen la posibilidad de evaluar los procesos inflamatorios que el parásito *Dirofilaria immitis* genera en el hospedador. Permitiendo valorar, de forma más adecuada y objetiva, el estado fisiopatológico del animal afectado.



2. OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

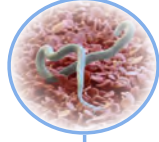
Los objetivos de esta tesis se han estructurado según las dos experiencias realizadas, que fueron:

1. Determinar las concentraciones de las diferentes proteínas de fase aguda positivas y negativas (proteína C-reactiva, haptoglobina, albúmina y la paraoxonasa-1) en perros infectados naturalmente con *D. immitis* en el momento del diagnóstico.

2. Evaluar las variaciones en la concentración de diferentes PFA en los perros infectados con *D. immitis* durante las diversas etapas del tratamiento adulticida con ivermectina, doxiciclina y melarsomina, siguiendo el protocolo de *American Heartworm Society (2014)*.



3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



1. DIROFILARIOSIS CARDIOPULMONAR CANINA

1.1. TAXONOMÍA

Dirofilaria immitis (Leydi, 1856): son vermes cardiopulmonares, nematodos de color blanco a amarillo crema y de aspecto filiforme.

Dentro del género *Dirofilaria*, existen varias especies, pero las que toman relevancia son *D. immitis* y *D. repens* por su importancia clínica y zoonótica.

1.1.1. Clasificación taxonómica:

Phylum	Clase Nematoda
Nemathelminthes	Orden Spirurina
	Super familia Filarioidea
	Género <i>Dirofilaria</i>
	Especie <i>Immitis</i>

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Dirofilaria immitis* (Marquardt *et al.*, 2000; Urquhart *et al.*, 2001).

1.2. MORFOLOGÍA

D. immitis es un nematodo alargado, filiformes, con la extremidad cefálica ligeramente delgada y redondeada. El cuerpo carece de segmentación y la cutícula es realmente gruesa, con estriaciones transversales y longitudinales. La apertura oral es terminal, circular y carece de labios, está rodeada de 4 pares de pequeñas papilas cefálicas y 2 anfibios laterales, que actúan como quimiorreceptores. Carece de faringe y el esófago se diferencia en dos regiones no muy bien delimitadas, una muscular y otra glandular. El ano se ubica en posición subterminal. Presentan dimorfismo sexual marcado (Soulsby, 1987; Manfredi *et al.* 2007; Fortunato *et al.* 2010).

Las hembras adultas miden de 250 a 310 mm de longitud y de 1 a 1,3 mm de ancho. Tienen el extremo caudal obtuso; el ano es subterminal y la apertura de la vulva se encuentra justo posterior a la unión del esófago y el intestino (Uni y Takada, 1986; Lichtenfels *et al.*, 1985).

Los machos son más pequeños que las hembras, miden entre 120-200 mm de longitud y 0,7-0,9 mm de ancho. El extremo caudal está curvado en espiral, y tiene dos pequeñas alas laterales. La cloaca se abre a 0,13 mm desde

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

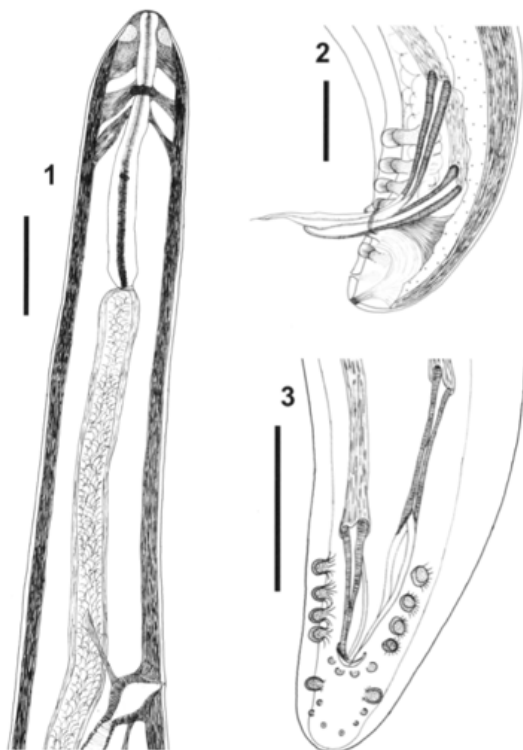
la punta de la cola. Presenta de 4 a 6 pares de papilas ovales, una de las cuales es post-cloacal, dos son digitiformes laterales y posteriores al orificio cloacal y 3 a 4 son papilas cónicas próximas al extremo de la cola. Las espículas son desiguales (izquierda aguzada mide 0,324 a 0,375 mm y la derecha tiene una terminación roma y mide 0,19 a 0,229 mm). El gubernáculo está ausente (Uni y Takada, 1986; Lichtenfels *et al.*, 1985).

Las características morfológicas de las microfilarias son: la extremidad cefálica es cónica y la cola es larga, recta y delgada. La punta de la cola está aguzada. Las microfilarias miden de 290 a 330 micras de largo y de 5 a 7,5 micras de ancho. Pueden sobrevivir de 2 a 18 meses en la corriente sanguínea (Manfredi *et al.*, 2007).

Los adultos de *D. immitis* se alimentan de plasma, pudiendo vivir varios años en sus anfitriones. Son nematodos ovovivíparos, de modo que las hembras liberan microfilarias desenvainadas en el torrente sanguíneo.

<i>Dirofilaria immitis</i>	LONGITUD	ANCHURA	CARACTERÍSTICAS
Macho	120 a 200 mm	0,7 a 0,9 mm	Extremo posterior termina en espiral.
Hembra	250 a 310 mm	1 a 1,3 mm	Extremo posterior es Redondeado y no termina enrollado en espiral.
Microfilaria	290 a 330 μ m	5 a 7 μ m	Extremo cefálico es más estrecho que el cuerpo. El extremo caudal puntiagudo y recto.

Tabla 2: Características morfológicas de microfilarias y de adultos hembras y machos.



(1) Extremo anterior de la hembra, que muestra el anillo nervioso, esófago, primera parte del intestino grueso y la apertura de la vulva. Bar = 200 μ m. (2) Vista lateral del extremo posterior masculino, mostrando las grandes y pequeñas espículas, papilas pre-cloacales, grandes papilas post-cloacales ventro-lateral, y los fásmidos. Bar = 100 μ m. (3) Vista ventral del extremo posterior masculino, con las papilas pre-cloacales, un pequeño par de papilas post-cloacal, apertura cloacal, 4 pares de papilas post-cloacal (1 par ventral, 1 par de grandes papilas ventro-laterales y 2 pares de papilas pequeñas ventro-laterales), 1 par de fásmidios ventrales, y grandes y pequeñas espículas. Bar = 100 μ m. Imagen extraída de Furtado, *et al.*, (2010).

Figura 1: Aspectos microanatómicos de *Dirofilaria immitis*.

1.3. CICLO BIOLÓGICO

Se trata de una enfermedad de ciclo vital indirecto utilizando un anfitrión vertebrado y un hospedador intermediario. El perro doméstico es el hospedador principal. Sin embargo, algunos cánidos silvestres como lobos, zorros, o felinos (incluyendo los gatos domésticos), mustélidos (hurones), primates no humanos y seres humanos pueden ser infectados; es estas especies la mayoría de estas infecciones son esporádicas y la microfilaremia generalmente está ausente (Bariga, 1982; Lok, 1988; McCall *et al.*, 2008a; Simón *et al.*, 2012).

Los vectores son los mosquitos hembras que pertenecen al orden *Díptera*, suborden *Nematóceras*, familia *Culicidae*. La Familia *Culicidae* está representada por casi 3.610 especies, entre las cuales aproximadamente 150 pertenecientes al género *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* y *Haemagogus* están involucrados en la transmisión de agentes patógenos a los animales y los seres humanos. Estos son mosquitos que se caracterizan por ser pequeños, poco voluminosos y de patas largas (Cancrini *et al.*, 2006; Guedes, 2012).

El alto grado de adaptabilidad de estos insectos ha asegurado su presencia en todo tipo de hábitats. Las formas inmaduras se desarrollan en ambientes acuáticos que están presentes en áreas domésticas, peri-domésticas y forestales. Algunas especies se pueden desarrollar en el agua que contiene materia orgánica en descomposición, como por ejemplo en pequeños hoyos y zonas de aguas residuales, mientras que otros utilizan una variedad de objetos de origen humano; como por ejemplo, neumáticos, latas, botellas, platos y floreros, tanques de agua o cubos (Da Silva *et al.*, 2014).

El desarrollo y la actividad de los mosquitos están regulados por el clima, principalmente por la temperatura ambiente y la humedad. La evidencia experimental ha demostrado que el desarrollo de la larva infecciosa (L3) requiere entre 8 a 10 días a 28-30 °C, de 11 a 12 días a 24 °C y de 16 a 20 días a 22°C. Por debajo de 14 °C, su desarrollo se detiene. Las larvas de *dirofilaria* sobreviven en el mosquito hibernante, que reanudarán su desarrollo cuando las condiciones mejoren, ocurriendo esto incluso en períodos cortos de tiempo (Orinhel, 1961; Slocombe *et al.*, 1989; Cancrini y Gabrielli, 2007).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En las zonas tropicales, los mosquitos están activos todo el año, mientras que en climas templados están activos durante el final de la primavera y el verano, y su actividad es estacional.

El calentamiento global (con un aumento previsto de la temperatura media de + 0,2 ° C en 10 años) está provocando un alargamiento de los períodos anuales de actividad de los mosquitos, acortando la etapa de desarrollo de las larvas dentro del vector, además de producir un aumento de los meses de transmisión en múltiples regiones geográficas (Romi, 2001; Genchi et al., 2005; Brooks y Hoberg, 2007).

El mosquito macho se alimenta principalmente de los zumos de fruta, mientras que la hembra también es hematófaga. Este hábito permite a la hembra participar en la transmisión de la filariosis. La capacidad y eficiencia vectorial de los mosquitos está condicionada por el desarrollo de las piezas bucales, y la presencia de anticoagulante en la saliva, ya que las especies de mosquitos no susceptibles parecen carecer de anticoagulinas, de modo que la ingesta de sangre coagula en el interior del intestino del mosquito, dejando atrapadas

en el interior del intestino del mosquito, dejando atrapadas a las larvas (Gómez *et al.*, 1999; Kittleson y Kienle, 2000).

1.3.1. Desarrollo de las larvas en los vectores:

Los mosquitos hembras ingieren microfilarias al alimentarse de sangre de un huésped infectado, éstas pasan a través de la faringe y alcanza el intestino medio donde permanecen durante aproximadamente 24 horas. Posteriormente, pasan a los túbulos de Malpighi donde realizan dos mudas, llegando así a la fase infectante (L3) (Cancrini y Gabrielli, 2007; Manfredi *et al.*, 2007).

Las larvas L3 dejan los túbulos de Malpighi perforando en tercio distal, migrando a través del hemocele para alcanzar las piezas bucales, donde permanecen hasta ser depositadas junto con la hemolinfa en la piel de nuevo hospedador. Cuando el insecto ha perforado la piel para alimentarse de nuevo entra al hospedador definitivo (Nelson *et al.*, 1962; Cancrini y Kramer, 2001).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

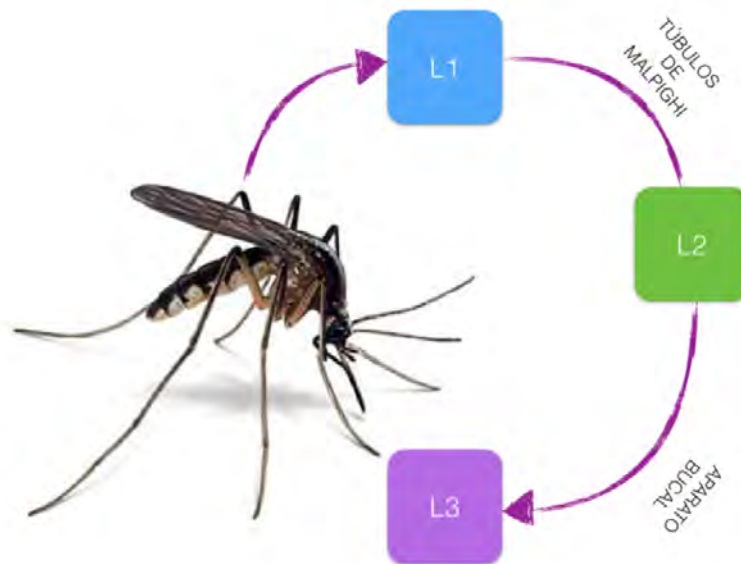


Figura 2: Ciclo biológico en el hospedador intermediario.

El proceso de invasión inicial de las células de Malpighi por parte de las L1 y el de migración a las piezas bucales de la L3 son momentos críticos para la supervivencia de los mosquitos. Cuando la carga parasitaria es elevada, la función tubular se ve comprometida y el insecto muere. Para ello, los vectores presentan un mecanismo de reconocimiento antigénico y de defensa celular-humoral que limitan el número de larvas que puede progresar a L3. El número máximo de larvas que puede sobrevivir en cada vector compatible depende de la especie de mosquito (Cancrini y Gabrielli, 2007; Castillo *et al.*, 2011).

1.3.2. Desarrollo en los mamíferos hospedadores:

Las larvas L3 infecciosas, de aproximadamente 1 mm de longitud, se transmiten al hospedador definitivo mientras el mosquito se alimenta. Durante la comida la punta de las labelas (partes carnosas de la boca) se rompe y la L3 se deposita en la piel del huésped protegiéndose de la deshidratación gracias a la hemolinfa del mosquito. Estas larvas, sexualmente diferenciada penetran en el cuerpo a través de la solución de continuidad producidas por la probóscide del mosquito al picar (McGreevy *et al.*, 1974; Georgi y Georgi, 1994).

Tres días después de la infección, (aunque puede demorar hasta 70 días), mudan a L4, midiendo 1,5 mm aproximadamente, y permanecen en el tejido subcutáneo, cerca del punto de penetración (Kotani y Powers, 1982; Lichtenfels *et al.*, 1985). Aproximadamente sobre el día 21, las larvas migran entre las fibras musculares y cerca del día 41 se presentan en el abdomen ó en el tórax. La muda posterior, de L4 a L5 (jóvenes pre-adultos sexualmente inmaduros), se lleva a cabo entre los días 50 y 70. Los primeros gusanos pre- adultos llegan a la arteria pulmonar entre los días 70 y 85 y alcanzan la madurez sexual a los 120 días post-inoculación y las hembras comienzan a producir

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

microfilarias entre 6,5 a 9 meses post-infección (Orihel, 1961; Kotami y Powers, 1982; Anderson, 2000). El número de gusanos adultos albergados puede variar desde uno a más de 250 y pueden vivir entre 5 y 7 años en su hospedador. El período prepatente es desde 5 hasta 7 meses en la especie canina (Manfredi *et al.*, 2007; McCall. *et al.*, 2008; Venco *et al.*, 2011).

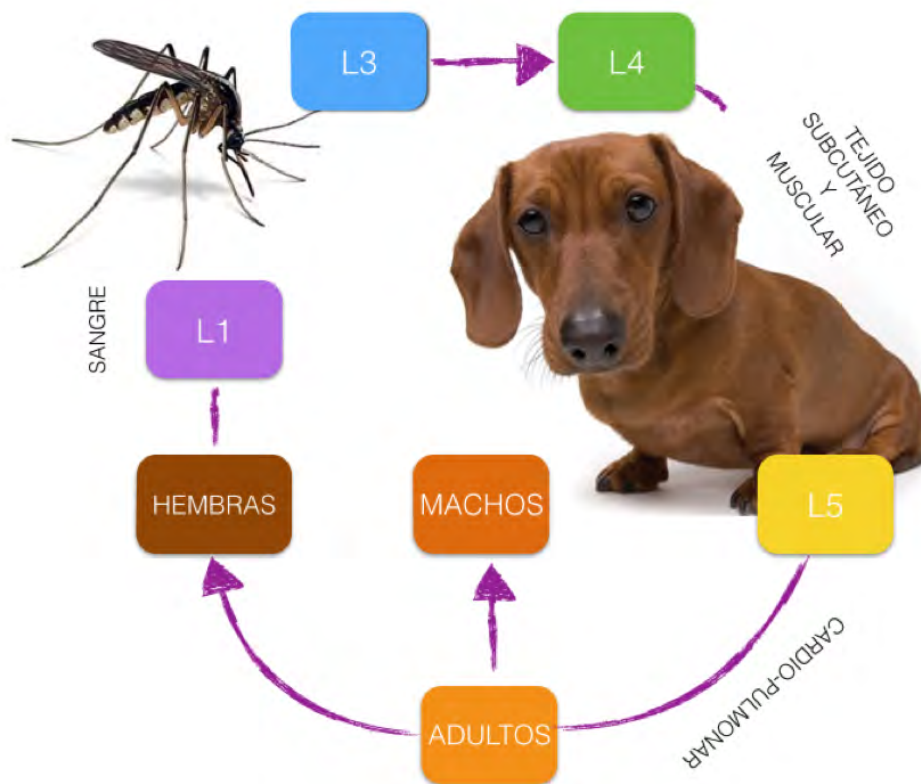


Figura 3: Ciclo biológico de *Dirofilaria immitis* en el perro.

ESTADIO	DÍA	LOCALIZACIÓN
L3	0	Subcutáneo
L4	3 – 10	Musculatura (abdomen)
L4	21	Musculatura (abdomen y tórax)
L4	41	Penetración en yugulares y otras venas
L5	50-70	Llegada de las larvas al pulmón
JUVENILES	70-85	Arterias pulmonares
ADULTAS	90-120	Arterias pulmonares principales
MICROFILAREMIA	210-279	Sangre periférica

Tabla 3: Desarrollo de los diferentes estadios de *Dirofilaria immitis* en el perro.

La microfilaremia aumenta durante los primeros 6 meses tras comenzar el periodo de patencia para declinar posteriormente. No existe relación entre la concentración de microfilarias y el número de hembras adultas, las microfilarias pueden estar presentes, incluso en ausencia de parásitos adultos. Aproximadamente un 60% de los perros con dirofilariosis presentan microfilaremia. El número de microfilarias circulantes varía a lo largo del día, anteriormente se pensaba que las mayores concentraciones se encontraban al final de la tarde y al principio de la mañana pero estudios actuales han demostrado niveles máximos al mediodía, a pesar de que han observados

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

patrones de distribución imperceptibles. Por lo tanto, las descripciones clásicas de periodicidad de *D. immitis* pueden no ser acertadas (Rawlings y Calvert, 1997; Dillon, 2000; Kittleson y Kienle, 2000).

Las microfilarias pueden vivir al menos dos años en el perro, aunque en algunos individuos el sistema inmune puede destruir las microfilarias y hacer que el animal se vuelva amicrofilaremico.

Las microfilarias pueden transmitirse de la madre al feto, por lo tanto, se pueden detectar microfilarias circulantes en los cachorros. Estas larvas no llegan a transformarse en parásitos adultos, aunque son infectivas para los mosquitos y pueden contribuir a la perpetuación del ciclo vital. Lo mismo ocurre con las microfilarias que se transmiten mediante transfusiones sanguíneas (Mantovani y Jackson, 1966; Atwell, 1981; Todd y Howland, 1983; Kittleson y Kienle, 2000).

Aquellos animales que están infectados con dirofilarias adultas y sin microfilaremia tienen lo que se denomina una enfermedad oculta. Las causas de las infecciones ocultas en perros se detallan en la tabla 4 (pág. 26).

CAUSAS DE INFECCIÓN OCULTA
Erradicación inmunomediada de las microfilarias (origen de un tercio de las dirofilariosis ocultas).
Infecciones con un solo sexo.
Infección prepatente.
Tratamiento microfilaricida con lactonas macrocíclicas.

Tabla 4: Causas de infección oculta por *Dirofilaria immitis* (Labarthe *et al.*, 1998; Rawlings *et al.*, 1982).

1.4. WOLBACHIA

1.4.1. Historia

En 1924, Hertig y Wolbach identificaron por primera vez en los mosquitos *Culex pipiens* una especie de bacteria que fue formalmente descrita como *Wolbachia pipientis*, un grupo de proteobacterias intracelulares perteneciente a la orden *Rickettsiales* (Hertig y Wolbach, 1924).

Estudios ultraestructurales posteriores mediante microscopía electrónica de *Dirofilaria immitis* y otros nematodos filaroides, permitieron observar la presencia de esta bacteria, tanto en adultos de ambos sexos, como en microfilarias y en las larvas presentes en el mosquito vector (Harada *et al.*, 1970; McLaren *et al.*, 1975; Kozek y Figueroa, 1977; Sironi *et al.*, 1995).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A pesar de ello, la importancia biológica de estos microorganismos seguía sin conocerse. Se iban aportando nuevos datos relacionados con la simbiosis bacteriana intracelular en artrópodos y vertebrados, pero era notablemente escaso el conocimiento acerca de las implicaciones biológicas y su asociación con los nematodos (Chang *et al.*, 1984). Ya en los años 90, gracias a los datos de secuenciación de ADN en *D. immitis*, las bacterias observadas en los nematodos filaroides se identificaron como pertenecientes al género *Wolbachia* (Sironi *et al.*, 1995; Bandi *et al.*, 1998).

Está ampliamente aceptado que la presencia de *W. pipientis* en el celoma de gusanos adultos es vital para su supervivencia y reproducción (Slatko *et al.*, 2010)

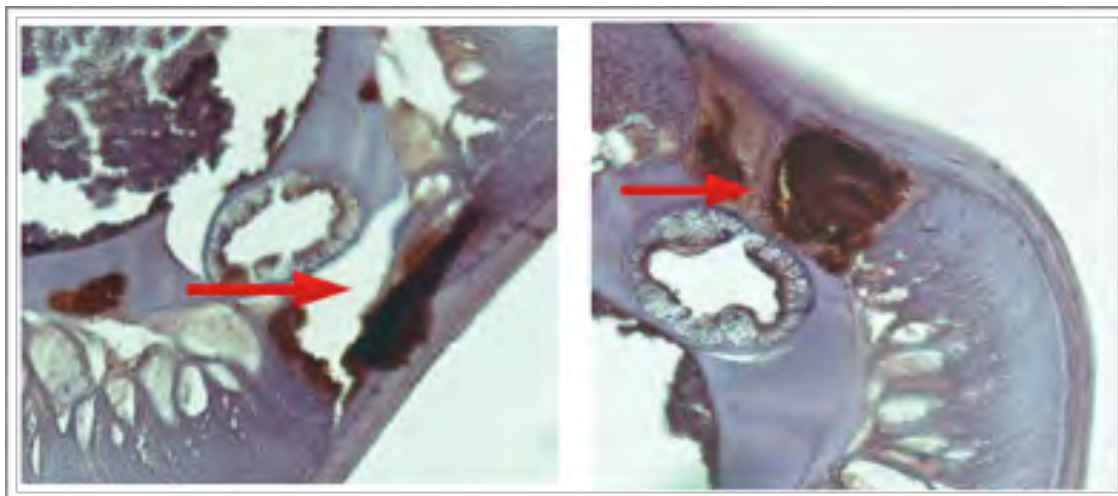
1.4.2. El hábitat celular de *Wolbachia* en los nematodos

Está presente en todas las etapas del ciclo de vida del nematodo; tanto en las etapas larvales dentro del vector, como en el huésped definitivo. Su presencia ocurre en proporciones variables en cada gusano, en los nematodos adultos, se encuentra predominantemente en las células hipodermales de los cordones laterales (Taylor, 2005; McCall, 2008b).

Wolbachia suelen aparecer en poblaciones bacterianas de forma bastante homogénea. Los grupos pueden ser pequeños, constando de pocos organismos, o pueden ser tan grandes que las bacterias parecen ocupar la mayoría del tejido hipodérmico de la cuerda lateral. A menudo aparecen rodeando el núcleo hipodérmico (Kozek, 1977; Kramer *et al.*, 2003; Taylor, 2005).

En las hembras, *Wolbachia* también está presente en los ovarios, oocitos y durante el desarrollo de las fases embrionarias dentro del útero. No se han demostrado su presencia en el sistema reproductor masculino (Kozek, 2005). Esto sugiere que la bacteria se transmite verticalmente a través del citoplasma del óvulo y no a través de los espermatozoides. *Wolbachia* parece tener un importante efecto de reacciones inflamatorias en el hospedador (Bandi *et al.*, 1999; Sacchi, 2002; Kozek, 2005).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



Figuras 4 y 5. Imagen tomada al microscopio (x40) de Wolbachia en un corte transversal de un parásito adulto de *D. immitis* teñidas mediante técnicas de inmunohistoquímica específicas cuyo suero policlonal anti-Wolbachia. Las bacterias se pueden observar teñidas de color granate en los cordones laterales (Carreton, *et al.*, 2012).

1.4.3. Crecimiento y dinámica de la población

Las células bacterianas son pleomorficas, su tamaño varían entre 0,2 a 4 μm de longitud (Kozek, 2005).

Wolbachia tiene la capacidad de reproducirse por diferentes métodos: por fisión binaria, el modo más común de reproducción en las bacterias y, posiblemente, por un método más complicado, similar al ciclo de desarrollo de la *Chlamydiae*, que se caracteriza por la formación de pequeñas partículas esféricas, y su posterior crecimiento y desarrollo en las formas bacterianas más grandes. Estas formas mas pequeñas se denominan cocoides (o cuerpos

elementales) y son las formas infectantes a otras células (Storz, 1971; Kozek, 2005).

Las proporciones más bajas de bacterias / parásito se encuentran en las microfilarias y en las etapas larvales L2 y L3, dado que su población permanece estática. Sin embargo, durante la primera semana de la infección del huésped mamífero, el número de bacterias aumentan dramáticamente y la relación de bacterias/ parásito es el más alta de todo el ciclo de vida del parásito. La multiplicación rápida continúa durante todo el desarrollo de la larva L4, por lo que el principal período de crecimiento de la población bacteriana se produce dentro del primer mes de la infección del hospedador definitivo (Kozek, 2005; Taylor, 2005).

La carga bacteriana varía ampliamente en cada parásito de manera individual; al parecer, para los gusanos con mayor cargas bacterianas supone una ventaja selectiva, en términos de longevidad o la fecundidad (Taylor, 2005).

1.4.4. Efecto de *Wolbachia* sobre el huésped

Estas bacterias contribuyen a los efectos patógenos de la dirofilarias, por lo que el tratamiento frente a *Wolbachia*

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

debe ser incluido en el protocolo del tratamiento adulticida de la enfermedad (Kramer *et al.*, 2014).

Los perros infectados con *D. immitis* presentan una respuesta humoral específica frente a una proteína de *Wolbachia* denominada *Wolbachia* Surface Protein (WSP) similar a la respuesta observada en los gatos y en seres humanos con dirofilariosis pulmonar (Bazzocchi *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2005). Además se asocia con la expresión de citocinas pro-inflamatorias y el reclutamiento de neutrófilos con predominio de anticuerpos IgG2, que es indicativo de la respuesta mediada por células, del tipo Th1 (Kramer *et al.*, 2005; Kramer *et al.*, 2008). La exposición del hospedador a *Wolbachia* puede producirse por varios mecanismos que se detallan en la tabla 5 (pág. 32).

Dado que los gusanos de *D. immitis* se alojan en el sistema circulatorio del hospedador, cualquier producto derivado de *Wolbachia* liberado por los mismos entra en la circulación y puede dispersarse por todo el organismo, afectando a la vasculatura pulmonar, el sistema reticuloendotelial espleno-hepático, y puede ser filtrado por el riñón. Así, estos órganos son sitios de predilección para la ubicación de antígenos bacterianos de y para la formación de lesiones (Kozek, 2005; Taylor, 2005).

MECANISMOS DE EXPOSICIÓN DEL HOSPEDADOR A *WOLBACHIA*

1. La bacteria *Wolbachia* se libera cuando los adultos o los estadios larvarios del parásito mueren como resultado de la reacción de defensa del hospedador, o después de la administración de fármacos adulticidas o larvicidas, y son degradados por el hospedador.
2. Se produce una liberación lenta y continua de *Wolbachia* desde el útero, durante el tiempo de vida de la hembra o a través de fragmentos de huevo que son arrojados por las hembras, cuando las microfilarias son liberadas dentro del cuerpo de los hospedadores vertebrados.
3. Limitado a productos solubles y pequeñas formas de *Wolbachia* que, a través de la red canalicular de las cuerdas laterales (de la superficie perientérica), entran en contacto con redes similares de los canales excretores.

Tabla 5: Mecanismos por los que puede producirse la exposición del hospedador a *Wolbachia pipentis*. (Kozek, 2005).

Por otra parte, varios estudios han demostrado que estas bacterias también pueden disminuir la respuesta inmune del huésped, contribuyendo así a la inmuno-tolerancia característica de esta infección parasitaria a largo plazo (Genchi *et al.*, 2012).

1.4.5 Quimioterapia:

Está ampliamente aceptado por la comunidad científica que el tratamiento con antibióticos de los perros infectados con *D. immitis*, además de inhibir la embriogénesis del parásito, el desarrollo larvario y la producción de microfilarias, también afecta a la supervivencia de los parásitos adultos a largo plazo (Bazzocchi *et al.*, 2008; Grandi *et al.*, 2010). Por lo tanto, esta terapia tiene un efecto beneficioso sobre el hospedador, al reducir la patología producida por las filarias (Debrah *et al.*, 2011).

Wolbachia pipientis es susceptible a la tetraciclina, doxiciclina y rifampicina. Además, existe una nueva variedad de antibióticos pertenecientes a una nueva clase de inhibidores de la ARN-polimerasa que inhiben la transcripción; incluye coralopironina A a la que *Wolbachia* parece ser susceptible (Bandi *et al.*, 1999; Debrah *et al.*, 2011). Nuevos estudios continúan buscando moléculas eficaces contra la bacteria *Wolbachia* (Tamarozzi *et al.*, 2012).

1.5. EPIDEMIOLOGÍA

Aunque, cada vez con mayor frecuencia se presentan casos de la enfermedad en países donde la dirofilariosis no estaba previamente documentada y en los últimos años, se ha observado una expansión de la dirofilariosis en todo el mundo y podrían atribuirse, en parte, al creciente interés de la comunidad científica sobre la dirofilariosis. Además, el cambio climático, ha provocado que haya un aumento de la gama de vectores específicos de *Dirofilaria spp.* en algunas regiones que favorecen el desarrollo y proliferación de los mosquitos vectores (Simón *et al.*, 2012).

La dirofilariosis es una enfermedad cosmopolita y de distribución mundial, que se localiza en zonas con elevada temperatura y humedad durante, al menos, una parte del año.

Los factores epidemiológicos determinantes para el desarrollo de la dirofilariosis cardiopulmonar en el perro en una región se detallan en la tabla 6 (pág. 35).

D. immitis es una enfermedad endémica en América, África, Asia, Australia y el sur de Europa. Desafortunadamente, existen pocos datos epidemiológicos disponibles de Asia y

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

África.

En Europa, los casos de *D. immitis* en los países del norte, tales como el Reino Unido, los Países Bajos, Suecia, Hungría, Suiza, Austria, Polonia y Alemania, hasta el momento parecen ser todos casos importados de países endémicos. Por lo que en la actualidad, no hay infecciones autóctonas *D. immitis*.

FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS DETERMINANTES PARA EL DESARROLLO DE DIROFILARIOSIS CARDIOPULMONAR CANINA

Vectores: Deben ser capaces de soportar el desarrollo de nematodos hasta su etapa infecciosa L3, el viento y la intensidad de luz son factores importantes en su dispersión como vectores.

Presencia del parásito en la región.

Huésped: reservorio de especies susceptibles de ser portadoras y tiempo de exposición a los mosquitos de un hospedador.

Hábitat: índices de vegetación, características de los paisajes rurales, suburbanos y urbanos son determinantes para el desarrollo de las diferentes especies de mosquitos.

Temperaturas: temperaturas máximas, mínimas, medias y la capacidad de variabilidad durante el día.

Humedad: el índice humedad es importante, donde las precipitaciones y la evaporación brindan disponibilidad de agua para las puestas de huevos.

Tabla 6: Factores epidemiológicos determinantes para el desarrollo de dirofilariosis cardiopulmonar en el perro (Gómez *et al.*, 1999; Kittleson y Kienle, 2000).

En Europa, las prevalencias más elevadas se sitúan principalmente en países de la cuenca mediterránea y del sur, donde la enfermedad es endémica (Portugal, Francia, Italia, España). Algunos de estos países se caracterizan por la coexistencia de *D. immitis* y *D. repens*. Por otro lado, hay evidencias que demuestran que la dirofilariosis canina se está expandiendo a zonas previamente consideradas libres de la enfermedad del norte y noreste del continente (Araujo, 1996; Genchi *et al.*, 2009; Simón *et al.*, 2012).



Figura 6: Distribución geográfica en Europa de la filariosis observada en perros entre 2001 y 2011. Las áreas endémicas se señalan en rojo y los lugares donde se han registrado casos esporádicos se indican en rosa. Imagen extraída de Morchón *et al.*, 2012a.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En España *D. immitis* está presente en la mayor parte del territorio, aunque algunas regiones del país aún no han sido estudiadas. España cuenta con unas condiciones climáticas óptimas para el desarrollo de la parasitosis. Actualmente, las prevalencias más elevadas se encuentran en el sur de la Península Ibérica, en zonas de regadío y cercanías de los grandes ríos, por ej: la ribera del Tormes en Salamanca o el delta del Ebro, así como en las islas Canarias.

Se ha demostrado la presencia de dirofilariosis canina en La Rioja (12%) y A Coruña (5%), pero no hay más datos acerca de las prevalencias en el norte de la península ibérica (Montoya *et al.*, 2007; Simón *et al.*, 2009; Morchón *et al.*, 2010).

En la isla de Gran Canaria, la prevalencia canina actual está por debajo del 20%, pero en la década de los noventa, la prevalencia llegó a alcanzar el 67%. Esta disminución se debe a la implementación de protocolos preventivos y a la educación de los propietarios (Montoya *et al.*, 1998; Montoya-Alonso *et al.*, 2010; 2011).

1.6. FISIOPATOLOGÍA

La infección por *D. immitis* se caracteriza por diferentes cuadros clínicos, causados por los gusanos adultos y las microfilarias. Estos provocan lesiones graves e incluso la muerte de los perros, donde la gravedad y las manifestaciones clínicas resultantes están relacionados con el número relativo de los gusanos adultos, con la duración de la infección y la interacción huésped-parásito (McCall et al., 2008a; Atkins, 2011).

La fisiopatología de la dirofilariosis cardiopulmonar se debe principalmente a la presencia de gusanos adultos en las arterias pulmonares. A continuación se detallan las alteraciones principales producidas en esta enfermedad.

1.6.1 Endoarteritis pulmonar proliferativa

Las lesiones primarias se producen en las arterias pulmonares y en el parénquima pulmonar, lesiones que son, en su mayoría, atribuibles a la presencia de los parásitos adultos intravasculares. El contacto directo de los parásitos adultos con las paredes arteriales de los lóbulos pulmonares (caudales y accesorio principalmente), provoca alteraciones en las arterias pulmonares. Este hecho genera un

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



Figura 7: Presencia de parásitos adultos en las cámaras cardíacas derechas.

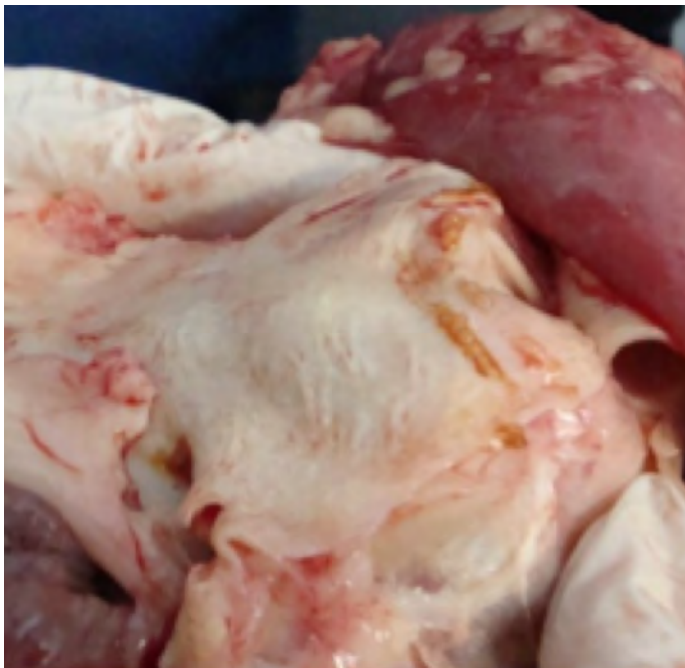


Figura 8: Arteria pulmonar de perro donde se visualiza el endotelio afectado por endarteritis pulmonar proliferativa.

engrosamiento de la íntima vascular y un estrechamiento de la luz vascular (Munnell *et al.*, 1980; Schaub *et al.*, 1981; Furlanello *et al.*, 1998; Kittleson y Kienle, 2000).

La endoarteritis pulmonar proliferativa es causada por una migración de células del músculo liso de la túnica media hacia la íntima, por lo que la pared de la arteria pierde sus características de blanca y lisa, desarrollando unas vellosidades que le dan un aspecto rugoso y una tonalidad púrpura otorgándole a la superficie de la arteria un aspecto similar al del endotelio intestinal (Adcock, 1961; Rawlings, 1986). Esta pérdida de lisura de la íntima promueve la formación de trombos, pero la embolización y total oclusión vascular es rara con gusanos vivos (Schaub *et al.*, 1981; McCall 2008a).

La endoarteritis pulmonar proliferativa, también llamada proliferación vellosa, se considera patognomónica de la dirofilariosis, apareciendo ya a los 3 meses de infección y se agrava a partir de los siguientes 2 meses. Estos cambios empiezan en las pequeñas ramas periféricas de la arteria pulmonar, en las que se fijan inicialmente los parásitos, y van avanzando hacia segmentos más proximales a medida que crecen las filarias (Gómez *et al.*, 1999; Kittleson y Kienle, 2000).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La severidad de la patología es exacerbada en los casos de dirofilariosis oculta inmunomediada y debido a la ruptura vascular por el fuerte flujo sanguíneo asociado al ejercicio, pudiendo ser una patología severa en presencia de pocos gusanos en perros atletas (Dillon, 2000; Kittleson y Kienle, 2000).

PRINCIPALES ALTERACIONES GENERADAS POR *DIROFILARIA IMMITIS*

Endoarteritis pulmonar proliferativa.

hipertensión pulmonar.

Hipertrofia e insuficiencia cardiaca derecha.

Síndrome de vena cava.

Alteración del parénquima pulmonar.

Lesión renal.

Lesión hepática.

Otras alteraciones orgánicas.

Tabla 7: Principales alteraciones generadas por *Dirofilaria immitis*.

1.6.2 Hipertensión pulmonar

La hipertensión pulmonar es consecuencia de varios factores. La pérdida de la elasticidad arterial, la disminución de la luz vascular y la formación de tromboembolismos pulmonares conducen al aumento de la resistencia del flujo sanguíneo, llevando a un incremento de la presión en la arteria pulmonar y generando hipertensión pulmonar.

Durante un tiempo, la presión arterial pulmonar se conserva normal en reposo y sólo se eleva moderadamente durante el ejercicio cuando las arterias alcanzan una distensión plena (Knight, 1977). Contribuyendo al síntoma clínico de intolerancia al ejercicio, observado habitualmente en perros con dirofilariosis, ya que durante el ejercicio, el flujo sanguíneo aumenta hasta tres veces sobre el nivel basal y la presión en la arteria pulmonar también puede triplicarse (Kittleson, 1998).

Con el tiempo, el árbol arterial pulmonar asume las características de un sistema de tubos rígidos generándose resistencia vascular pulmonar. Esto ocurre al mismo tiempo en que se eleva la presión arterial en reposo. En esta etapa, la presión se aumenta en proporción directa al aumento del flujo (Knight, 1977).

Para que la hipertensión pulmonar sea evidente en reposo, es necesario que se obliteren dos tercios o más del lecho vascular pulmonar (Kittleson y Kienle, 2000). Se cree que la gravedad de los cambios en la arteria pulmonar, junto con el aumento de la resistencia vascular pulmonar y de la presión en la arteria pulmonar, guarda relación con el número de parásitos, número de arterias parasitadas, grado de estrechamiento luminal, nivel diario de actividad física y,

sobre todo, la intensidad de la respuesta inmune individual de cada animal frente a las filarias.

1.6.3 Insuficiencia cardiaca derecha

En consecuencia a las alteraciones antes descritas, el trabajo cardíaco debe ser mayor al efectuado normalmente para mantener la alta presión de perfusión necesaria para impulsar la sangre al árbol arterial pulmonar.

A partir de un período aproximado de nueve meses, los efectos de la hipertensión pulmonar son compensados con la hipertrofia y/o dilación del ventrículo derecho. En casos avanzados de dirofilariosis, se produce insuficiencia cardíaca congestiva como resultado de la incapacidad del ventrículo derecho para generar y mantener las altas presiones de perfusión requeridas (Calvert *et al*, 1999; Kittleson y Kienle, 2000; Grandi *et al.*, 2007).

Con frecuencia, los perros en esta etapa experimentan síncope cuando se intenta aumentar repentinamente el gasto cardíaco. La insuficiencia cardíaca congestiva del lado derecho con ascitis, hepatomegalia y caquexia es una secuela tardía y puede ser precipitada por un episodio agudo de tromboembolismo pulmonar (McCall, 2008a).

1.6.4 Síndrome de la vena cava

El síndrome de la vena cava, es una consecuencia de la dirofilariosis por la migración retrógrada de los parásitos adultos, ocasionando interferencia en el flujo sanguíneo, produciendo una necrosis difusa del hígado debido a la congestión pasiva crónica y anemia hemolítica por aumento de la fragilidad de los glóbulos rojos. El factor desencadenante del síndrome es la entrada de una masa de parásitos en el ventrículo derecho, que se genera como consecuencia a una hipoperfusión transitoria o mantenida de las arterias pulmonares, sitio donde reside el parásito en su estado adulto. (Atkins, 1994; Kittleson y Kienle, 2000).

Los parásitos caen a través de la válvula pulmonar en el ventrículo derecho y luego migran hacia la aurícula derecha, trepando por el aparato valvular tricúspide. Si hay un gran número de parásitos, los primeros pueden verse forzados hacia el interior de la vena cava y una vez que las dirofilarias se han situado en el orificio de la válvula tricúspide y se ha producido regurgitación, el flujo de salida es demasiado débil para expeler los parásitos del ventrículo (Atkins, 1994; Kittleson y Kienle, 2000).

Este fenómeno provoca obstrucción del retorno sanguíneo

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

elevando la presión venosa central. Algunas consecuencias del síndrome son hepatomegalia, ascitis y hemoglobinuria severa, que se considera un signo patognomónico debido a una hemólisis severa (Jubb, 1992).

Un 20% de los casos de infestación por *Dirofilaria*, genera el síndrome de la vena cava, que se produce con una carga superior a 60 vermes, con el 55 a 84% de ellos en las venas cavas craneal, caudal y aurícula derecha. La razón del porqué algunos perros lo desarrollan y otros no, puede estar relacionado con la carga parasitaria absoluta o relativa (número de vermes por Kg. de peso corporal) (Jubb, 1992; Atkins, 1994).

El pronóstico del síndrome de la vena cava es de reservado a grave. La mortalidad está entre el 30 y el 40% (Kittleson y Kienle, 2000).

1.6.5 Alteración del parénquima pulmonar

Los lugares donde no llegan los vermes, aparecen alterados y esto es atribuido a factores de crecimiento derivados de las plaquetas y a otros factores tróficos que difunden desde la arteria pulmonar lesionada. Se generan edema e inflamación periarterial con formación de infiltrados



Figura 9: Paciente canino con síndrome de vena cava, con el característico abdomen en tonel a

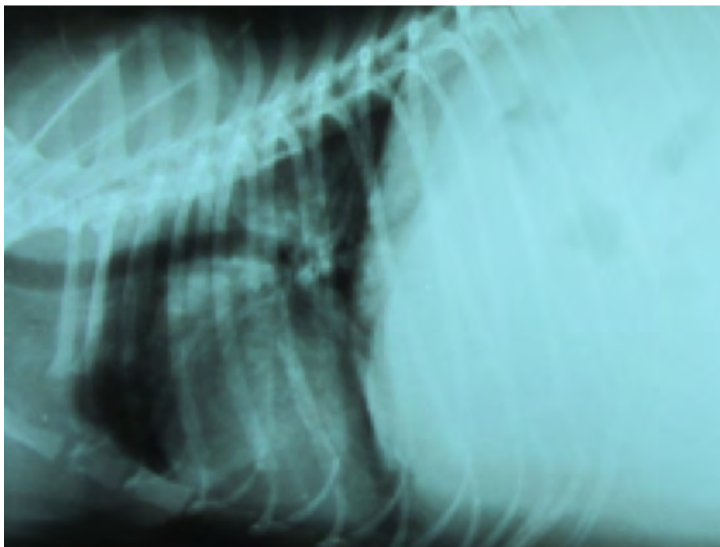


Figura 10 y 11: Radiografía torácica de un perro con síndrome de vena cava, en proyecciones dorso-ventral y latero-lateral derecha de paciente. Nótese el líquido ascítico, la dilatación de las arterias pulmonares y la cardiomegalia

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

intersticiales y alveolares, compuesto en esencia de eosinófilos y neutrófilos. La grave afección de las arterias pulmonares, hace aumentar la permeabilidad de las superficies vasculares al plasma y a las células inflamatorias (Kittleson y Kienle, 2000).

Además, el fuerte flujo sanguíneo incrementa la permeabilidad microvascular, lesión que es severa con gusanos vivos, pero se exagera cuando mueren (Dillon, 2000). Este aumento de la permeabilidad provoca la rotura de las células endoteliales aumentando el daño del lecho capilar y la inundación alveolar, con el resultando final de una fibrosis no reversible. Esta fibrosis contribuye a disminuir el área de intercambio gaseoso, aumentando la resistencia vascular pulmonar y produciendo insuficiencia respiratoria (Rawlings y Calvert 1997; Dillon, 2000).

1.6.6 Neumonitis alérgica

Entre un 10 y un 15% de los perros con enfermedad oculta tiene neumonitis eosinofílica (Ware, 2000).

Se trata de un síndrome provocado por la hipersensibilización del hospedador a los antígenos de microfilarias (también las L5 son alérgicas), que inducen la

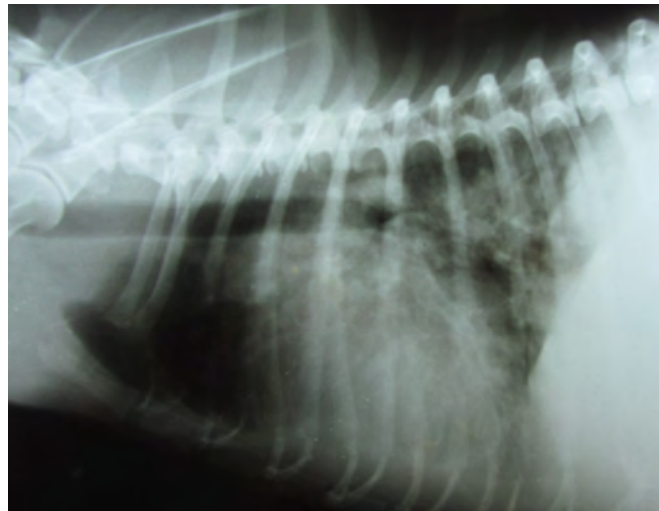
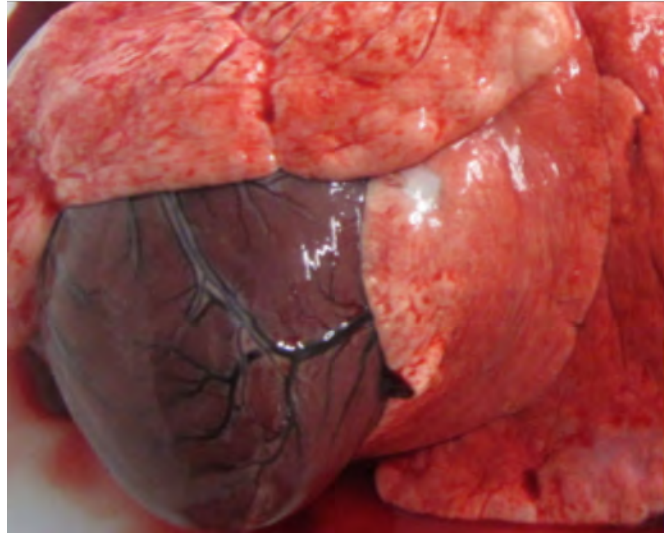


Figura 12: Focos de fibrosis pulmonares imagen de necropsia de un perro con dirofilariosis Figura 13: Radiografía latero-lateral derecha de perro infectado con por *D. immitis* donde se observa patron pulmonar mixto alveolo-instericial y agrandamiento de las arterias pulmonares con patrón vascular.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

destrucción inmunomediada de microfilarias por medio de anticuerpos. El exceso de anticuerpos antimicrofilarias (IgG), adhiere los leucocitos a las microfilarias, causando su secuestro e inmovilización en la microcirculación del pulmón (Calvert *et al.*, 1999).

Se genera el "síndrome de infiltración eosinofílica pulmonar" que se caracteriza porque las microfilarias muertas son rodeadas por inflamación eosinofílica granulomatosa (Rawlings y Calvert, 1997).

1.6.7 La tromboembolización

Este proceso patológico ocurre tras la muerte de los parásitos, de forma espontánea o inducida por el tratamiento adulticida, y rara vez cuando el parásito está vivo, pero también se produce por fragmentos de la pared arterial.

Los vermes son arrastrados hacia las arterias más finas y distales, el flujo sanguíneo se deteriora, o incluso se interrumpe hacia los lóbulos caudales y, en consecuencia, éstos muestran consolidación, infarto y un mínimo funcionamiento al nivel de intercambio gaseoso (McCall *et al.*, 2008a).

Los fragmentos del parásito son calcificados y parcialmente incorporados a la pared de la arteria, creando microfocos de supuración que cicatrizan con formación de gran cantidad de tejido conectivo fibroso (Atkins, 2005).

El tromboembolismo pulmonar se asocia a una enfermedad parenquimatosa severa del pulmón, con exacerbación de la respuesta en la superficie arterial, proliferación vellosa exuberante e inflamación granulomatosa de la pared de las arterias en las cercanías de los vermes muertos (Rawlings y Calvert, 1997; Song *et al.*, 2002).

1.6.8 Coagulación intravascular diseminada (CID)

Por la trombosis y la lisis de los coágulos se produce un déficit local de los factores de coagulación y en consecuencia pueden aparecer hemorragias multifocales. También puede generarse la ruptura de los vasos inflamados y hemorragias, especialmente cuando hay episodios de insuficiencia respiratoria aguda. La hemoptisis y epistaxis puede evidenciarse por la eliminación de sangre y vermes desde los vasos rotos (Gómez *et al.*, 1999).

1.6.9 Neumotórax

Puede ocurrir de manera espontánea en los perros, generado por la rotura de vesículas subpleurales, infecciones bacteriana secundaria a la trombosis y ruptura de abscesos en vías de desarrollo (Valentine *et al.*, 1996).

1.6.10 Lesión renal

En la dirofilariosis crónica es frecuente la glomerulonefritis membranosa. Esta patología es generada por la formación y depósito de inmunocomplejos frente a parasitos adultos y microfilarias (IgG e IgM y el complemento) en la membrana basal del glomérulo (Abramowsky *et al.*, 1981).

Además, la presencia de microfilarias en los capilares glomerulares y vasos medulares provoca la presencia de infiltrados inflamatorios en glomérulos y un engrosamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares (Miller, 1999; Paes de Almeida *et al.*, 2003).

Sumado a esto, *Wolbachia* es liberada desde las microfilarias muertas, produciendo inflamación y una respuesta inmune específica (Morchón *et al.*, 2012a). Como consecuencia de la glomerulonefritis, puede desarrollarse

una nefrosis grave con proteinuria y, en algunos casos, puede llegar a provocar azotemia por insuficiencia renal con hipoalbuminemia (Kittleson y Kienle, 2000).

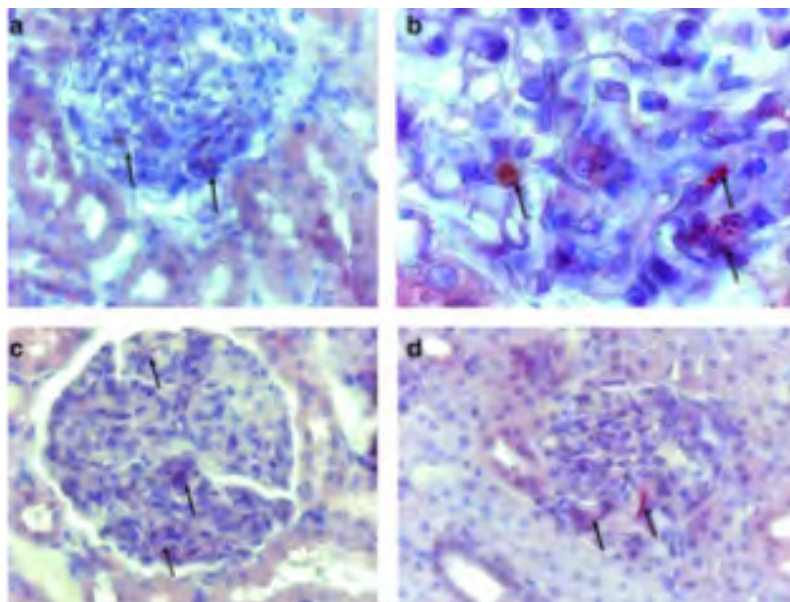


Figura 14: (a-d) Proteína de superficie de *Wolbachia* obtenida mediante técnicas de inmunohistoquímica de tejido renal de los perros infectados naturalmente con *D. immitis* con microfilarias circulantes. Las flechas indican tinción positiva a proteína de superficie de *Wolbachia* (WSP) en los capilares glomerulares. (Aumentos A: 40x; B:100x, C: 20x, D, 40x). Imagen extraída de Morchon *et al.*, 2012a

La nefritis intersticial con infiltrado de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos en el intersticio medular y cortical, es otra importante alteración inmunopatológica (Gómez *et al.*, 1999).

1.6.11 Lesión hepática

Las lesiones hepáticas en perros con dirofilariosis suele ser una congestión pasiva leve, que no afecta a la funcionalidad. El hígado está más afectado cuando hay una insuficiencia cardiaca congestiva, existe una congestión venosa crónica y la retención de sangre provoca hepatomegalia y disfunción de los hepatocitos, apreciable en el perfil bioquímico enzimático. Muchas veces los perros presentan cirrosis y ascitis hepática (Gómez *et al.*, 1999).

1.6.12 Otras alteraciones orgánicas

Ocasionalmente, algunos individuos presentan migraciones aberrantes del parásitos quedando atrapados en lugares ectópicos. Por ejemplo, las alteraciones oculares descritas con más frecuencia son edema de córnea y ceguera secundarias a glaucoma por presencia de vermes inmaduros.

Con menos frecuencia se describe hiperemia de las conjuntivas, fotofobia, inflamación iridociliar y panoftalmia. También se han descrito nódulos subcutáneos de localización diversa, nódulos pulmonares solitarios similares a los de la dirofilariosis humana, en arterias sistémica y

mucocele en las glándulas salivales, en el cerebro, la cavidad peritoneal, el corazón izquierdo, quistes y abscesos musculares y subcutáneos, los bronquios y el hígado (Liu *et al.*, 1966; Patton y Garner, 1970; Mandelker y Brutus, 1971; Slonka *et al.*, 1977; Weiner *et al.*, 1980; Henry, 1992; Gómez *et al.*, 1999).

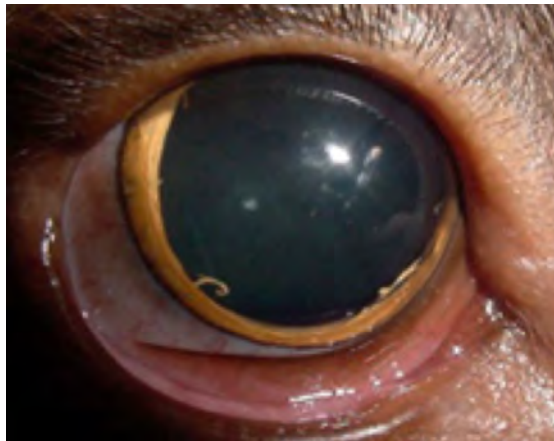


Figura 15: Larva de localización aberrante en cámara anterior del ojo de un perro.

1.7. SIGNOS CLÍNICOS

Desde que los parásitos son inoculados por el mosquito hasta pasados seis a siete meses, los perros no presentan ningún signo clínico; por lo tanto, la forma de presentación clínica de la enfermedad suele ser crónica, debido a que las larvas no causan daños significativos durante las etapas de muda y migración. Por otro lado, los signos clínicos

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

dependerán de la carga parasitaria, la reactividad individual y ejercicio, ya que el daño arterial es más severo en los perros con actividad física intensa que en los perros en reposo (Dillon, 1995). A pesar de lo expuesto, existe un bajo porcentaje de casos de primo-infecciones masivas o de animales muy jóvenes donde se presentan cuadros agudos de curso rápido y mortal.

A pesar de la denominación "enfermedad del gusano del corazón", que sugiere la participación principalmente cardíaca, los gusanos se encuentran fundamentalmente en las arterias pulmonares y el daño inicial se produce en el pulmón. Por lo tanto, se debe considerar una enfermedad pulmonar que involucra las cámaras cardíacas derechas sólo en los últimos estadios de la enfermedad y en las infecciones con cargas parasitarias serias (McCall, 2008a). Los signos de la enfermedad se desarrollan gradualmente y pueden comenzar con una tos crónica.

Cuando están presentes, los signos clínicos mas frecuentes son:

1. Tos no productiva y crónica: generada de la reacción inflamatoria provocada por los vermes. Se acentúa después del ejercicio y es el síntoma más habitual en perros

levemente afectados o con enfermedad cardiopulmonar crónica (Rawlings y Calvert, 1997).

2. Disnea o taquipnea: relacionada con la congestión venosa pulmonar o con la hipertensión pulmonar que genera un desequilibrio ventilación/perfusión con hipoxemia, incrementando el esfuerzo respiratorio.

3. Intolerancia al ejercicio: debido a la insuficiencia cardiaca, se reduce el flujo sanguíneo, provocando hipoxemia muscular y en consecuencia intolerancia al ejercicio.

4. Síncope: El estado de hipotensión generado durante el ejercicio en perros con dirofilariosis puede provocar un síncope. El síncope también se atribuye a una isquemia cerebral (Rawlings y Calvert, 1997; Kittleson y Kienle, 2000).

Durante el examen físico, a la auscultación se pueden notar sonidos pulmonares difusos bilaterales sobre las áreas de los lóbulos caudales; a veces hay crepitación de fina a gruesa asociada con neumonitis eosinofílica por enfermedad oculta (Rawlings y Calvert, 1997). La auscultación cardiaca en la mayoría de los perros es normal.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aunque pueden aparecer soplos en casos avanzados.

Cuando se ha desarrollado una la insuficiencia cardiaca congestiva derecha, se puede auscultar un soplo cardiaco sobre el lado derecho del tórax debido a la insuficiencia de la válvula tricúspide, así como arritmias cardiacas.

En el síndrome de la vena cava se presenta con pulso venoso yugular positivo, hepatomegalia, edema pulmonar, ascitis y efusión pleural, hinchazón de las patas, anorexia, pérdida de peso y deshidratación. La presencia de hemoglobinuria, bilirrubinuria y debilidad debe ser siempre sospecha de síndrome de la vena cava, únicos hallazgos físicos que pueden ser considerados patognomónicos (Kitagawa *et al.*, 1987 ; Atwel y Buoro, 1988; Venco, 1993).

En el estadio crónico de la enfermedad, a veces puede ocurrir sintomatología aguda. Tras la muerte de muchos parásitos, por causas naturales, puede producirse un tromboembolismo pulmonar grave que produzca una sintomatología de aparición aguda, con disnea aguda y severa, hemoptisis, fiebre, taquicardia, hipotensión, debilidad (Atwell y Bouro, 1988; McCall, 2008a).

Cuando existen localizaciones aberrantes, como el sistema arterial sistémico, los síntomas clínicos pueden ser de isquemia, atribuibles a la presencia física de los vermes o a la formación secundaria de una tromboembolia parasitaria. Animales con parásitos en la aorta o en las arterias femorales han presentado alteraciones en las extremidades posteriores como cojera, parestesia, paresia y necrosis tisular (Goggin, *et al.*, 1997; Kittleson y Kienle, 2000).

Se ha establecido una clasificación en cuatro clases o niveles de gravedad, que tiene en cuenta diversos factores, entre ellos los signos clínicos y se detallan a continuación:

CLASE	SIGNOS CLINICOS
I LEVE	Asintomática o con tos.
II MODERADA	Tos, intolerancia al ejercicio, sonidos pulmonares anormales.
III GRAVE	Tos, intolerancia al ejercicio, sonidos pulmonares y cardíacos anormales, hepatomegalia, síncope, ascitis, muerte.
IV SÍNDROME CAVAL	Inicio repentino de letargia y debilidad grave acompañada de hemoglobinuria.

Tabla 8: Clasificación de la enfermedad y signos clínicos presentes en cada una de las fases (Di Sacco y Vezzoni,

1.8. DIAGNÓSTICO

La infección por dirofilariosis cardiopulmonar en perros se puede diagnosticar mediante tests serológicos que detectan microfilarias o antígenos adultos. El correcto diagnóstico permite además, seleccionar el tratamiento más oportuno y minimizar los riesgos asociados al mismo (Knight, 1995; American Heartworm Society, 2015).

Para un diagnóstico apropiado debe incluirse siempre:

- Examen físico.
- Radiografías torácicas, donde se observan cambios radiográficos típicos.
- Las ecografías son útiles para la identificación de filarias, especialmente en casos de síndrome de la vena cava.

(Kittleson y Kienle, 2000; American Heartworm Society 2015).

1.8.1 Examen físico

Es habitual, tras la exploración de los pacientes, encontrar alteraciones del aparato cardiorrespiratorio como:

- Tos crónica.
- Disnea de esfuerzo o intolerancia al ejercicio.
- Estertores.
- Hemoptisis.
- Alteraciones cardiovasculares como soplos cardíacos (Polizopoulou *et al.*, 2000).

1.8.2. Detección de antígenos

Los test serológicos diseñados para detectar antígenos de parásitos adultos, basados en técnicas de ELISA o inmunocromatografía, son altamente específicos y no se produce reactividad cruzada con otros parásitos (Venco, 2007).

Estas pruebas más antiguas permitían la detección de

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



Figura 16 y 17: Pacientes infectados por *D. immitis* con dificultad respiratoria y decaimiento.

antígenos producidos sólo por gusanos adultos hembras, sin embargo, los nuevos test detectan antígenos de cuerpo, y, por lo tanto, machos. Los test pueden proporcionar cierta información sobre la carga de gusanos (Knight, 1995; Venco *et al.*, 2003).

La sensibilidad es muy elevada, pero los resultados falsos negativos pueden ocurrir en periodos prepatentes (infecciones por debajo de 6 meses de duración), cargas parasitarias muy ligeras o cuando están presentes sólo gusanos machos (McCall, 1992).



Figura 18: Tests de filaria con resultado positivo.

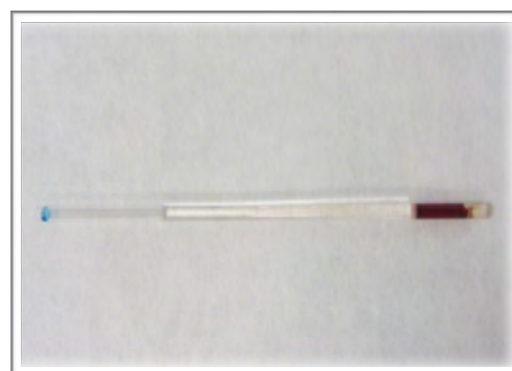
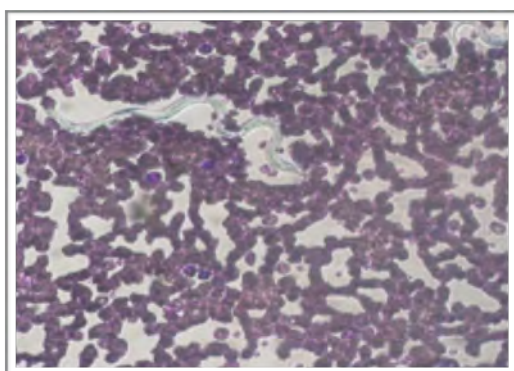


Figura 19 y 20: Test de gota gruesa y de microhematocrito para la detección de microfilarias.

1.8.2.1 Detección de microfilaria en sangre

En las zonas donde la prevalencia de la enfermedad es alta (> 20 %), muchos perros infectados pueden no ser microfilarémicos, pudiendo esta cifra ser aún mayor en aquellos perros con un programa de prevención con lactosas macrocíclicas.

Teniendo esto en cuenta, la mayoría de los perros microfilarémicos pueden ser detectados mediante el sencillo examen de observación directa de una gota de sangre fresca al microscopio en un portaobjetos o mediante la concentración de un volumen de sangre en tubo de microhematocrito (prueba de Woo) (Martini *et al.*, 1996; Coutney y Zeng, 2001; American Heartworm Society, 2015).

Con el primer método, se observan las microfilarias moviéndose activamente entre los hematíes o, con el segundo método, se podrán observar por encima de la capa leucocitaria, en el tubo microhematocrito. Su movimiento es ondulante y no progresivo (Georgi y Georgi, 1994; Bowman y Lynn, 1999).

Estos métodos de prueba son poco sensibles cuando el número de microfilarias es bajo (50-100 / ml); en el número

de microfilarias observadas no guarda relación con la cantidad de parásitos adultos ni con la gravedad de la enfermedad (American Heartworm Society, 2015).

Para obtener resultados más precisos, las técnicas de concentración y de filtración son útiles para determinar la presencia de microfilarias.

A. En el método de filtración se mezcla 1 ml. de sangre (en EDTA o Heparina) con 9 ml de carbonato sódico (0,1 %). Posteriormente, se pasa a través de un filtro de membranas de policarbonato de 3 a 5 μm . de diámetro llamados “filtros Millipore”; las microfilarias que quedan sobre el filtro se tiñen con azul de metileno al 0.1 % (Georgi y Georgi, 1994).

B. La técnica de Knott (1939) modificada:

Es el método de elección para observar la morfología y la medición de las dimensiones del cuerpo permitiendo diferenciar *D. immitis* de especies de filáridas no patógenas, tales como *Acanthocheilonema* (anteriormente *Dipetalonema*) *reconditum*.

Se realiza de la siguiente manera según Boch y Supperer (1982) y Georgi y Georgi (1994): se mezcla 1 ml de sangre

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

conservada en EDTA o heparina, con 9 ml de solución lisante (formalina al 2% o carbonato sódico al 0,1%) para hemolizar la muestra. Se centrifuga 5 minutos a 1100 r.p.m. El sedimento se tiñe con azul de metileno a partes iguales y se observa una gota al microscopio. Si se desea hacer un recuento se debe multiplicar el número de microfilarias observadas en la muestra por 50 y el resultado dará el número de microfilarias por ml de sangre (Soulsby, 1987; Georgi y Georgi, 1994; Gómez et al., 1999).

1.8.2.2 Diferenciación de las microfilarias

Diferenciar las microfilarias de distintos parásitos es crucial, ya que pueden existir infecciones mixtas y el hecho de detectar la presencia de *D. immitis* implica la posible administración de arsenicales, fármacos adulticidas altamente agresivos para el organismo hospedador. El método más sencillo para determinar si las microfilarias son *D. immitis*, consiste en realizar un test de detección de antígenos; si la prueba es positiva, al menos algunas de las filarias son *D. immitis*, en caso contrario, también es posible que haya *D. immitis* ya que sólo son necesarios un macho y una hembra para producir microfilarias y dos parásitos pueden quedar por debajo del umbral de detección de una prueba de antígenos (Kittleson y Kienle, 2000).

En general, si se observan más de 5 o 10 microfilarias por gota de sangre, lo más probable es que se trate de *D. immitis*; un número menor también puede ser de otros parásitos filarioideos (Bowman y Lynn, 1999).

1.8.2.3 Identificación morfométricas

Es una técnica poco fiable. Solo *D. reconditum* y *D. immitis* pueden ser diferenciadas con cierta facilidad por sus características morfométricas y características del movimiento, sin embargo, *D. repens* y *D. dracunculoides* son más difíciles de distinguir (Bowman y Lynn, 1999).

Las diferencias entre microfilarias de *D. immitis* y *D. reconditum* son las relacionadas en la Tabla 9 (pág. 67).

1.8.2.4 Método histoquímico

Permite identificar a la especie a la que pertenece la microfilaria mediante el estudio de la distribución somática de las zonas de actividad de fosfatasa ácida. La positividad se observa de color rojizo en diferentes zonas de la microfilaria según sea la especie a la que pertenece. Es la forma más correcta de identificación específica (Chalifoux y Hunt, 1971; Peribáñez et al., 2001).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

	<i>D. immitis</i>	<i>D. reconditum</i>
CUERPO	El cuerpo es estirado.	Es curvado en forma de media luna.
EXTREMO ANTERIOR	Se adelgaza gradualmente hasta la punta rodeada, recordando a un cono coronado por una semiesfera.	Extremo anterior romo, con gancho cefálico.
EXTREMO POSTERIOR	Recto.	Curvado como gancho.
MOVIMIENTOS	Rápido, brusco y en un mismo sitio.	Uniformes, lentos y ondulantes.
MÉTODO DE FILTRACIÓN	135 a 185 μm de longitud. 6 a 7 μm de diámetro (similar a los eritrocitos circundantes).	215 a 240 μm de longitud, < 5 a 6 μm de diámetro.
MÉTODO DE KNOTT	290 μm de longitud, mismo diámetro que en el método de filtración.	< 275 μm de longitud, mismo diámetro que en el método de filtración.

Tabla 9 : Diferencias morfométricas de *D. immitis* y *D. reconditum* (Bowman y Lynn, 1999)

ESPECIE	CARACTERÍSTICAS
<i>D. immitis</i>	Dos puntos de actividad, en el poro anal y poro excretor.
<i>D. repens</i>	Actividad en el poro anal.
<i>Acanthocheilonema Reconditum</i>	Actividad en toda la microfilaria.
<i>A. dracunculoides</i>	Actividad en poro anal, poro excretor y cuerpo medio.

Tabla 10 : Actividad de la fosfatasa ácida en los diferentes parásitos mencionados.

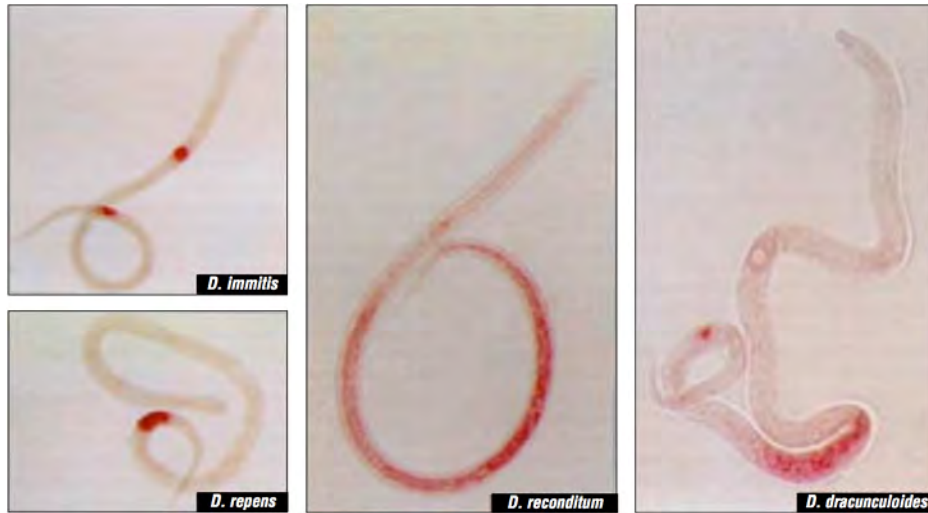


Figura 21: Patrones de tinción con fosfatasa ácida de microfilarias desvainada (fotomicrografías) Extraído de Schrey & Trautvetter (1998).

1.8.3 Radiografías torácicas

Las radiografías torácicas son útiles para evaluar la gravedad de las lesiones pulmonares pero no para la evaluación de la carga parasitaria (Venco *et al.*, 2003). Proporcionan información valiosa sobre la localización y gravedad de las alteraciones vasculares y del parénquima pulmonar (Losonsky *et al.*, 1983; Venco *et al.*, 2003). Si hay remodelación cardíaca se observa aumento de las cámaras cardíacas derechas y, en presencia de insuficiencia cardíaca congestiva, se puede observar derrame pleural y edema (Rawlings, 1986; Calvert y Rawlings, 1988).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los cambios de las arterias pulmonares que se observan son dilatación, mayor tortuosidad y terminación de las mismas de forma brusca, por tromboembolismos que interrumpen el flujo de los segmentos pulmonares (Losonsky *et al.*, 1983).

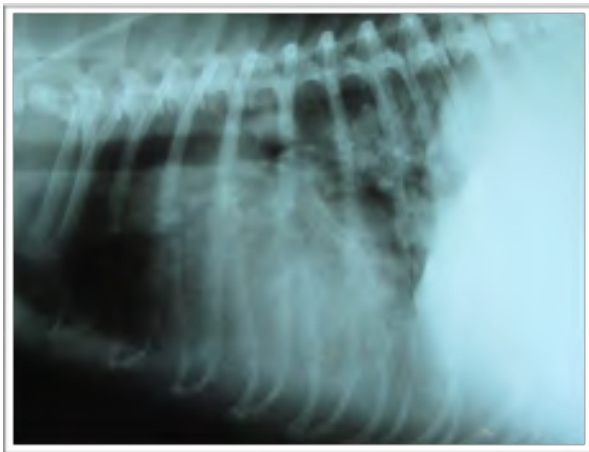


Figura 22 y 23: Radiografías de perro con dirofilariosis, proyecciones latero-lateral derecha y dorso ventral. En ellas se aprecia cardiomegalia y dilatación de las arterias pulmonares, también patrón alveolar e intersticial.

Los cambios del parénquima pulmonar son difusos tras la llegada temprana de las L5. En casos leves o moderados de alteración parenquimatosa, se pueden observar zonas de densidad aumentada adyacentes a las arterias afectadas; además, hay intensificación de la radiodensidad intersticial pulmonar que se extiende a partir del hilio y oscurece los detalles vasculares. Con infección severa crónica, el

aumento de densidad puede generalizarse y afectar cualquier punto del campo pulmonar, revelando lesiones de tipo granulomatosas y fibróticas. El parénquima suele mostrar una mayor opacidad alveolar a medida que aumenta la cantidad de tromboembolismos (Rawlings y Calvert, 1997; Miller, 1999).

La dilatación cardíaca derecha es un cambio secundario que sólo hay que evaluar una vez que se ha examinado la vasculatura pulmonar. Por lo general, se aprecia mejor en las proyecciones ventrodorsales, observándose una silueta cardíaca en forma de D mayúscula invertida. No es característica en casos leves y es posible que no exista o no sea evidente en casos de gravedad moderada (Gómez et al., 1999; Kittleson y Kienle, 2000).

Cuando se ha desarrollado una insuficiencia cardíaca derecha, puede haber líquido pleural libre, distensión de la vena cava caudal, hepatomegalia, ascitis, edema alveolar y periférico, muchas veces asociado a hidrotórax (Georgi y Georgi, 1994; Góme et al., 1999). Puede presentarse neumotórax atribuible a fístulas broncopleurales, provocando atelectasia y rotación de la silueta cardíaca, haciendo difícil la detección de los signos radiológicos (Gómez et al., 1999).

1.8.4 Ecocardiografía

La ecocardiografía puede proporcionar evidencia definitiva de infección del parásito, así como permitir la evaluación de las consecuencias anatómicas y funcionales cardíacas de la enfermedad (Nelson *et al.*, 2005).

Este método diagnóstico permite una visualización directa de las cámaras cardíacas, vasos comunicantes y de los parásitos en las cámaras cardíacas derechas, la vena cava caudal, la arteria pulmonar principal y del tracto proximal de ambas ramas pulmonares caudales.

La pared del parásito se observa como una estructura altamente ecogénica y se visualiza como dos líneas paralelas con una zona hipocogénica entre ellas, asemejándose a un signo “=” . Estas líneas no son de más de 0,5 a 1 cm. de longitud, debido al ángulo de curvatura natural que toma el parásito. Para visualizar los parásitos en la arteria pulmonar o en las ramas proximales, es necesario que exista un número significativo de ellos (Rawlings y Calvert, 1997; Miller, 1999; Dillon, 2000)

El ultrasonido cardíaco puede ayudar en la clasificación de la enfermedad y la estimación de la carga parasitaria, los

cuales afectan al protocolo de tratamiento y al pronóstico (Genchi *et al.*, 2007a).

Sin embargo, no es un método adecuado para diagnosticar la enfermedad en perros con infección ligera , ya que los gusanos a menudo se alojan en las ramas periféricas de las arterias pulmonares, más allá del campo de vista ecográfico y los parásitos que se encuentran en arterias lobares no son visibles porque el ultrasonido no atraviesa el pulmón (Venco *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2005).

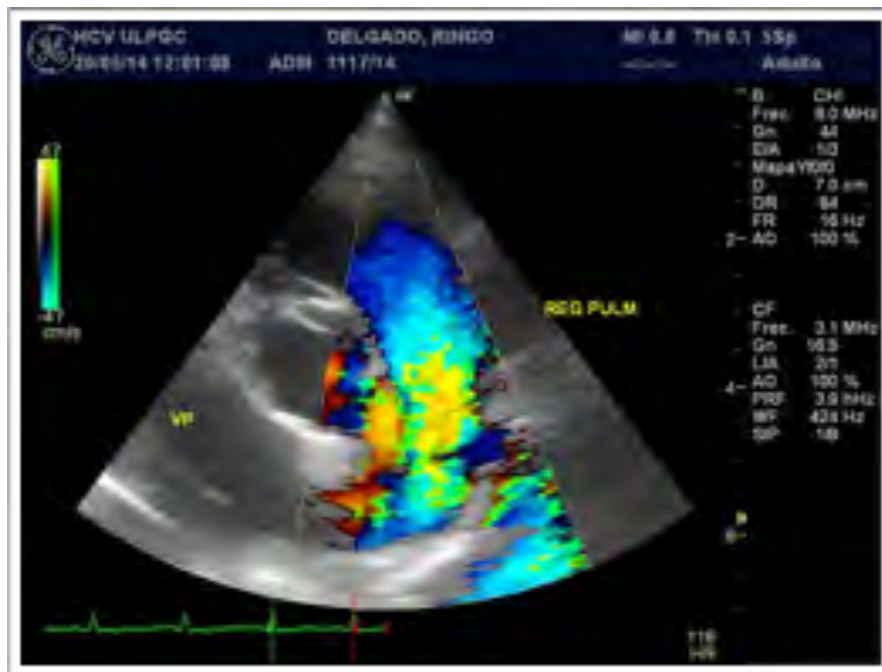


Figura 24: Doppler Color en corte transversal de la base cardíaca a nivel transaórtico. Se observa imagen compatible con regurgitación a nivel de la válvula pulmonar.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

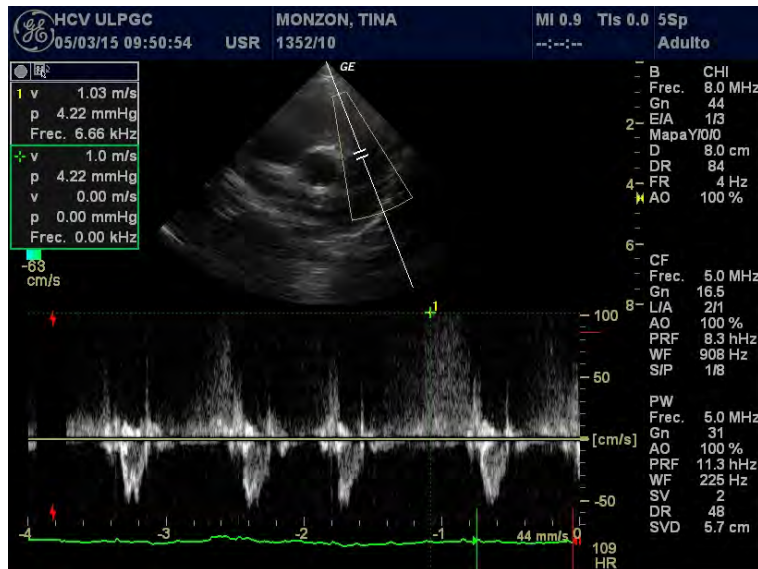


Figura 25: Imagen Doppler Espectral en onda pulsada, en el corte transversal de la base del corazón a nivel transaortico. Se observan imágenes compatibles con filarias adultas en forma de dos líneas paralelas (=) hiperecoicas; dilatación del tronco pulmonar y alteración del perfil de flujo asistólico de la arteria pulmonar.

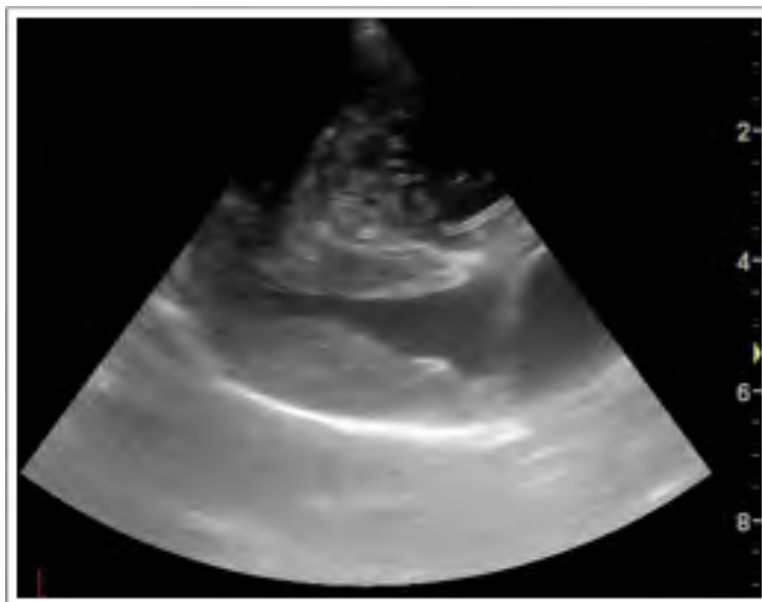


Figura 26: Ventana paraesternal derecha, en corte longitudinal de cuatro cámaras. Se observa a nivel del ventrículo derecho imagen compatible con filarias adultas (=).

Cuando los parásitos son numerosos, son más propensos a estar presente en la arteria pulmonar principal, rama proximal interlobar derecha e izquierda, o ventrículo derecho del corazón donde se pueden visualizar fácilmente. En perros con hemoglobinuria, la visualización de los gusanos en el orificio de la válvula tricúspide proporciona la confirmación concluyente de la presencia de síndrome de la vena cava (Nelson *et al.*, 2005).

Para diagnosticar una dirofilariosis, se debe obtener un corte ecocardiográfico en la proyección basal paraesternal derecha de eje transversal, que incluya el tracto de salida del ventrículo derecho, la válvula pulmonar, la arteria pulmonar principal y las porciones proximales de las arterias de los lóbulos caudales. La porción de estas ramas que tiene el tamaño suficiente como para albergar un parásito adulto es de sólo 3 cm. de longitud (Dillon, 2000; Kittleson y Kienle, 2000).

La ecocardiografía Doppler permite dimensionar un aumento en la velocidad del flujo sanguíneo entre atrio y ventrículo derecho, identifica la regurgitación a través de las válvulas tricúspide o pulmonar e, indirectamente, permite evaluar la presión sistólica pulmonar, el grado de hipertensión sistólica en el ventrículo derecho o diastólica

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

en la arteria pulmonar. La hipertensión pulmonar se demuestra por la velocidad de regurgitación sanguínea de la tricúspide (Borgarelli *et al.*, 1997; Kittleson y Kienle, 2000).

Así mismo, el índice de distensibilidad de la arteria pulmonar derecha (RPAD) permite evaluar la presencia y gravedad de la hipertensión pulmonar en perros infectados por *D. immitis*. Las evaluaciones de este índice son un método valioso para la detección temprana de la hipertensión pulmonar, incluso en ausencia de flujos de regurgitación durante la evaluación doppler (Venco *et al.*, 2014).

1.8.5 Electrocardiografía

La electrocardiografía muestra la actividad eléctrica del corazón. Actividades anormales (eje eléctrico desviado a la derecha, fibrilación auricular, bloqueos de rama derecha) se encuentran generalmente sólo en el último estadio de la enfermedad, cuando las cámaras cardíacas derechas están gravemente dañadas (Mcall, 2008a).

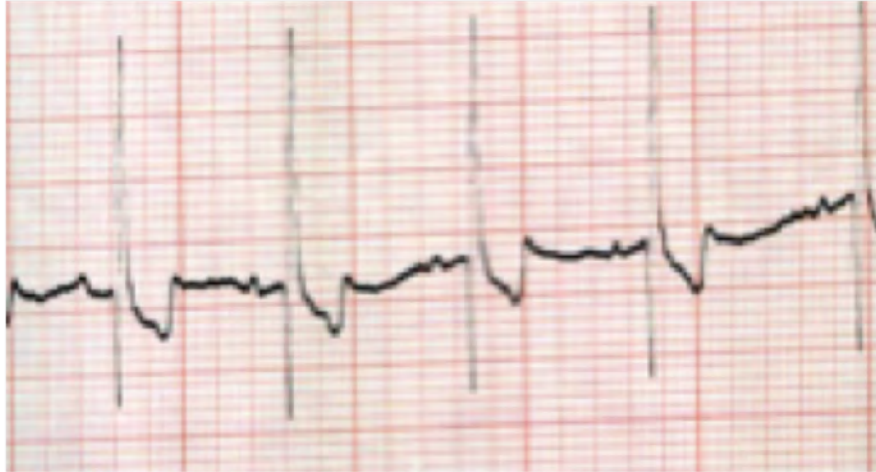


Figura 28: Imagen de electrocardiograma con ondas "Q profundas". (Derivación II. 25 mm/sec; 10 mm/mV).

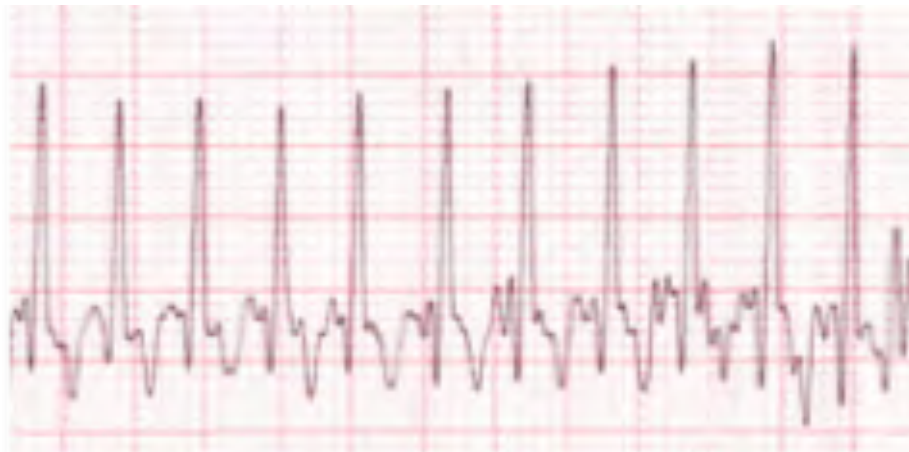


Figura 27: Electrocardiograma que muestra fibrilación atrial. (Derivación II. 25 mm/sec; 10 mm/mV).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



Figura 29: Electrocardiograma que muestra un bloqueo de rama derecha. (Derivación II. 25 mm/sec; 10 mm/mV).

1.9. TRATAMIENTO

Dado que la infección por dirofilariosis cardiopulmonar canina causa enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, proliferación del endotelio vascular, pérdida de la elasticidad arterial, inflamación perivascular e hipertensión pulmonar (Knight, 2004), y que por otro lado la muerte de los parásitos adultos, ya sea debido a desgaste natural o a la terapia adulticida, produce tromboembolismos pulmonares, provocando un empeoramiento del cuadro (Rawlings y Calvert, 1995), es importante que, antes de instaurar un plan terapéutico, se realice la evaluación del estado clínico y cardiovascular del paciente.

Para ello se debe tener en cuenta:

- Historia clínica.
- Examen físico.
- Radiografía torácica y ecocardiografía.
- Test de antígenos (Bowman y Atkins, 2009).

Este último, aunque es un método poco refinado para determinar la carga parasitaria, también puede tenerse en cuenta para evaluar el número de parásitos presentes en base a la reacción antigénica (Atwell *et al.*, 1986; Rawlings *et al.*, 1993; Bowman y Atkins, 2009).

Se debe considerar que en los casos crónicos puede observarse signos de enfermedad vascular muy avanzada en perros con una baja carga parasitaria y, por otro lado, animales muy inactivos pueden presentarse asintomáticos y con mínimos cambios radiográficos teniendo una elevada carga parasitaria (Mcall, 2008a).

En función de la gravedad de la enfermedad, la dirofilariosis se ha clasificado en cuatro clases o niveles de gravedad

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

	Tratamiento
Día 0	<p>Perro diagnosticado y verificado como positivo de dirofilariosis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prueba de antígenos positiva (Ag) verificada con prueba de microfilarias (MF) • De no detectarse microfilarias, confirmar con una 2ª prueba de Ag de un fabricante distinto. <p>Iniciar la restricción del ejercicio.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cuanto más pronunciados sean los síntomas, más estricta deberá ser la restricción del ejercicio. <p>Si el perro es sintomático:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estabilizar con la terapia apropiada y cuidados de enfermería • Prescripción de prednisona a 0,5 mg/kg BID 1a semana, 0,5 mg/kg SID 2ª semana, 0,5 mg/kg EOD 3ª y 4ª semanas
Día 1	<p>Administrar fármaco preventivo con la dirofilariosis.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si se detectan microfilarias, pretratar con antihistamínico y glucocorticoesteroide, si no esta recibiendo ya prednisona, para reducir el riesgo de anafilaxis • Observar posibles signos de reacción durante al menos 8 horas
Día 1-28	Administrar doxiciclina 10 mg/kg BID durante 4 semanas • Reduce la patología asociada con las dirofilarias muertas • Interrumpe la transmisión de dirofilarias
Día 30	Administrar fármaco preventivo con la dirofilariosis.
Día 60	<p>Administrar fármaco preventivo con la dirofilariosis.</p> <p>Primera inyección de melarsomina 2,5 mg/kg intramuscular (IM)</p> <p>Prescribir prednisona a 0,5 mg/kg BID 1ª semana, 0,5 mg/kg SID 2ª semana, 0,5 mg/kg EOD 3ª y 4ª semanas</p> <p>Disminuir aún más el nivel de actividad</p> <ul style="list-style-type: none"> • Restricción de jaula/correa cuando se use el jardín
Día 90	Administrar fármaco preventivo con la dirofilariosis. Segunda inyección de melarsomina 2,5 mg/kg IM
Día 91	<p>Tercera inyección de melarsomina 2,5 mg/kg IM</p> <p>Prescribir prednisona a 0,5 mg/kg BID 1a semana, 0,5 mg/kg SID 2ª semana, 0,5 mg/kg EOD 3ª y 4ª semanas</p> <p>Seguir restringiendo el ejercicio entre las 6 y 8 semanas posteriores a las últimas inyecciones de melarsomina.</p>
Día 120	<p>Prueba en busca de presencia de microfilarias.</p> <ul style="list-style-type: none"> • De resultar positiva, tratar con un microfilaricida y repetir la prueba 4 semanas después. Establecer una prevención de la dirofilariosis durante todo el año.
Día 271	Prueba de antígenos 6 meses después de su conclusión; chequear en busca de microfilarias.

Tabla 11: Tratamiento de dirofilariosis en perros según las recomendaciones de la American Heartworm Society (2015).

(Di Sacco y Vezzoni, 1992). Sin embargo, actualmente se prefiere una clasificación más simple, que clasifica los pacientes en dos categorías, en función del riesgo de presentar complicaciones tromboembólicas durante el tratamiento adulticida (Mcall, 2008a). Esta clasificación se basa principalmente en el número de filarias estimado, el tamaño y edad del perro, la severidad de la enfermedad pulmonar y presencia de enfermedades concomitantes, así como la actividad física y la posibilidad de restricción del ejercicio durante el tratamiento adulticida. En la tabla 12 se detalla la clasificación (pág. 81).

Una vez realizada la evaluación del paciente, el plan terapéutico es el siguiente:

1.9.1 Eliminación de larvas migratorias y microfilarias

Previamente al tratamiento adulticida, se deben eliminar las larvas migratorias L3 y L4, ya que el fármaco adulticida (melarsomina diclorhidrato), no puede eliminar filarias menores de 4 meses de edad. La administración de lactonas macrocíclicas a dosis preventivas durante 2 ó 3 meses previos al tratamiento adulticida es lo indicado. De esta manera, las larvas menores de 2 meses de edad son eliminadas mientras que las larvas mayores de 2 meses

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

BAJO RIESGO DE COMPLICACIONES TROMBOEMBÓLICAS	RIESGO ELEVADO DE COMPLICACIONES TROMBOEMBÓLICAS
Animales con baja carga parasitaria y sin lesiones de la vasculatura o parénquima pulmonar.	Se incluyen los perros que cumplan una o más de las siguientes condiciones que se mencionan.
Asintomático.	Síntomas relacionados con la enfermedad (tos, intolerancia al ejercicio, etc.).
Radiografías torácicas normales.	Radiografía torácicas muestran anomalías compatibles con dirofilariosis.
Bajo nivel de antígenos circulantes.	Elevado nivel de antígenos circulantes.
No se visualizan los parásitos en ecocardiografía.	Los parásitos se visualizan en la ecocardiografía.
Sin enfermedades concomitantes.	Enfermedades concomitantes.
Posibilidad de restricción de ejercicio durante el tratamiento.	No existe posibilidad de restricción del ejercicio durante el tratamiento.

Tabla 12: Clasificación según el riesgo de desarrollar complicaciones tromboembolicas durante el tratamiento adulticida se detalla en la siguiente (McCall *et al.*, 2008a).

alcanzarán la edad suficiente para ser susceptibles a la melarsomina (American Heartworm Society, 2015). Además, se debilita a las filarias inmaduras y reduce la masa corporal de las hembras adultas al disminuir su capacidad. También las microfilarias (L1) son eliminadas gradualmente mediante la administración de dosis preventivas mensuales (Atkins, 2011).

La administración de lactonas macrocíclicas a dosis microfilaricidas puede producir efectos sistémicos entre las 4-8 horas tras la administración del fármaco, debido a la muerte repentina de grandes cantidades de microfilarias en perros con elevada microfilaremia (generalmente, dosis superiores a las administradas de forma preventiva). También se han descrito reacciones adversas en perros con baja microfilaremia, por esta razón, se recomienda la eliminación gradual, desde el momento en que se diagnóstica la enfermedad (American Heartworm Society, 2015).

1.9.2. Eliminación de *Wolbachia*

Además de eliminar la bacteria *Wolbachia*, el tratamiento antibiótico con doxiciclina de perros infectados con *D. immitis* puede inhibir la embriogénesis del parásito, el desarrollo larvario, la producción de microfilarias, y a largo plazo la supervivencia de los adultos (Bandi *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 2003; Bazzocchi *et al.*, 2008; Grandi *et al.*, 2010). *Wolbachia* juega un papel importante en la relación huésped-parásito ya que está involucrada en la interacción con el sistema inmune del huésped infectado (Bazzocchi *et al.*, 2003, 2007; Morchón *et al.*, 2007, 2010).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Por lo tanto, la eliminación de la bacteria *Wolbachia* debe incluirse en el tratamiento de la enfermedad. Los perros previamente tratados con doxiciclina tendrán menor patología pulmonar asociada a la muerte de las filarias cuando se administre el tratamiento adulticida (Bazzocchi et al., 2008).

Se administra doxiciclina a dosis de 10mg/kg BID durante 4 semanas antes de la administración del fármaco adulticida, eliminando así el 90% de la bacteria *Wolbachia*, permaneciendo en niveles bajos durante los 3 ó 4 meses posteriores a la administración del antibiótico (Bandi et al., 1999).

Existen publicaciones que han estudiado los efectos de la doxiciclina como adulticida. Cuando la doxiciclina se combinó con ivermectina, la eficacia adulticida fue de aproximadamente 75 a 80% vs. 8% cuando los perros se trataron únicamente con doxiciclina solo. Los autores concluyeron que los efectos adulticidas de la doxiciclina no son significativos después de diversos ciclos de dantibiotico, (de 8 a 10 meses post infección, según diferentes autores). A pesar de estos resultados, el tratamiento fue eficaz para reducir significativamente las poblaciones de *Wolbachia* y también observaron una

notable reducción de la patología pulmonar tras la muerte de los gusanos adultos en comparaciones de perros que no fueron pretratados con doxiciclina (Bazzocchi *et al.* 2008; Grandi *et al.* 2010).

1.9.3. Eliminación de los parásitos adultos

El único fármaco adulticida en perros con dirofilariosis cardiopulmonar, es melarsomina dihidrocloruro (Immiticide®, Merial) (Atwell y Searle, 1989; Dzimianski, *et al.*, 1989). Se administra mediante inyección intramuscular profunda en los músculos lumbares epiaxiales (entre L3 y L5).

Existen dos protocolos para la administración, que dependen del estadio de la enfermedad en la que se encuentre el animal.

Protocolo Clásico: dos inyecciones de 2,5 mg / kg de peso corporal con 24 horas de diferencia. Este elimina sólo alrededor de 90% de los gusanos adultos. Por lo tanto, la clasificación de la enfermedad y el uso del protocolo de dos dosis no garantiza adecuadamente el éxito del tratamiento (Keister *et al.*, 1992; Vezzoni *et al.*, 1992; American Heartworm Society, 2015). Este protocolo podría

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ser administrado en perros que no muestran evidencia clínica ni radiográfica de dirofilariosis, por ser pacientes con baja carga parasitaria.

Protocolo Diferido: consiste en la administra tres dosis, una inyección de 2,5 mg / kg de peso corporal seguida de al menos un mes más tarde por dos inyecciones de la misma dosis con 24 horas de diferencia entre si. Elimina al 98% de los parasitos adultos.

Es el protocolo recomendado, por ser el más seguro y eficaz. Elimina los adultos de forma escalonada, el 50% de los adultos en la primera inyección, (90% machos y 10% hembras) y el resto con la segunda y tercera inyección. (Atkins y Miller, 2003; American Heartworm Society, 2015).

Además, tiene la ventaja adicional de que las complicaciones son menos severas y frecuentes, brindando una mayor seguridad ya que esta eliminación progresiva y escalonada reduce el tromboembolismo producido por la muerte de los parásitos, permitiendo al organismo del animal eliminar los fragmentos embólicos de forma más efectiva, lo que resulta en complicaciones pulmonares menos severas y frecuentes (Miller et al., 1995; American Heartworm Society, 2015)

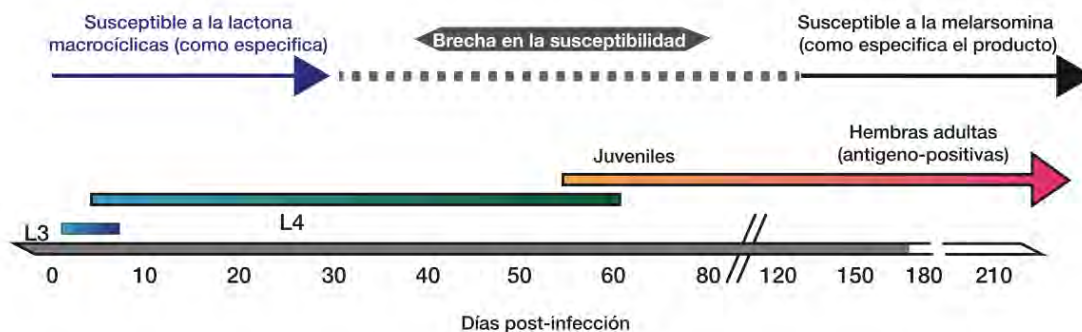


Figura 30: Línea de tiempo del desarrollo de *D. immitis*, mostrando los periodos de susceptibilidad a las lactonas macrocíclicas y la melarsomina. La línea de puntos representa la "brecha en el tratamiento" cuando *D. immitis* no se considera susceptible a ninguno de los dos tratamientos. De Merial Limited, Duluth, GA. ©2008 (American Heartworm Society, 2015).

1.9.4 Efectos adversos a melarsomina

Los efectos adversos observados son:

- A. De tipo comportamiento: con anorexia, letargia, postración, temblores, inestabilidad/ataxia, agitación.
- B. De tipo respiratorio con tos,, jadeo, disnea, estertores y síncope.
- C. Otros efectos adversos descritos son hipersalivación, fiebre, vómitos y diarrea (Dillon, 2000;

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Kittleson y Kienle, 2000; Ware, 2000). Por otro lado, en un tercio de los pacientes, en el lugar de la inyección, se produce edema, enrojecimiento, miositis y dolor al movimiento; en ocasiones se forman abscesos estériles. Este fenómeno puede ser minimizado al asegurar que la inyección se deposita en el vientre de la musculatura epiaxial con una aguja estéril recién cambiada después de que el fármaco se introduzca en la jeringa y que ésta sea de longitud y calibre apropiado para el tamaño y condición corporal del perro.

1.9.5 Confirmación de la eficacia del tratamiento adulticida

Es posible una mejoría en el estado clínico sin eliminar por completo los parásitos adultos. Para confirmar la eficacia del tratamiento, se debe realizar un test de antígenos a los 6 meses tras la última dosis de melarsomina, aunque este test no garantiza que el perro sea negativo a dirofilariosis ya que puede haber presentes larvas o filarias juveniles que no presentan suficiente carga antigénica para dar positivo. Esto debe tenerse especialmente en cuenta si no se administró un tratamiento con lactonas macrocíclicas 2 ó 3 meses previos al tratamiento adulticida (American Heartworm Society, 2015).



Figura 31: Immiticide, presentación comercial.

1.9.6 Otras consideraciones importantes

A. Restricción de ejercicio

El tromboembolismo pulmonar es una consecuencia inevitable de una terapia adulticida exitosa. Por lo tanto, desde que se diagnostica la enfermedad, y sobre todo, durante el periodo que dure el tratamiento adulticida, es indispensable la restricción del ejercicio del animal para minimizar estas complicaciones derivadas de la muerte de los parásitos. La restricción del ejercicio (no pasear, no correr; el perro debe permanecer en el interior o, en casos concretos, reposo en jaula) parece ser la medida más importante para minimizar el daño pulmonar y para reducir

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

la hipertensión pulmonar (Di Sacco y Vezzoni, 1992; Vezzoni et al., 1992; Dillon et al., 1995; Rawlings y McCall, 1996; McCall et al., 2008a).

B. Tratamiento del tromboembolismo pulmonar

Para controlar la inflamación pulmonar y el posible desarrollo de tromboembolismo pulmonar, se puede administrar dosis antiinflamatorias de glucocorticoides (prednisona 1 mg / kg/ 24 hs. por 7 días), se debe ir disminuyendo la dosis de forma gradual y semanalmente. Se debe administrar sólo si se considera necesario, debido a los efectos adversos que puede presentar, como reducción del flujo pulmonar, empeoramiento de la endoarteritis y efectos pro-coagulantes (Knight, 1995).

1.9.7 Extracción quirúrgica de los parásitos

Se aconseja la extracción quirúrgica en perros con altas cargas parasitarias o con síndrome de la vena cava.

Se puede llevar a cabo bajo anestesia general con pinzas flexible de cocodrilo introducidas a través de la vena yugular. La pinza flexible de cocodrilo guiado mediante fluoroscopia puede acceder no sólo a las cámaras cardíacas

derechas, sino también a las arterias pulmonares (Ishihara *et al.*, 1990).

La mortalidad intraoperativa con esta técnica es muy baja. En general, la supervivencia y la tasa de recuperación de los perros con alto riesgo de tromboembolismo pulmonar se mejora significativamente tras la eliminación física de tantos gusanos como sea posible (American Heartworm Society, 2015).

Antes de elegir este método de tratamiento, se debe visualizar mediante ecocardiográfica las arterias pulmonares para determinar si existe un número suficiente de gusanos en lugares accesibles. La extirpación quirúrgica de parásitos puede evitar la formación de tromboembolismo pulmonares (Morini *et al.*, 1998).

Este procedimiento, sin embargo, requiere una formación e instrumentación especializada, incluyendo diagnóstico por imagen por fluoroscopia. Sin embargo, sigue siendo una buena alternativa segura para el manejo de pacientes de alto riesgo y la mejor opción en los perros que albergan una carga parasitaria muy elevada (Venco, 2007).

1.10. PREVENCIÓN

Debido a que todos los perros que viven en zonas endémicas de dirofilariosis están en riesgo, la quimioprofilaxis es una prioridad. La administración apropiada de agentes quimioprofilácticos, previene la infección por *D. immitis* e impiden la expansión de la parasitosis in situ (Knight, 1994).

Además, la evidencia sugiere que al reducir la población de reservorios aumentando el número de perros que reciben quimioprofilaxis, puede producirse una importante disminución de la prevalencia de la infección entre los perros sin protección. Esta protección "colateral" extiende la cobertura de la quimioprofilaxis con mayor eficacia en las comunidades donde la prevalencia del parásito y la densidad de población de perros son a la vez relativamente baja. (American Heartworm Society, 2015). En la tabla 13 (pág. 94) se describe el protocolo a seguir al administrar en función de la edad del paciente.

1.10.1. Lactonas macrocíclicas

Los fármacos empleados en la quimioprofilaxis pertenecen a la clase de las lactonas macrocíclicas. Existen diferentes

vías de administración (oral, tópica o inyectable) y su posología varía según cual se utilice (McTier *et al.*, 1992).

Son fármacos altamente eficaces y seguros (McCall *et al.*, 1996; Genchi *et al.*, 2007b). Existen actualmente en el mercado:

- Ivermectina
- Milbemicina oxima
- Moxidectina
- Selamectina

Estos fármacos se caracterizan por interrumpir el desarrollo de las larvas que han sido transmitidas por mosquitos al perro durante los 30-60 días anteriores a su administración, no permitiendo que lleguen a adultos.

Las lactonas macrocíclicas, presentan un efecto parcialmente adulticida frente a parásitos de 3-8 meses post-infección, cuando se administran mensualmente de forma continuada, denominado "reachback". En tratamientos superiores a un año se ha reportado una

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

eficacia del 95%, para el caso se la ivermectina, y de un 41,5 a 49,3 % para el caso de la milbemicina-oxima, en la prevención del desarrollo de las larvas L4 de *D. immitis* (McCall *et al.*, 1992; Rawlings, 2002; McCall *et al.*, 2008b).

Las lactosas macrocíclicas poseen un ratio terapéutico/tóxico excelente, donde las dosis quimioprolácticas estándar de todas las lactonas macrocíclicas han demostrado ser seguras en todas las razas (American Heartworm Society, 2015).

Todos los productos quimioprolácticos que sean lactonas macrocíclicas administrados por vía oral y tópica están registrados con un intervalo de dosificación de 30 días. Cuentan con una actividad antihelmíntica contra las microfilarias y larvas L3; más allá de este intervalo, la eficacia contra las larvas L4 disminuye y no se puede garantizar. Los gusanos juveniles, que pueden encontrarse ya a los 52 días posteriores a la infección, son incluso menos susceptibles a la quimioprolaxis. A medida que los gusanos se hacen adultos, se requiere un tiempo de administración continuada de las lactonas macrocíclicas para alcanzar cierto efecto adulticida sobre las L5 y filarias adultas, el anteriormente mencionado efecto "reachback". Se recomienda, por lo tanto, la administran mensual de

forma continua (McCall, 2005; American Heartworm Society 2015).

Es importante recordar que, en casos de omisión o retraso del tratamiento mensual, pasados dos meses, su eficacia contra las formas larvarias desciende, por lo tanto, no debe ser modificado el intervalo mensual recomendado para el tratamiento. (McCall, 2001; Rawlings, 2002; McCall, 2005).

PAUTAS DE INICIO Y PRESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO PREVENTIVO SEGÚN EDAD DEL PACIENTE	
CACHORROS < 7 MESES	<ul style="list-style-type: none">• Iniciar profilaxis cuanto antes, nunca mas tarde de las 8 semanas de edad.• Mayores de 8 semanas de edad, que vivan al aire libre sin protección en zonas hiperendémicas debe realizarse un test serológico de antígenos 6 meses después de iniciar la profilaxis.
PERROS > 7 MESES	<ul style="list-style-type: none">• Si no existe registro de tratamiento y pruebas anteriores, es necesario hacer un test serológico de antígenos al paciente antes de la dispensación o de la prescripción de la profilaxis y, en caso de resultar negativo, repetirlo 6 meses después de iniciar la profilaxis.

Tabla 13: Pautas de inicio del tratamiento profiláctico según la edad del paciente (American Heartworm Society, 2015).

1.10.2. Administración por vía oral

La ivermectina y la milbemicina oxima están disponibles para su administración oral con carácter mensual. Algunas fórmulas tienen sabores y son masticables para mejorar la aceptación del paciente y facilitar su administración. Las unidades de dosis están envasadas para los perros dentro de los rangos de peso prescritos. Para lograr una máxima eficacia, la profilaxis de la dirofilariosis deberá administrarse ininterrumpidamente durante todo el año.

Una formulación de ivermectina / pirantel masticable está disponible y permiten ampliar las indicaciones para incluir el tratamiento y control de determinados parásitos gastrointestinales, como *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma caninum* y *A. braziliense*. Milbemicina oxima a la dosis recomendada para la profilaxis del parásito del corazón es también eficaz contra *T. canis*, *T. leonina*, *A. caninum* y *Trichuris vulpis*. En la actualidad la recomendación más aceptada es tratar durante todo el año (Nelson *et al.*, 2005b).

1.10.3. Administración por vía tópica

La moxidectina y la selamectina están disponibles como

fórmulas líquidas de aplicación tópica. Los parámetros para el tratamiento con productos de uso tópico son los mismos que para la quimioprofilaxis mensual por vía oral. Estos fármacos también son eficaces en la prevención de otros parásitos internos en el perro como son *T. canis*, *T. leonina* y *Otodectes cynotis*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Sarcoptes scabiei* (Clemencia et al., 2000; McTier et al., 2000; Dzimianski et al., 2001; McCall et al., 2001).

1.10.4. Administración parenteral

Una formulación inyectable de moxidectina, capaz de proteger al perro de una infección por *D. immitis* tras una sola administración, proporciona protección continua durante 12 meses. Se trata de una formulación de liberación lenta de microesferas lipídicas impregnadas con moxidectina que se inyecta subcutáneamente. La eliminación de microfilarias es generalmente completa en el plazo de un mes después de la inyección (American Heartworm Society, 2015).

1.10.5. Falta de eficacia y resistencia parasitaria

Las lactonas macrocíclicas como preventivos de la dirofilariosis poseen una eficacia del 100%. Sin embargo,

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

existen informes de falta de eficacia en varias regiones del mundo. Hay muchos motivos posibles, incluyendo:

- No haber administrado el suficiente fármaco preventivo.
- La omisión de administración del fármaco cuando debería haberse hecho.
- El fracaso del perro reteniendo la dosis y fallo de la absorción del principio activo.
- Las variaciones biológicas entre los hospedadores al metabolizar el fármaco y en sus respuestas inmunológicas.
- Las variaciones en la susceptibilidad al fármaco del parásito.

Así pues, el motivo exacto puede ser difícil o imposible de determinar (Atkins, 2011; American Heartworm Society, 2015).

Solamente una cepa de filarias, la MP3 de *D. immitis* ha demostrado poseer resistencia a las lactonas macrocíclicas.

Fue aislada en el año 2006 en un perro de Estados Unidos, que nunca recibió tratamiento preventivo. Desde entonces, esta cepa se mantiene de forma experimental en perros de laboratorio (Atkins, 2011; Blagbur, *et al.*, 2011; Snyder *et al.*, 2011; Bowman, 2012).

Siempre ha existido polimorfismo genético en las poblaciones de filarias y probablemente existan alelos que contribuyan a la creación de resistencias en un gen o múltiples genes, que pueden conducir a un descenso o pérdida de susceptibilidad a las lactonas macrocíclicas. Lo que se desconoce es la frecuencia de estos alelos, el número de genes implicados y si estos alelos son dominantes o recesivos a la hora de expresar el fenotipo resistente (Blagburn *et al.*, 2010; Bourguinat *et al.*, 2010; 2011, 2015).

Es importante que se entienda que los parásitos no se vuelven resistentes, sino que el empleo de los fármacos preventivos selecciona los parásitos con resistencia genética (Bowman, 2012; Bourguinat, 2015).

2. INFLAMACIÓN

2.1. CONCEPTO

La inflamación es una respuesta de los tejidos vascularizados, a las infecciones y a los tejidos dañados; que trae células y moléculas de defensa de la circulación a los sitios donde se necesitan, con el fin de eliminar los agentes ofensivos. Los mediadores de la defensa incluyen células fagocíticas, anticuerpos y proteínas del complemento. La mayoría de éstos circulan en la sangre o residen en los tejidos; pudiendo ser reclutados rápidamente en cualquier sitio en el cuerpo.

La reacción inflamatoria típica se basa en una serie de pasos secuenciales:

1. El agente agresor, que se encuentra en los tejidos extravasculares, es reconocido por las células y moléculas.
2. Los leucocitos y proteínas plásticas son reclutados de la circulación al sitio donde se encuentra el agente agresor.
3. Los leucocitos y proteínas se activan y trabajan juntos

juntos para destruir y eliminar la sustancia nociva.

4. La reacción se controla y se finaliza.
5. El tejido dañado es reparado.

Por lo tanto, la finalidad defensiva de la inflamación constituye una respuesta protectora: sirve para liberar el huésped, tanto de la causa inicial de la lesión como de las consecuencias de la misma (por ejemplo, células y tejidos necróticos) (Gallin *et al.*, 1989, García de Lorenzo y Mateos *et al.*, 2000).

2.2. HITOS EN LA INFLAMACIÓN

Aunque las primeras descripciones de las características clínicas de la inflamación se describieron en un papiro egipcio que data de alrededor de 3000 AC. Celso, escritor romano del primer siglo D.C. enumeró los cuatro signos cardinales de la inflamación (calor, rubor, tumor y dolor). Un quinto signo clínico -pérdida de la función-, fue introducido por Rudolf Virchow en el siglo XIX.

En 1793, el cirujano escocés John Hunter señaló lo que ahora se considera un hecho evidente: la inflamación no es

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

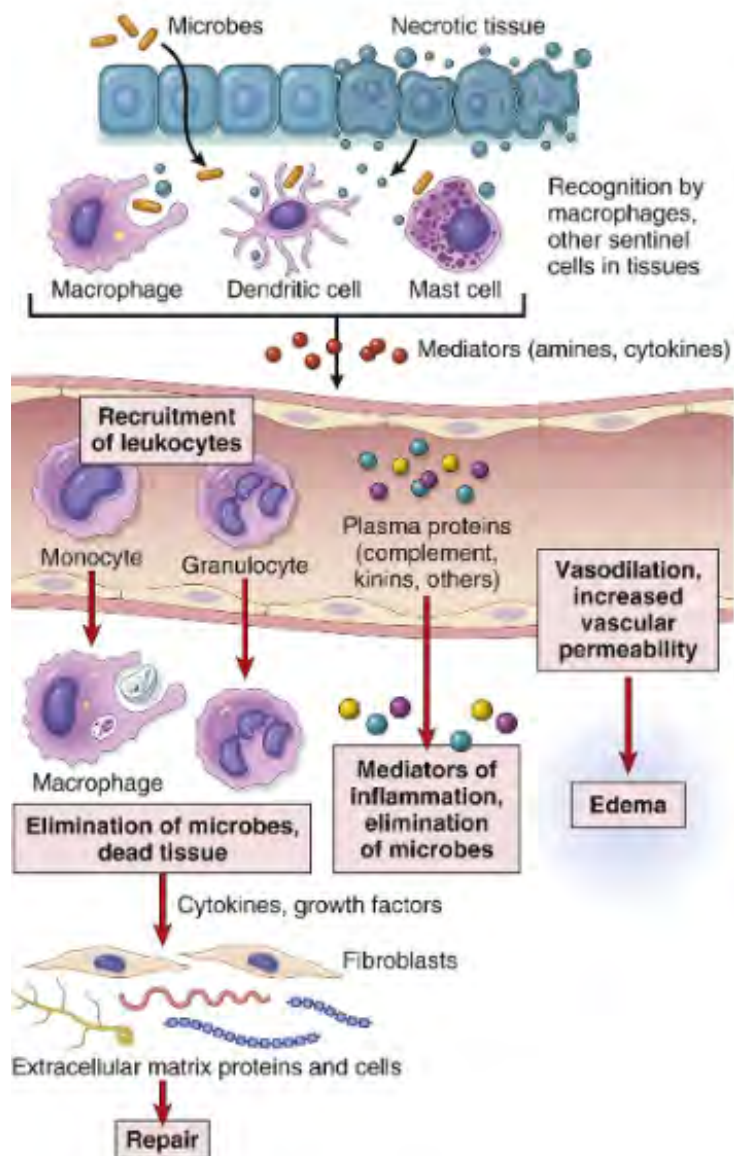


Figura 1: Secuencia de eventos en una reacción inflamatoria. Macrófagos y otras células reconocen microorganismos y daños celulares, liberando mediadores que desencadenan las reacciones vasculares y celulares de la inflamación. Imagen extraída de Kumar *et al.* (2015).

una enfermedad sino una respuesta estereotipada que tiene un efecto saludable en su huésped. En el 1880, el biólogo ruso Elie Metchnikoff descubrió el proceso de fagocitosis mediante la observación de la ingestión de espinas de las rosas por amebocitos de larvas de estrellas de mar y la ingestión de bacterias por los leucocitos de mamíferos. Llegó a la conclusión de que el propósito de inflamación era traer células fagocíticas al área lesionada para engullir bacterias invasoras. Sir Thomas Lewis, estudió la respuesta inflamatoria en la piel, y estableció el concepto de que las sustancias químicas, tales como la histamina (producida localmente en respuesta a la lesión), son las responsables de mediar en los cambios vasculares de la inflamación. Este concepto fundamental subyace en los descubrimientos importantes de mediadores químicos de la inflamación y el uso de fármacos antiinflamatorios en la medicina clínica (Kumar *et. al.*, 2015).

2.2.1. Historia de las Proteínas de fase Aguda

En el año 1930, Tillet y Frances utilizaron por primera vez el término “fase aguda” cuando identificaron una sustancia en el suero de los pacientes con infección aguda por neumonía neumocócica; esto sucedió al formarse un precipitado durante la combinación del polisacárido C y el

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Streptococcus pneumoniae. Este polisacárido C fue, más tarde, denominado proteína C reactiva (CRP).

Posteriormente, se encontró que esta reacción no era única de la neumonía neumocócica, pudiéndose encontrar en otras infecciones agudas. Esta fue la primera evidencia de la respuesta química del cuerpo para estados inflamatorios y condujo a la caracterización de otras sustancias llamadas "proteínas de fase aguda" (Abernethy *et al.*, 1941; MacLeod *et al.*, 1941).

Desde su descubrimiento, las proteínas de fase aguda han sido utilizadas como una herramienta para la detección de la inflamación oculta, como un marcador de actividad de la enfermedad y, por último, como una herramienta de diagnóstico (Pepys, 1981). Recientemente, los métodos más rápidos y precisos de cuantificar la CRP han llevado a un renovado interés por su valor en la medicina clínica.

2.3. TIPOS DE INFLAMACIÓN

La inflamación según su duración, se divide en aguda y crónica.

La inflamación aguda, es una respuesta rápida a las

infecciones y al daño en los tejidos. Normalmente se desarrolla en cuestión de minutos, o de horas, y es de corta duración. Sus principales características son: la exudación de proteínas del líquido y de plasma (edema) y la emigración de leucocitos, predominantemente neutrófilos (también llamados leucocitos polimorfonucleares).

Los cambios que se producen tras la lesión tisular se deben a tres procesos:

1. Cambios en el flujo y calibre vascular, en consecuencia, aumenta el flujo sanguíneo.
2. Cambios estructurales en los vasos sanguíneos, aumentando la permeabilidad vascular e induciendo la formación de exudado inflamatorio.
3. Paso de los leucocitos del espacio vascular al extravascular alcanzando así el foco de las lesiones.

El resultado de todo ello es el acumulo de un fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos.

En los primeros 10-15 minutos se produce una hiperemia por dilatación de arteriolas y vénulas y, apertura de los

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

vasos de pequeño calibre. Tras esta fase aumenta la viscosidad de la sangre, lo que reduce la velocidad del flujo sanguíneo. Al disminuir la presión hidrostática en los capilares, la presión osmótica del plasma aumenta, y en consecuencia un líquido rico en proteínas sale de los vasos sanguíneos originando el exudado inflamatorio.

Cuándo la inflamación aguda alcanza su meta deseada, es decir eliminar el agente causal, la reacción desaparece. Pero si la respuesta no logra despejar el estímulo, la reacción puede progresar a una fase prolongada que se llama "inflamación crónica" (Muller, 2002; Licastro *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2015).

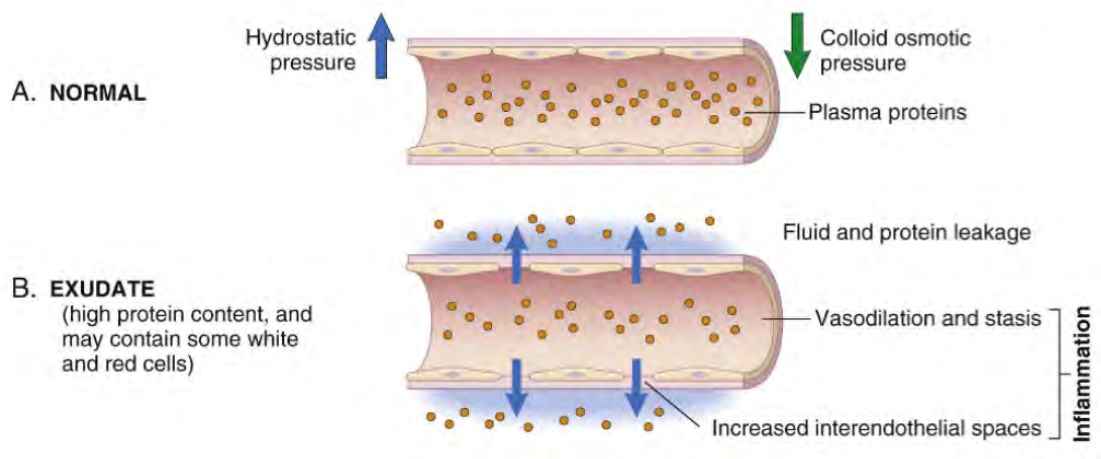


Figura 2: A. La presión hidrostática normal (flecha azul) es de aproximadamente 32 mmHg en el extremo arterial de un lecho capilar y 12 mmHg en el extremo venoso; la presión osmótica coloide media de tejidos es de aproximadamente 25 mmHg (flecha verde), que es igual a la presión capilar media. Por lo tanto, el flujo neto de fluido a través del lecho vascular es casi nula. B. Se forma un exudado en la inflamación, ya que aumenta la permeabilidad vascular como consecuencia del aumento de los espacios inter-endoteliales (Kumar *et al.*, 2015).

La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo.

Tiene dos características importantes:

1. El infiltrado celular está compuesto sobre todo por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.
2. La reacción inflamatoria es más productiva que exudativa, es decir, que la formación de tejido fibroso prevalece sobre el exudado de líquidos.

La inflamación crónica puede producirse por diversas causas:

- a) Progresión de una inflamación aguda.
- b) Episodios recurrentes de inflamación aguda.
- c) Inflamación crónica desde el comienzo, asociada a infecciones intracelulares (tuberculosis, lepra, etc.).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Microscópicamente la inflamación crónica se caracteriza por la presencia de macrófagos y sus derivados (células epitelioides y gigantes), linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos y fibroblastos.

La inflamación aguda es una reacción de defensa conocida como la inmunidad innata, y la inflamación crónica es más prominente en las reacciones de la inmunidad adaptativa (Muller, 2002; Licastro *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2015).

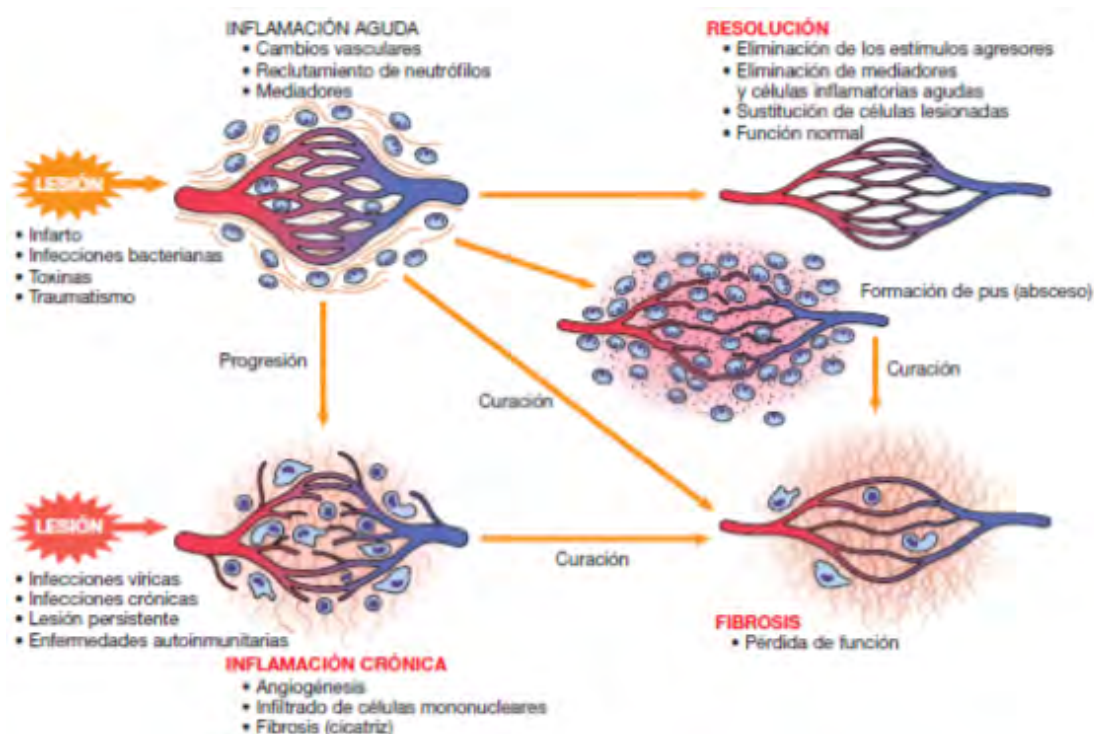


Figura 3: Resultados de la inflamación aguda: resolución, curación por fibrosis o inflamación crónica. Se enumeran los componentes de las diversas reacciones y sus resultados funcionales. Extraído de Kumar *et al.*, (2015).

2.4. RESPUESTA DE FASE AGUDA

2.4.1. Conceptos generales

La respuesta de fase aguda se refiere a una reacción rápida, no específica y compleja, de un grupo de proteínas de la sangre, que se produce poco después de cualquier lesión del tejido que altere la hemostasis. Se considera un proceso dinámico que implica cambios sintéticos y metabólicos que proporcionan un mecanismo de defensa no específica temprana antes de conseguir la inmunidad específica (Saini *et al.*, 1991; Suffredini *et al.*, 1999).

El origen de esta respuesta se atribuye a enfermedades infecciosas, inmunológicas, neoplásicas, traumáticas, u otras causas; y su propósito es el de restaurar la homeostasis para eliminar la causa del disturbio (Whicher y Westacott, 1992; Ebersole *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2004).

Según Whincher y Westacott (1992), las principales funciones de esta respuesta sistémica son:

- Proporcionar energía y substratos para la lucha frente a los patógenos invasores.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Evitar la transferencia de metabolitos necesarios para los patógenos.

- Limitar el daño causado por los patógenos y/o eliminar el tejido dañado o infectado y restaurar el tejido sano.

La respuesta de fase aguda en su fase inicial produce una respuesta local en la zona lesionada que tiene consecuencias inmediatas como:

1. Aumento de la permeabilidad vascular.
2. Activación de leucocitos que liberan mediadores inflamatorios para provocar la llegada de granulocitos y monocitos a la zona lesionada.
3. Agregación plaquetaria para hacer frente al daño vascular ocasionado.
4. Activación de células endoteliales y fibroblastos (Heinrich, 1990).

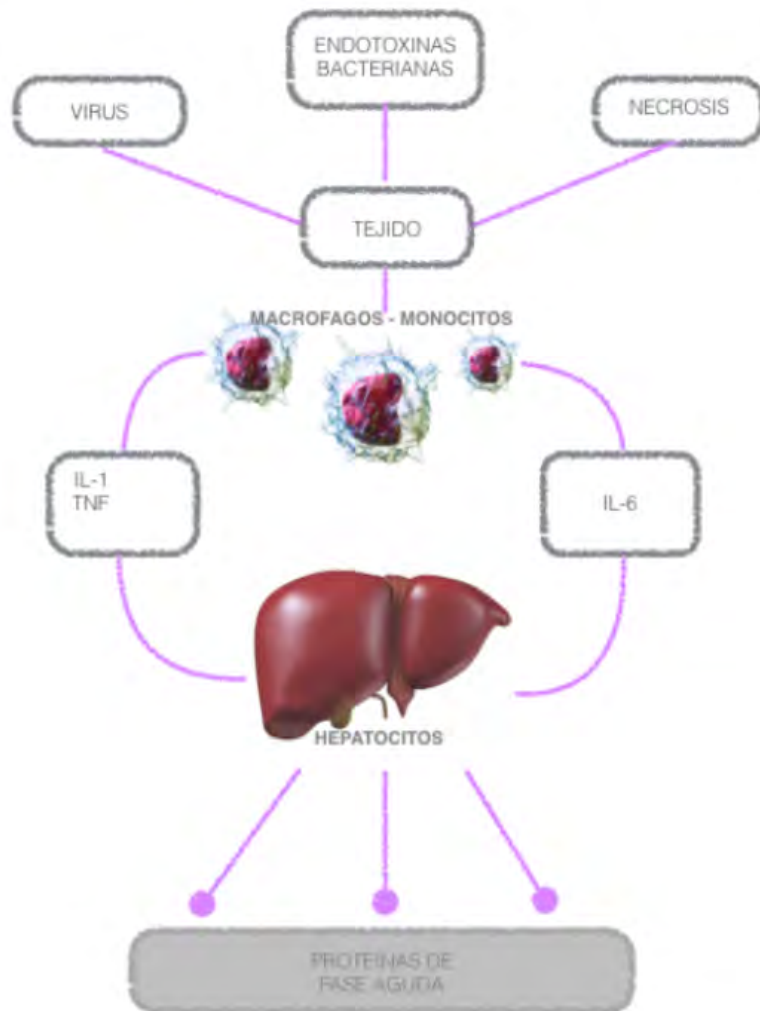


Figura 4: Desencadenamiento de la respuesta de fase aguda, con los diferentes tipos de estimulación hepática.

Posteriormente y, como consecuencia de esta respuesta local, las células activadas provocan la liberación de factores de comunicación celular denominados "citocinas". Las principales citocinas son la IL-1, IL-6 y TNF que actúan en

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

receptores específicos de diferentes células provocando una reacción sistémica (Ebersole *et al.*, 2000) que se puede resumir en:

1. Fiebre
2. Neutrofilia
3. Aumento de las concentraciones de ACTH y cortisol
4. Disminución del hierro y zinc
5. Cambio en el metabolismo lipídico, aumento de la gluconeogénesis e incremento del catabolismo proteico muscular y transferencia de aminoácidos al hígado
6. Activación de la cascada del complemento y de la coagulación
7. Inducción de la síntesis de las denominadas "proteínas de fase aguda"

CITOQUINAS	FUNCIÓN COMÚN
IL-1	Inducción hepática para la respuesta de fase aguda
IL-6	Inducción de la fiebre
TNF- α	Inducción de las células T- B- y NK Inducción de IL-2 y células-T
	FUNCIÓN ESPECÍFICA
IL-1	Activación de los condrocitos, estroma y el epitelio en respuesta a daño tisular localizado. Regulación de B-linfopoyesis en la médula ósea. Mediación de la infiltración tisular de leucocitos (a través de IL-8) Activación de osteoblastos, el hueso y la degradación del cartílago
IL-6	Participa en la inducción y diferenciación de los linfocitos T citotóxicos estimula la diferenciación de células madre hematopoyéticas. Modula la producción de IL-1 y TNF.
TNF- α	Inducción de IL-1 de producción Participa en la destrucción de células mediante la supresión de la síntesis de proteínas con el resultado de la caquexia. Provoca daño endotelial locales

Tabla 1. Las principales funciones biológicas de las citocinas interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6) y el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) (Petersen *et al.*, 2004).

2.4.2. Proteínas de fase aguda

Las proteínas de fase aguda (PFA) son uno de los mayores componentes de la respuesta de fase aguda, donde su concentración sérica cambia dramáticamente. Dada esta característica, las PFA han sido definidas como aquellas proteínas cuyas concentraciones plasmáticas se modifican en al menos un 25% tras un estímulo inflamatorio (Kushner *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 2004; Cerón *et al.*, 2005).

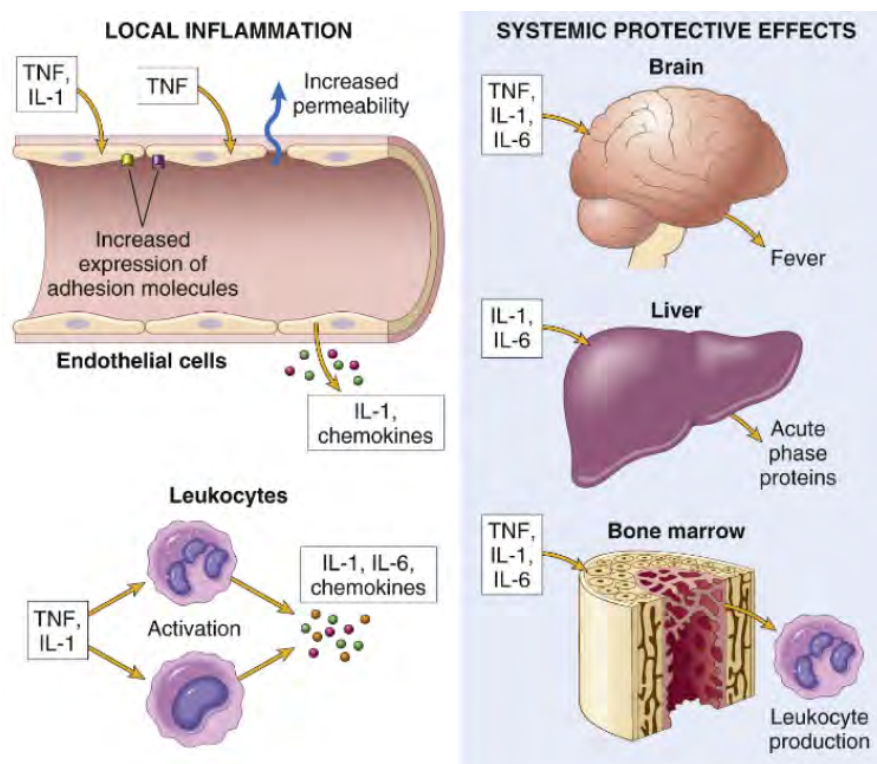


Figura 5: Principales funciones de citoquinas en la inflamación aguda. Fuente: Kumar *et al.*, (2015).

2.4.3. La inducción y la regulación de la respuesta de Fase Aguda.

El hígado juega un papel importante en los mecanismos de defensa del huésped. Las células de Kupffer son responsables de la recolección de residuos bacterianos, la inactivación de los productos bacterianos, y la producción y aclaramiento de mediadores inflamatorios (Dhainaut *et al.*, 2001).

Las PFA son producidas principalmente por hepatocitos en respuesta al estímulo originado por la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias (predominantemente IL-1 β , IL-6 y TNF- α). Los hepatocitos modifican su ruta metabólica hacia la gluconeogénesis, la captación de aminoácidos, y el aumento de la síntesis de factores de la coagulación y factores del complemento, inhibidores de proteasa y PFA (Dhainaut *et al.*, 2001).

Además de la producción hepática, existen evidencias de una producción de proteínas de fase aguda extrahepática en diversos tejidos, lo que apoya aún más el importante papel de las PFA en defensa no específica del huésped. El tejido pulmonar, los enterocitos, la glándula mamaria e incluso células como adipocitos, incrementan la expresión

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de ARNm de PFA tras la estimulación por citocinas (Murata, 1993; Hiss *et al.*, 2004; Jacobsen *et al.*, 2005; Skovgaard *et al.*, 2009).

Diferentes sustancias como los glucocorticoides, especialmente, los factores de crecimiento, y las citocinas anti-inflamatorias, tienen importantes efectos moduladores sobre la producción de PFA (Gabay y Kushner, 1999). El eje hipotalamo hipófisis adrenal (HPA) sintetiza glucocorticoides, que actúan para suprimir las citocinas pro-inflamatorias, al tiempo que regula las citocinas anti-inflamatorias (Bethin *et al.*, 2000). Así, el eje HPA contribuye a la modulación de la síntesis de PFA. Por el contrario, las citocinas modulan la producción de glucocorticoides por el eje HPA. Por ejemplo, IL-6 estimula el eje HPA e induce un aumento de la función suprarrenal, que a su vez suprime la producción de citocinas por retroalimentación negativa (Bethin *et al.*, 2000).

CAUSAS QUE PUEDEN PROVOCAR UNA RESPUESTA DE FASE AGUDA

Inflamación aguda y crónica
Infecciones bacterianas, víricas, parásitos
Endotoxemia
Intervenciones quirúrgicas
Traumatismos
Quemaduras
Procesos Tumorales
Infecciones neonatales
Preñez
Estrés

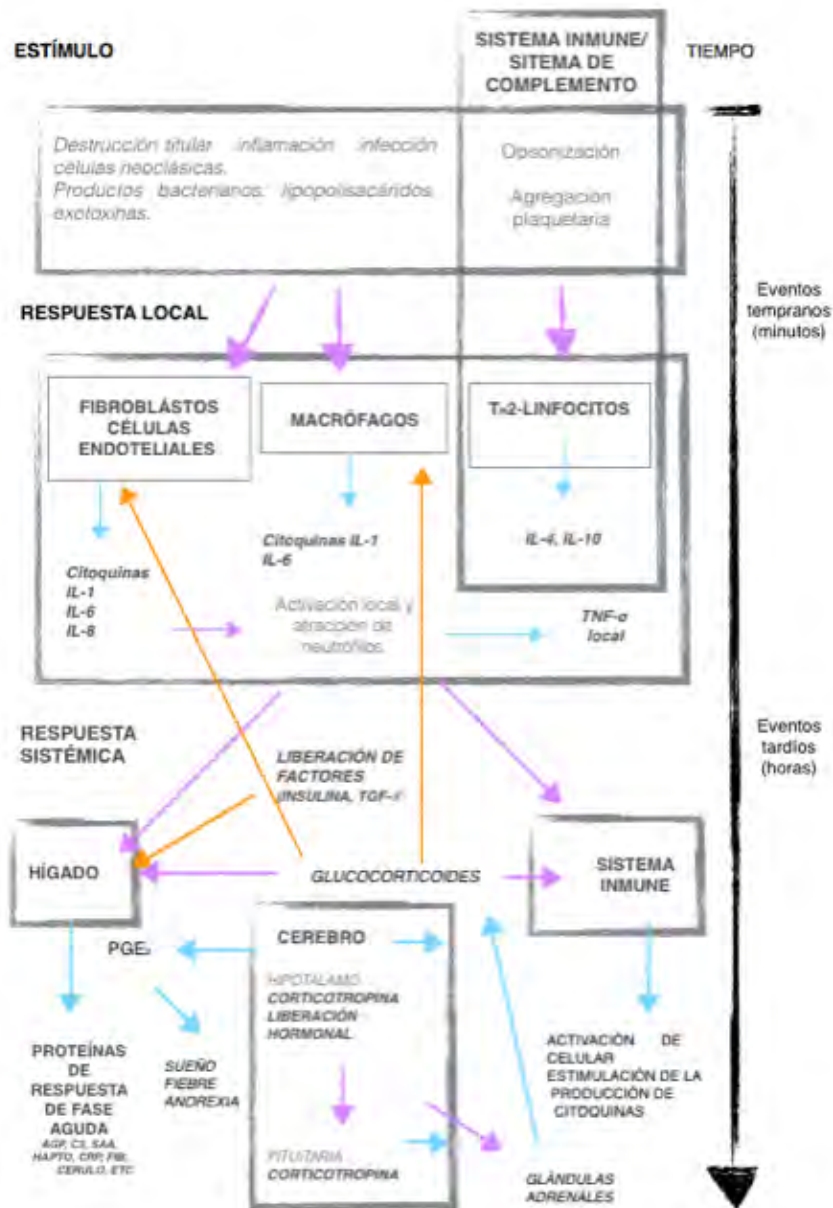
Tabla 2: Condiciones asociadas con el incremento de las PFA (Martínez Subiela *et al.*, 2001).

Figura 6: Las cursivas indican sustancias biológicamente activas (hormonas, citoquinas, etc.);

- Efecto de tipo de células estimulando / órgano determinado.
- Efecto inhibitor del tipo de célula / órgano determinado.
- Denota una sustancia secretada (*cursiva*) o un efecto (*no cursiva*); siendo causado por la sustancia determinada.

Nota: esta leyenda se corresponde con la figura 6 de la página siguiente.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2.4.4. Clasificación de las Proteínas de Fase aguda (PFA):

Algunos autores han sugerido una división de las PFA en, PFA de tipo 1 y tipo 2 (Baumann *et al.*, 1994; Ebersole y Capelli, 2000). Esta clasificación se basa en dónde actúe la principal citocina que induce su síntesis, a través de diferentes receptores situados en la membrana de los hepatocitos. Así se describen:

- PFA tipo 1: sintetizada por el mediador IL-1 (junto a TNF- α), donde encontramos SAA, CRP, Complemento C3 y α 1- glicoproteína ácida.
- PFA tipo 2: inducidas por IL-6 e inhibidas por IL-1. En este grupo se incluyen Hp, fibrinógeno, α 1- antitripsina, α 2- macroglobulina.

Una característica de las PFA de tipo 1 es que su síntesis está sinérgicamente inducida por la IL-6, mientras que las PFA del tipo 2 parecen ejercer una retroalimentación negativa sobre la producción de citoquinas de tipo IL-1 (Schindler *et al.*, 1990; Jordan *et al.*, 1995).

Durante la respuesta de fase aguda, la concentración sérica de la PFA cambia dramáticamente. Sobre la base de esta

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

característica se pueden clasificar, en PFA positivas y PFA negativas, de acuerdo con la magnitud de su crecimiento o su disminución, respectivamente (Petersen *et al.*, 2004).

- Las PFA positivas son aquellas cuyos niveles se ven incrementados. La PFA positivas incluyen haptoglobina, proteína C-reactiva, amiloide sérico A, ceruloplasmina, fibrinógeno y α 1 –glicoproteína ácida-.
- Las PFA negativas presentan un descenso en sus niveles tras el estímulo inflamatorio. Incluyen la transferrina y la albúmina, que es la proteína más abundante del plasma, cuya concentración sérica disminuye 10-30% en todas las especies de mamíferos estudiados (Mackiewicz, 1997).

En función de la magnitud del incremento, las PFA positivas se subdividen en tres grupos (Eckersall 2008):

1. PFA mayores: engloba las proteínas cuyos niveles iniciales en animales sanos son menores a 0.01mg/ml y cuyas concentraciones incrementan más de 100 veces su valor inicial, durante la respuesta de fase aguda.
2. PFA moderadas: son aquellas proteínas plasmáticas

cuyos niveles se ven incrementados en 2 o 3 veces durante el transcurso de la respuesta de fase aguda.

3. PFA menores: se encuentran aquellas proteínas cuyos niveles se ven incrementados únicamente sobre el 50% de su valor inicial.

Esta clasificación es válida para las PFA en todas las especies animales, incluido el ser humano, pero hay que tener en cuenta que existen diferencias interespecíficas como se muestra en la tabla 3 (pág. 124).

La concentración máxima en suero, de PFA, se suele llegar a dar en menos de 24 a 48 h después de la iniciación. El descenso coincide con la recuperación de la infección (Ballou *et al*, 1992) y, en general, las normas de retroalimentación limitarán la respuesta en un periodo de cuatro a siete días, siempre y cuando no se produzca un estímulo mayor.

Algunos ejemplos de cada tipo de PFA se dan en la Figura 7 (pág.122).

2.5. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA COMO BIOMARCADORES EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA

En medicina humana, y cada vez más en veterinaria, la monitorización de las concentraciones plasmáticas de estas proteínas, proporcionan una valiosa información en diversos problemas patológicos que cursan con inflamación, pudiendo ser utilizada no sólo para el diagnóstico, sino también para monitorizar la evolución de la enfermedad y evaluar la respuesta a los tratamientos aplicados.

Son parámetros inespecíficos, indicadores de la presencia de condiciones inflamatorias, pero que no indican su causa (Eckersall y Bell, 2010; Martínez Subiela *et al.*, 2011).

2.5.1. Proteínas de fase aguda en medicina humana

Las indicaciones clínicas de la medición de la concentración de las PFA en el plasma son múltiples.

La CRP es la PFA más utilizada en la especie humana; su concentración se incrementa a las 6-8 h de producirse la inflamación, llegando a su concentración máxima aproximadamente a las 48 h. Los niveles plasmáticos de

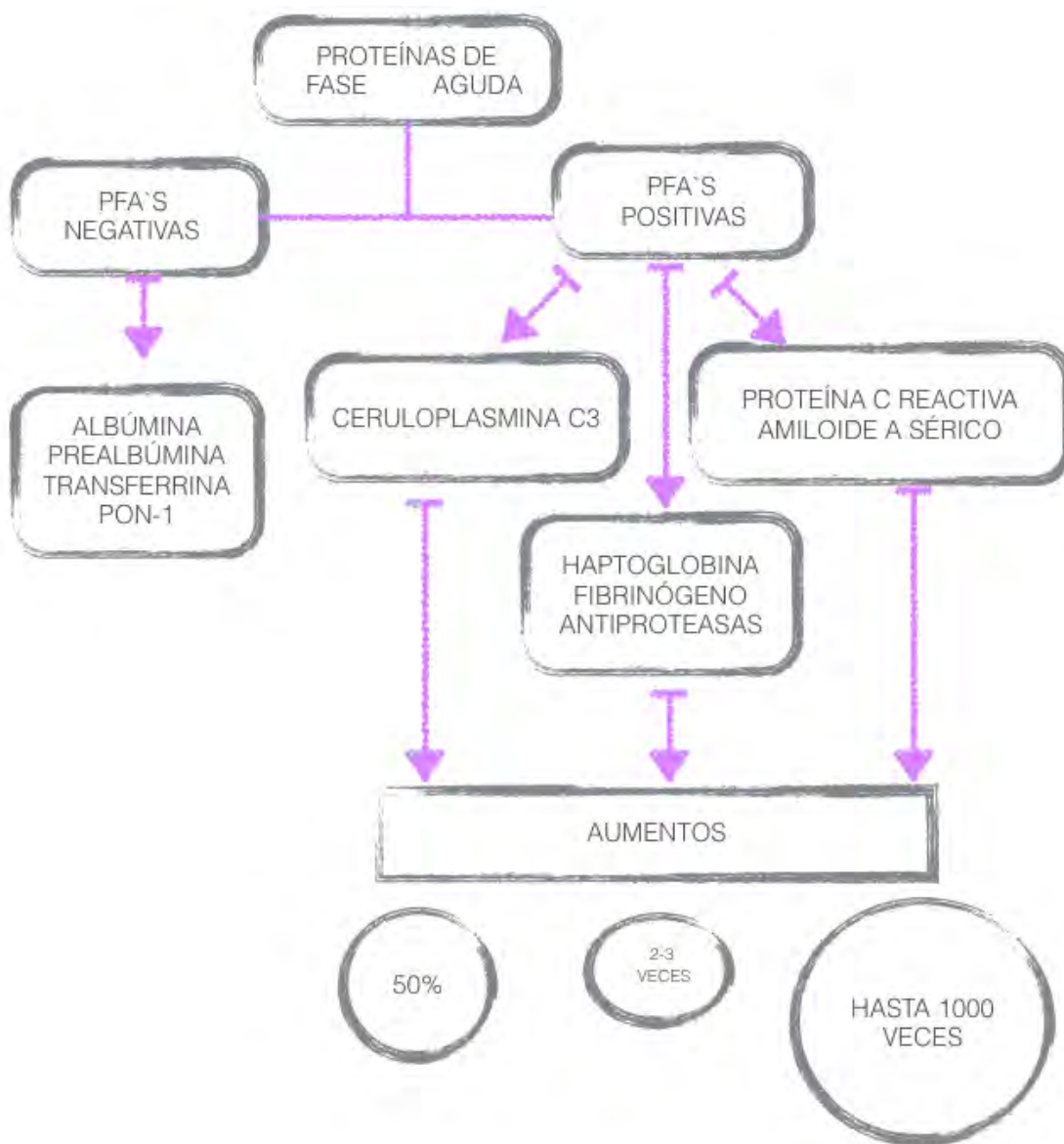


Figura 7: Clasificación de las Proteínas de fase aguda según el tipo y la magnitud de su respuesta.

CRP suelen ser más altos en infecciones bacterianas que en infecciones víricas.

2.5.2. Proteínas de fase aguda en pequeños animales

En perros y gatos se han definido las alteraciones que sufren las PFA en diferentes tipos de patologías; a pesar de que en el gato la respuesta de PFA no se ha estudiado tan extensamente como en el perro. Ambas especies muestran pequeñas diferencias en cuanto al comportamiento de las PFA; en el perro se considera la CRP y la amiloide A sérica (SAA) como las principales PFA mientras que en el gato son la SAA y la alfa1-glicoproteína ácida (GPA) (Cerón *et al.*, 2005).

El recuento de células blancas (WBC) es un test clásico que se utiliza ampliamente en estas especies para el diagnóstico y monitorización de las enfermedades que cursan con inflamación. Existe cierta relación entre el WBC y la concentración plasmática de PFA (Cerón *et al.*, 2005), pero se considera que la determinación de PFA presenta ventajas con respecto al WBC. Por ejemplo, las PFA se incrementan en determinados casos en los que no se observan cambios en el WBC. Las PFA son más estables que los componentes celulares de la sangre y, en teoría, su respuesta es más

PATOLOGÍAS DONDE SE APLICA LAS PRUEBAS DE PCR EN EL SERVICIO DE URGENCIA	REFERENCIA
Apendicitis pre y post operatoria	Mustard <i>et al.</i> ,1987; Gronroos <i>et al.</i> ,1994.
Colecistitis	Juvonen <i>et al.</i> ,1992.
Pancreatitis Aguda	Sternby <i>et al.</i> ,1996.
Enfermedad pélvica inflamatoria	Miettinen <i>et al.</i> , 1993.
Neumonía	Smith <i>et al.</i> , 1995.
Infecciones del tracto urinario	Hellerstein <i>et al.</i> , 1982.
Meningitis	Clark <i>et al.</i> ,1983.
Septicemias en neonatales e infecciones pediátricas	Forest <i>et al.</i> , 1986.
Riesgo de enfermedades coronarias	Johnson, 2006.

Tabla 3: Diferentes patologías en humanos, donde se aplica la prueba de PCR en el servicio de urgencia.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

rápida que los cambios producidos en el WBC (Cerón *et al.*, 2005).

En la especie canina, se ha demostrado el incremento de la concentración sanguínea de PFA en enfermedades gastrointestinales, pancreatitis, síndrome inflamatorio de respuesta sistémica (SIRS), neoplasias, hiperadrenocorticismo y en meningitis-arteritis que responde a corticosteroides. También se describen incrementos de la concentración plasmáticas de CRP en numerosas enfermedades infecciosas como por ejemplo la leishmaniosis, babesiosis, leptospirosis, parvovirus y en la endotoxemia producida por *Escherichia coli* (Eckersall y Bell, 2010).

Especie	PFA PRINCIPALES (aumentos > de 1000)	PFA MODERADAS (aumentos de 2-3 veces)
Hombre	CRP, SAA	AGP, HAPTOGLOBINA
Bovino	HAPTOGLOBINA, SAA	AGP, ANTITRIPSINA
Porcino	CRP, PIG-MAP	HAPTOGLOBINA
Equino	SAA	CRP, FIBRINÓGENO
Perro	CRP	HAPTOGLOBINA

Tabla 4: Principales proteínas de fase aguda (PFA) en las diferentes especies. CRP: Proteína C reactiva. SAA: Amiloide A sérica. AGP: alfa1-glicoproteína ácida. PIG-MAP: Major Acute-phase Protein.

En la especie felina la determinación de GPA es un biomarcador reconocido de peritonitis infecciosa felina. La SAA es la PFA que responde de forma más rápida en esta especie y se ha demostrado su utilidad diagnóstica y de monitoreo en determinadas enfermedades inflamatorias e infecciosas (Eckersall y Bell, 2010).

2.6. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA OBJETO DEL ESTUDIO.

2.6.1. Proteína C Reactiva (CRP)

La CRP fue la primera PFA que se describió. Fue descrita por primera vez en 1930 por Tillet y Frances como componente del suero de pacientes humanos en la fase aguda de la neumonía neumocócica (provocada por *Streptococcus pneumoniae*). El descubrimiento de la PCR se basó en observaciones de la aglutinación del suero humano con ciertos miembros de neumococo spp. mediante la unión a un polisacárido-C, la propiedad que más tarde dio su nombre de "proteína C-reactiva" (Tillet et al., 1930).

En 1950 apareció el primer informe de la aplicación médica

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de CRP en pacientes reumáticos donde se supervisó la actividad reumática de éstos (Anderson y McCarty, 1950). Ya en la década de 1960, se vio que un análogo de la CRP humana era la CRP canina, donde se investigó a pacientes caninos en periodos agudos de diferentes enfermedades, pero no fue hasta 1970 donde se aisló y cuantificó la CRP canina mediante el uso de anticuerpos anti-CRP caninos específicos (Gotschlich 1962; Riley y Coleman, 1970; Riley y Zontine, 1972).

Entre la década de 1980 y 1990, la CRP canina se estudió más a fondo. Debido a las similitudes de la CRP entre los humanos y los perros, estos fueron utilizados como modelos de fase aguda para los humanos (Caspi *et al.*, 1984; Eckersall y Conner, 1988; Yamamoto *et al.*, 1992).

En los últimos años existe un interés acrecentado, ya sea por los beneficios que aportan los estudios en la medicina veterinaria como también a la medicina humana, ya que sirven como modelos importantes para estudiar el papel de la respuesta de fase aguda en diferentes enfermedades humanas, tales como la enfermedad cardiovascular o la aterosclerosis (Burton *et al.*, 1994; Higgins *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 2004).

A. Estructura

La CRP es un miembro de la proteína de la familia pentraxina, que es un grupo filogenéticamente antiguo de proteínas que se encuentran en ambos vertebrados e invertebrados (Robey y Liu, 1981; Baltz *et al.*, 1982). Con un peso molecular de aproximadamente 100 kD, con 5 subunidades idénticas polipeptídicas de 20 kD cada una asociadas por uniones no covalentemente dispuestas en una estructura plana de anillo pentagonal (Pepys *et al.*, Baltz 1983).

Cada subunidad tiene la capacidad para unirse directamente a diferentes tipos de microorganismos activando la vía clásica del complemento, hecho que permite la opsonización de los microorganismos. El complejo resultante de la unión de CRP y patógenos interacciona con los receptores específicos de los fagocitos, induce la producción de citoquinas anti-inflamatorias y modula la función de los neutrófilos (Eckersall, 2008).

Examinadas por microscopía electrónica, la CRP canina tiene semejanza con la CRP humana; la principal diferencia entre las proteínas es que 2 de las 5 subunidades de CRP canina están glicosiladas, lo que podría explicar en parte las

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

dificultades de la utilización de anticuerpos dirigidos contra la CRP humana para medir el CRP canina (Cerón *et al.*, 2005).

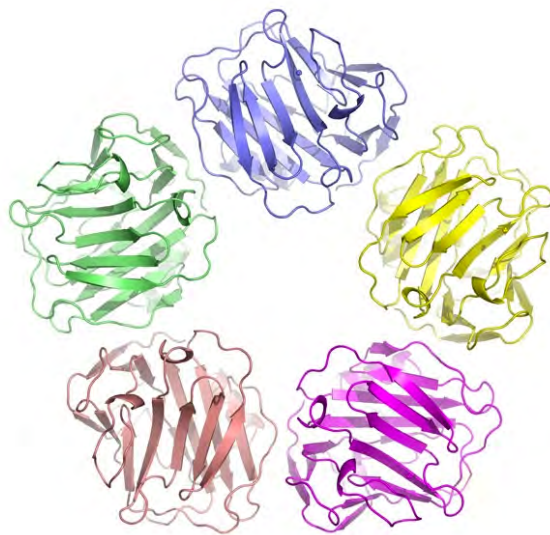


Figura 8: Estructura química de la CRP.

B. Función biológica

Las funciones biológicas descritas en la literatura son, por un lado, promover la limpieza de células apoptóticas (Fiedel *et al.*, 1982; Volanakis *et al.*, 1982; Cheville, 1988); además, induce la agregación-precipitación de las células o partículas a las que se fija (Young y Williams, 1978), también

sostiene la producción de TNF- α . (Ballou *et al.*, 1992; Gershov *et al.*, 2000) y fomenta la expresión de factores tisulares en células mononucleares (Dhainaut *et al.*, 2001). La CRP además, disminuye la acumulación de neutrófilos en los procesos inflamatorios (Zouki, 1997; Petersen *et al.*, 2004).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA CRP
Activación del complemento y la opsonización
Modulación de los monocitos y los macrófagos
Producción de citoquinas
Unión de la cromatina
Previene la migración de neutrófilos a los tejidos.

TABLA 5: Funciones biológicas de la CRP en animales (Petersen *et al.*, 2004)

C. Ensayos para la determinación de la CRP

La determinación de CRP en suero o plasma se realiza generalmente mediante ensayos inmunológicos utilizando anticuerpos específicos de CRP caninos. Varios métodos se han desarrollado y descrito con el propósito de cuantificar CRP en perros (Cerón *et al.*, 2005). En la tabla 6 (pag.133) se citan los principales ensayos.

Existe un kit comercial de ELISA (Rango Fase, Tridelta, Kildare, Irlanda) que es específico para CRP canina, que ha

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

sido validado para su uso en laboratorio clínico, pero se necesitan mejoras en las técnicas ya que el método tiene una alta variación. Por otra parte, el análisis cuantitativo de CRP canino por ELISA consume tiempo y es caro por lo que no es óptima para el uso clínico de rutina (Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2003b; Martínez Subiela *et al.*, 2005).

A pesar de los diversos métodos, no se disponen demasiadas alternativas en el mercado para la determinación de CRP canina mediante métodos cuantitativos.

Por otro lado, está comercialmente disponible un inmunoensayo turbidométrico automatizado de CRP sérica humana que puede ser válido para medir la concentración de CRP canina en suero (K-ensayo, Kamiya Biomedical Company, Seattle, EE.UU) (Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2003a); sin embargo, existen varios informes sobre la reactividad cruzada de CRP canina hacia diferentes anticuerpos anti-CRP humana donde se encontraron con ninguna reactividad cruzada observada, o un grado indeterminado de reactividad cruzada, lo que los hace insuficiente para los propósitos de ensayo cuantitativos. Así, el potencial de la utilización de anticuerpos humanos anti PCR para la determinación de CRP canina sigue siendo una cuestión poco clara (Caspi *et*

al., 1984;. Maudsley y Pepys, 1987; Yamamoto *et al.*, 1993; Parra *et al.*, 2002).

Recientemente, un ensayo rápido de inmunocromatografía en tira, para determinar CRP canina está disponible, brindando resultados rápidos tras la dilución de la muestra. Los resultados falsos positivos son una de las principales limitaciones de esta prueba. (McGrotty *et al.*, 2004; Cerón *et al.*, 2005).

2.6.2. Haptoglobina (Hp)

La haptoglobina (Hp) es una proteína de fase aguda, cuya función principal es neutralizar la hemoglobina (Hb) que se libera en la circulación por hemólisis o destrucción normal de glóbulos rojos (RBC). Se sintetiza principalmente en los hepatocitos en respuesta a la secreción de citoquinas tales como la IL-6, IL-1 y factor de necrosis tumoral (TNF) (Raynes *et al.*, 1991; Petersen *et al.*, 2004).

Se considera un PFA moderada en los perros debido a que su concentración aumenta típicamente de 2 a 3 veces en la respuesta a la inflamación, infección, cirugía o trauma (Eckersall y Conner 1988).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ENSAYO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Inmuno-reacción capilar	Riley y Zontine, 1972
Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA), tipo sándwich y competitivo	Eckersal, et al., 1989; Yamamoto et al., 1992
Test de aglutinación pasiva de látex / capilar cuantitativa	Yamamoto et al., 1994; Tagata et al., 1996
Inmunoensayo láser nefelométrico	Onishi et al., 2000
Inmuno-difusión	Yamamoto et al., 1992
Electroinmuno-ensayo	Caspi et al., 1984
Ensayo de Fluorimetría resuelta en el tiempo (TRFIA) Para los ensayos de CRP en sangre entera canina, saliva y efusiones	Parra et al., 2004
Ensayo inmunturbidimétrico adaptado para analizadores bioquímicos automatizados	Eckersal, et al., 1991
Ensayo ligado a enzimas no inmunes basado a la afinidad del ligando de CRP a fosforilcolina	Deegan et al., 2003

Tabla 6: Principales ensayos para la determinación de CRP.

Esta PFA fue descrita por primera vez por Polonovski y Jayle (1939) mientras que Smithies determinó el polimorfismo en la proteína (Smithies y Walker, 1955).

El nombre de haptoglobina se le otorgo debido a su capacidad de unión con la hemoglobina que se libera en la circulación general tras la destrucción de los eritrocitos. La Hp al unirse a la Hb, evita la excreción renal de hierro y protege los vasos sanguíneos de los efectos oxidativos por esta proteína (Giblett, 1968).

La medición de la concentración de Hp en la circulación, se puede utilizar para determinar si ha habido recientes episodios de hemólisis; se produce un aumento del consumo Hp durante los episodios de hemólisis, conduciendo a niveles plasmáticos de Hp reducidos (Silverman y Christenson, 1994). Debido a que Hp es también una proteína de fase aguda positiva con propiedades inmunomoduladoras que pueden inhibir o estimular la respuesta inmune, la concentración de esta proteína es elevada en los procesos inflamatorios e infecciosos (Braeckman *et al.*, 1999).

A. Estructura

La haptoglobina (Hp) es una α_2 -glicoproteína sérica. Se compone de subunidades alfa y beta y tiene una disposición de tetra cadena (beta-alfa-alfa-beta) conectados por puentes disulfuro en la mayoría de los mamíferos examinados hasta ahora. Los perros tienen sólo 1 subtipo de Hp en comparación con los seres humanos, que tienen 3 subtipos (Hp 1-1, 2-1 Hp, Hp y 2-2). Sin embargo, la Hp canina se asemeja estrechamente con la Hp 1-1 humana, con respecto al contenido de aminoácidos, el peso molecular, el patrón electroforético en gel de almidón, y la existencia de Alfa y Beta subunidades en una disposición de tetra cadena (Mominoki *et al.*, 1995; Cerón *et al.*, 2005).

Es una molécula bivalente $(\alpha\beta)_2$ con un peso molecular de 81 kD. A pesar de la semejanza con la Hp humano 1 -1, la Hp canina tiene 2 diferencias estructurales:

- las 2 cadenas α - β están unidas por una interacción no covalente en lugar de por un puente disulfuro (esta vinculación no covalente también existe en felino Hp),
- y la cadena α tiene un secuencia de oligosacárido de unión y está glicosilada, mientras que el humano es una

cadena no glicosilada (Mominoki *et al.*, 1995).

Estas particularidades estructurales pueden ser responsables de la divergencia de los resultados en el reconocimiento de los caninos y felinos Hp por anticuerpos dirigidos contra Hp humana (Cerón *et al.*, 2005).

Existen estudios que informan que el anticuerpo monoclonal contra Hp humana no reconoce la Hp canina y felina, posiblemente porque este anticuerpo fue dirigido al enlace disulfuro que une las cadenas de Hp que no está presente en los perros y gatos. Sin embargo, otros estudios han demostrado que los métodos de humanos basados en la reacción antígeno-anticuerpo se pueden aplicar a la medición de Hp canina (Weidmeyer *et al.*, 1996; Katnik *et al.*, 1998;).

La glicosilación de Hp se produce durante la reacción de fase aguda en perros (Andersson y Sevelius, 2001), pero la metodología de detección es actualmente demasiado engorrosa para que se utilice para el diagnóstico (Eckersall y Bell 2010).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

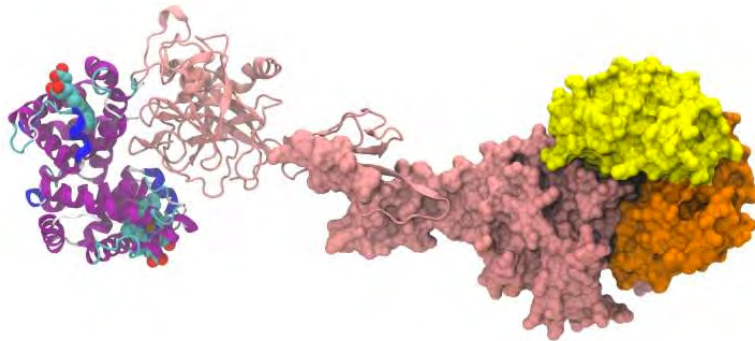


Figura 9: Modelo del complejo hexámero de α,β -hemoglobina/haptoglobina

B. Función biológica

Se han propuesto numerosas funciones para la Hp, pero la principal función, sin lugar a dudas, es evitar la pérdida de hierro por la formación de complejos muy estables con la hemoglobina (Hb) libre en la sangre (Petersen *et al.*, 2004).

La Hb libre en el plasma, es tóxica y pro-inflamatoria, pero gracias a la elevada capacidad de unión de la Hp a la Hb, se previene el daño oxidativo que pueden sufrir los tejidos debido a la actividad peroxidasa que presenta la Hb libre de forma inherente (Wagener *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003).

Además, tiene un efecto bacteriostático, gracias a la capacidad que tiene de unión al grupo hemo, reduciendo la disponibilidad del hierro necesario para el crecimiento de las bacterias (Eckersall, 2008).

La excreción renal de la Hb libre no se ve hasta que la capacidad de unión con la Hp se satura. Se cree que los complejos Hb-Hp se dirigen hacia el hígado, al sistema reticuloendotelial y son metabolizados por las células de Kupffer (Laurell *et al.*, 1957; Putnam, 1975; Cerón *et al.*, 2005).

Sus concentraciones plasmáticas se ven incrementadas en condiciones inflamatorias o infecciosas, ya que en condiciones fisiológicas, los niveles de Hp esta especie no son detectables, viéndose incrementados de forma considerable en presencia de un proceso inflamatorio (Martínez Subiela *et al.*, 2004).

Esta PFA es particularmente sensible a los efectos de los corticoides en el perro para ya que se encuentran niveles elevados de Hp después del tratamiento con corticosteroides y durante el hiperadrenocorticismismo (Harvey y West, 1987; Solter *et al.*, 1991; Martínez Subiela *et al.*, 2004). Esta característica limita el uso de este marcador en el control de la inflamación tratada con esteroides, ya que interfiere con la interpretación de la prueba. Sin embargo, una comprensión más completa de los mecanismos implicados puede revelar nuevos usos para este biomarcador, posiblemente como un método de cribado

para hiperadrenocorticismo canino (Eckersall y Bell, 2010).

C. Ensayos para la determinación de Hp:

Se pueden dividir en dos grandes grupos: Por un lado, los ensayos espectrofotométricos y por otro, los ensayos inmunológicos.

Diferentes ensayos manuales espectrofotométricos se han basado en la capacidad de la Hp para unirse a la Hb, formando complejos Hp-Hb que, o bien alteran la absorbancia característica de la Hb en proporción a la concentración de Hp en una muestra de suero, o bien preservan la actividad peroxidasa a un pH ácido, que puede ser detectada y cuantificada (Makimura y Suzuki, 1982; Harvey y West, 1987).

Además, un ensayo espectrofotométrico automatizado, validado en múltiples especies, que está basado en la actividad de la peroxidasa de complejos de Hp-Hb, en el que se elimina la interferencia por la albúmina del suero, ha sido la prueba validada en los diferentes laboratorios para el uso con suero canino, dando resultados satisfactorios (Eckersall *et al.*, 1999).

Inmunoensayos nefelométricos, en el que se mide la tasa de precipitación del complejo antígeno-anticuerpo, se han validado para la estimación de Hp en perros. Estos ensayos dependen de la reactividad cruzada del anticuerpo producido para Hp humana con Hp canina y deberán estar debidamente validados antes de su uso (Weidmeyer y Solter, 1996).

Es importante tener en cuenta que las muestras de suero canino deben diluirse en muchos casos cuando se utilizan ensayos de Hp desarrollados para otras especies, como las concentraciones de Hp en la salud y la enfermedad son significativamente más altas en los perros que en otras especies, tales como rumiantes o seres humanos (Cerón *et al.*, 2005).

Los factores que influyen en la concentración de Hp sérica para la determinación de la concentración en suero puede ser influido por distintos factores de la respuesta de fase aguda. Uno de ellos son los niveles elevados de Hb libre en el suero son seguidos por la disminución de la concentración sérica de libre Hp. Además de la respuesta de fase aguda, enfermedad renal e ictericia obstructiva pueden causar hiperhaptoglobulinemia. También se ha encontrado un efecto de Hb libre en muestras de suero,

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

reduciendo la concentración medida de Hp (Cerón *et al.*, 2005).

ESPECIE	PROCESO PATOLÓGICO
BOVINO	Síndrome de Hígado Graso Desordenes abdominales tratados quirúrgicamente (reticuloperitonitis traumática, desplazamiento del abomaso, distocias) Fiebre Aftosa Virus Respiratorio Sincitial Bovino Mamitis
PORCINO	<i>Actinobacillus</i> <i>Bordetella brochiseptica</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Streptococcus suis</i> Rinitis atrófica Neumonía enzoótica Estrés
PERRO	Inflamación Corticoterapia
EQUINO	Abscesos Infecciones bacterianas o víricas Estrongilosis

Tabla 7: Procesos causantes del incremento de Hp en diferentes especies (Martínez Subiela *et al.*, 2001).

2.6.3 Paraxonas-1 (PON-1)

La Paraxonasa-1 (PON-1) forma parte de la familia de las Paraoxonasas, enzimas multifacéticas que están codificadas

por tres genes altamente conservados (Paraxonasa-1, Paraxonasa-2 y Paraxonasa-3).

La Paraxonasa-1 descrita en 1946 por A. Mazur, como una enzima dependiente de calcio con actividades de esterasa y lactonasa. Posteriormente, en 1953, Aldridge dividió las esterases en dos categorías, las A-esterasas que catalizan hidrolizando los sustratos organofosforados y aquellos que fueron inhibidas por organofosforados, las B-esterasas. La enzima PON-1 es un A-esterasa y su denominación paraxonasa proviene de su capacidad de hidrolizar paraxón, un insecticida organofosforado utilizado en las labores agrícolas (Mazur, 1946; Aldridge, 1953).

En 1991 Mackness y colaboradores sugirieron que la enzima podría ser capaz de impedir o limitar la oxidación de las LDL (de las siglas del inglés low density lipoprotein), una lipoproteína cuya función principal es el transporte de lípidos o colesterol del hígado, donde se metaboliza, a los distintos tejidos y órganos. Ese fue el primer informe que le adjudicó a la PON-1 capacidad antioxidante, tornándose en un punto nodal para entender la importancia clínica de esta enzima, dada la relación entre el estrés oxidativo, la oxidación del LDL (Mackness *et al.*, 1991).

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la actualidad, estas enzimas son consideradas como "proteínas pluriempleo", ya que tienen papeles multifuncionales en varias vías bioquímicas de manera autónomas y, a menudo no relacionados, pudiendo ser la característica más interesante de Paraxonasa (Cerón *et al.*, 2014).

En medicina humana se ha estudiado ampliamente (Furlong *et al.*, 2010). La PON-1 es la enzima más estudiada de la familia, y aunque el interés de esta enzima surgió desde el punto de vista toxicológico, por su papel protector de la intoxicación por derivados organofosforados. Recientemente, las investigaciones se han centrado en otros aspectos clínicos tales como su papel protector en la enfermedad vascular, así como su uso como biomarcador de enfermedades que implican principalmente tres situaciones: de estrés oxidativo, ya que la PON-1 protege contra la oxidación, la inflamación, siendo considerada como una PFA negativa, y de enfermedades hepáticas, porque PON-1 se sintetiza en este órgano (Cerón *et al.*, 2014).

En medicina veterinaria, los estudios de PON-1 se han centrado en grandes animales, aunque en los últimos años se ha ganado interés en las pequeñas especies (Miyamoto

et al., 2005; Turk *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2009; Tvarijonavičiute *et al.*, 2012a).

En los perros, existen estudios que demuestran que PON-1 está disminuida en enfermedades caninas asociadas con el daño oxidativo, como la diabetes mellitus, el envenenamiento ingestión de cebolla y la intoxicación por rodenticida (Tvarijonavičiute *et al.*, 2012b).

A. Estructura

La PON-1 es una glicoproteína compuesta por 354 aminoácidos y su peso molecular es de 43 kDa. Es una b-hélice de seis aspas y cada aspa contiene cuatro filamentos (Harel *et al.*, 2004).

En el túnel central de la hélice hay dos iones calcio separados el uno del otro. El ion calcio en la sección central es considerado estructural. Su remoción de la PON-1 la inactiva frente al paraxón y al fenil-acetato; sin embargo, la falta del calcio afecta a su capacidad antioxidante sobre LDL. La PON-1 tendría dos sitios activos funcionales, uno para las actividades paraxonasa/arilesterasa y el otro para la protección contra la oxidación de las LDL (Aviram, 1998).



Figura 10: Estructura de PON-1

B. Función biológica

PON-1 es una enzima asociada con lipoproteínas de alta densidad (HDL). Sintetizado por el hígado, y secretada en el plasma, PON-1 protege las lipoproteínas de baja densidad y de partículas de lipoproteínas de alta densidad del estrés oxidativo promoviendo la degradación de peróxidos de lípidos contenidos en los ésteres de colesterol y fosfolípidos (Mackness *et al.*, 1991).

Las funciones, aunque no se conocen en su totalidad, hasta el momento se incluyen las que se detallan en la tabla 8 pag. 147.

En general, Paraxonasas aparecen como "cazadores" de viejos y nuevos sustratos a menudo involucrados en aterosclerosis y la trombogénesis (Martinelli *et al.*, 2013).

PON-1 se encuentra en mayor abundancia en el plasma en comparación con Paraxonasa-2 y Paraxonasa-3.

C. Ensayos para la determinación de Paraxonasa-1

PON-1 se puede medir sobre la base de su actividad por ensayos espectrofotométricos y también se puede cuantificar directamente por métodos inmunológicos usando anticuerpos específicos.

FUNCIONES DE PON-1

Protección contra el daño oxidativo y peroxidación lipídica.

Contribución a la inmunidad innata.

Desintoxicación de moléculas reactivas.

Bioactivación de fármacos.

Modulación de estrés del retículo endoplasmático.

Regulación de la proliferación celular/apoptosis.

Tabla 8: Funciones biológicas de la PON-1

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los ensayos espectrofotométricos se basan en la capacidad de PON-1 para hidrolizar sustratos, estos son los más ampliamente utilizados, quizás por el coste y disponibilidad (Tvarijonaviciuteb *et al.*, 2012c; Cerón *et al.*, 2014).

PON-1 es una enzima con la capacidad de hidrolizar múltiples sustratos y por lo tanto puede ser evaluada por sus diferentes actividades que se detallan a continuación:

- Su actividad paraxonasa: cuando se utiliza paraxón como sustrato.
- Su actividad arilesterasa: cuando se utiliza como sustrato un no ariléster fósforo (tal como acetato de fenilo o 4 (p) acetato de etilo-nitrofenil).
- Su actividad lactonas: cuando se utilizan como sustrato un butirolactona 5 -thiobutil -TBBL- u otras lactonas tales como dihidrocumarina.

Estos sustratos, son actualmente los más frecuentemente utilizados. Sin embargo, hay otros sustratos tales como clorpirifos, diazinon, sarín o el somán en el grupo de compuestos organofosforados (Davies *et al.*, 1996) y otras lactonas diferentes (Teiber *et al.*, 2003; Khersonsky *et al.*,

2006) que se pueden también emplear en ensayos de PON-1.

En los perros, la actividad PON-1 en suero se ha medido tradicionalmente con un método manual que implica paraxón como sustrato (Motta *et al.*, 2009). Pero el uso del método paraxón en la práctica clínica es limitada por causa de los efectos tóxicos extremos del paraxón. Las mediciones de las actividades enzimáticas lactonasa y arilesterasa PON-1 están libres de estas limitaciones.

2.6.4. Albúmina

La albúmina fue una de las primeras proteínas plasmáticas en ser reconocida. Su nombre deriva de la palabra latina *albus* (blanco), dadas las características de la clara de huevo. La albúmina del suero fue definida inicialmente como una proteína soluble en agua en ausencia de sales, en contraste a la globulina, que es insoluble en tales condiciones (Peters, 1977).

Los primeros trabajos de laboratorio clínico con albúmina datan de 1921, cuando se introdujo el uso de sulfato de sodio para su fraccionamiento (Howe, 1921). Es una proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre. Su concentración en el plasma sanguíneo constituye el 35-50% del total de las proteínas plasmáticas de perros sanos, en contraste con los humanos y los primates no humanos que presentan un valor del 60-70 % del volumen total del plasma sanguíneo (Cerón *et al.*, 2005).

Es la proteína más homogénea, soluble, estable y de mayor movilidad electroforética debido a su elevada concentración de cargas negativas (obviando la pequeña banda llamada pre-albúmina, que la precede).

A. Estructura

La albúmina presenta una estructura terciaria, y se caracteriza por presentar un patrón repetido de tres dominios helicoidales grandes, estabilizados mediante un patrón de múltiples enlaces disulfuro que no aparece en otras proteínas. Los tres dominios son homólogos y los puentes disulfuro involucran la participación de residuos cisteínas adyacentes. En todos los mamíferos de los que se conoce la secuencia peptídica de sus albúminas se ha comprobado que éstas contienen 35 cisteínas, las cuales forman 17 puentes disulfuro. Los enlaces disulfuros son típicos de proteínas extracelulares y contribuyen a la

estabilidad de las proteínas plasmáticas en la circulación (Peters, 1995).

B. Función biológica

La albúmina es una proteína sintetizada en el hígado. Permanece en circulación aproximadamente unos diecinueve días hasta que es metabolizada en los tejidos para los que es fuente de aminoácidos (Coles, 1974).

Sus funciones más importantes guardan relación con su tamaño, que la mantiene dentro del torrente circulatorio, contribuyendo a transportar moléculas de pequeño tamaño

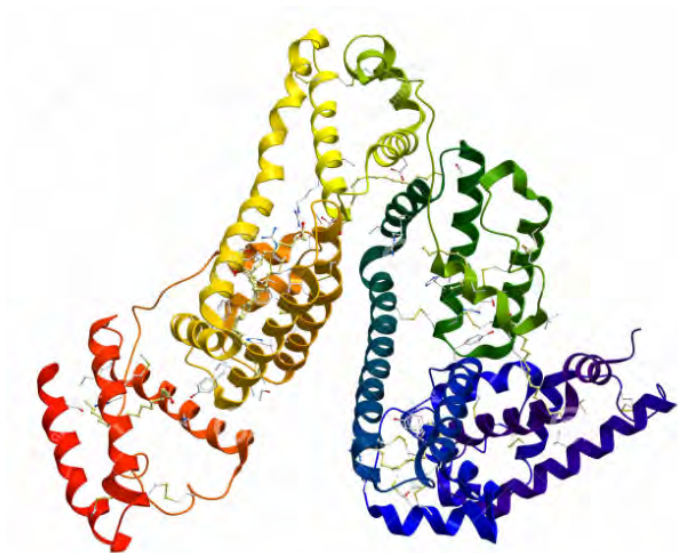


Figura 11: Estructura molecular de albúmina

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

(ácidos grasos, bilirrubina, calcio, progesterona, fármacos, etc.). Son las invaginaciones de la molécula y sus regiones hidrofóbicas las que le proporcionan a la seroalbúmina sus excelentes propiedades de unión (Marcus *et al*,1998).

Por otro lado, la albúmina también es de vital importancia para el mantenimiento de la presión oncótica de la sangre, responsable de aproximadamente el 75% de la presión osmótica del plasma, impidiendo el pasaje de agua desde la sangre a los tejidos (Universal Protein Resource).

Además, las moléculas de albúmina ofrecen una superficie total importante para la absorción de tóxicos, lo que le otorga la capacidad de unirse a muchos iones (cobre, zinc y cadmio por ejemplo), y otros compuestos para que estos puedan ser transportados. También transportan dinitro y ortocresoles, los derivados nitro- y halogenados de hidrocarburos aromáticos y los fenoles, por lo que la albúmina contribuye al proceso de detoxificación del organismo, fijando estas sustancias tóxicas para su eliminación de los tejidos. Por otra parte, el zinc por ejemplo, un oligoelemento importante para el organismo por su participación en numerosos aspectos del metabolismo celular, es transportado a los tejidos en un

70% por la albúmina (Porth *et al.*, 2009).

Así mismo, la albúmina actúa como reactante de fase aguda participando también en la defensa humoral contra los procesos infecciosos (Martínez Subiela *et al.*, 2004).

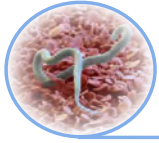
C. Ensayos para determinación de Albúmina:

La albúmina generalmente se mide de forma rutinaria en los perros por métodos espectrofotométricos (Alper, 1974), con verde de bromocresol (BCG) con ensayos de unión, en analizadores de química automatizada. El anticoagulante y el procedimiento de ensayo para la determinación de las concentraciones de albúmina parecen ser relevantes ya que, según ciertos autores, las concentraciones de albúmina se sobreestima en plasma heparinizado en comparación con el suero debido a la combinación de heparina y de fibrinógeno (Stokol *et al.*, 2001; Cerón *et al.*, 2005).



4. ARTÍCULOS





Artículo 1

Acute phase response in dogs with
Dirofilaria immitis.

Veterinary Parasitology 204 (2014) 420-425



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Short communication

Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*



J.C. Méndez^a, E. Carretón^a, S. Martínez^b, A. Tvarijonaviciute^b,
J.J. Cerón^b, J.A. Montoya-Alonso^{a,*}

^a Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain

^b Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis (Interlab-UMU), Veterinary School, Campus of Excellence Mare Nostrum, University of Murcia, Espinardo, 30100 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2014

Received in revised form 25 April 2014

Accepted 5 May 2014

Keywords:

Acute phase proteins

Dog

Dirofilaria immitis

Heartworm disease

ABSTRACT

The aim of this study was to determine concentrations of different positive and negative acute phase proteins (C-reactive protein, haptoglobin, albumin and paraoxonase-1) in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* at the time of diagnosis. 194 dogs were included in the study. All were evaluated for the presence or absence of *D. immitis* circulating antigens and for the presence or absence of microfilariae and a clinical examination was carried out. 38 dogs were negative and 156 dogs were positive for circulating *D. immitis* antigens. A significant increase in C-reactive protein and significant decreases in albumin and paraoxonase-1 activity were observed in positive dogs. These changes appeared with independence of the presence/absence of microfilariae or clinical signs. C-reactive protein was the only acute phase protein that showed significant differences between asymptomatic and symptomatic dogs. Interestingly, the increases seen in C-reactive protein values were not accompanied by increases in haptoglobin, and haptoglobin even decreased in the dogs with microfilaria. This could be due to the hemolytic anemia which can be produced in dirofilariasis. In conclusion, there is an acute phase response (with increases in C-reactive protein and decreases in albumin and paraoxonase-1) and a divergence in the behaviour between C-reactive protein and haptoglobin in dogs with *D. immitis*.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Heartworm disease (HWD) is a vector-borne disease caused by the nematode *Dirofilaria immitis*. It primarily affects dogs, cats and other carnivores in temperate climates, tropical moist and worldwide. Nevertheless, it also causes zoonotic infections, producing pulmonary dirofilariasis in humans (Simón et al., 2012).

Pathogenic mechanisms are very complex involving mechanic processes, the host's immune response against the adult worms or microfilariae, and factors released by

filarial parasites (Mupanomunda et al., 1997; McCall et al., 2008) and the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis* (Kramer et al., 2008). Clinical manifestations of infection are strongly dependent on the type of immune response elicited by the parasite (Taylor, 2002). In this regard it seems that filarial and *Wolbachia* antigens trigger the release of proinflammatory and chemotactic cytokines by resident cells, which induce cellular infiltration and amplification of the inflammatory response (Hise et al., 2004).

The acute phase response is an early defense of the body in response to trauma, infection or inflammation. It is considered a part of the innate host defense system and in evolutionary terms it precedes the acquired immune response (Eckersall and Bell, 2010). During this response a variation in the concentrations of certain proteins present

* Corresponding author. Tel.: +34 928 451114; fax: +34 928 451114.
E-mail address: amontoya@dpat.ulpgc.es (J.A. Montoya-Alonso).

in the plasma called acute phase proteins (APPs), is produced (Ceron et al., 2005). APPs are classified into two groups based on their response to the triggering event (Heinrich et al., 1990). Negative APPs (e.g. albumin and paraoxonase-1(PON-1)) are those whose levels are diminished and positive APPs (e.g. C-reactive protein (CRP)), ceruloplasmin and haptoglobin (Hp)) are those whose levels are increased when there is an acute phase response (Ceron et al., 2005; Tvarijonavičute et al., 2012a). Quantification of serum or plasma concentration of these proteins may provide valuable clinical information in the diagnosis, monitoring and prognosis of various diseases (Cerón et al., 2008).

Initial immune interactions between the host and the filarial parasite occur within the category of an innate immune response (Hise et al., 2004). Thus the presence of an acute phase response could be predicted in dogs with HWD. However, with the exception of a report in which low levels of Hp are reported in dogs with HWD (Kitagawa et al., 1987), to the author's knowledge it is not known whether acute phase proteins are produced by dogs infected with *D. immitis*.

The aim of this study was to determine concentrations of different positive and negative APPs (CRP, Hp, albumin and PON-1) in dogs naturally infected with *D. immitis* at the time of diagnosis.

2. Materials and methods

2.1. Animals and sampling procedure

194 client-owned dogs brought to the Veterinary Medicine Service of the University of Las Palmas de Gran Canaria were included. All the animals lived on the island of Gran Canaria, a hyperendemic area of dirofilariosis (Montoya-Alonso et al., 2011). All the owners of the animals included consented to participate. The study was approved by the ethics committee of Veterinary Medicine Department of the University of Las Palmas de Gran Canaria and was conducted in accordance with current European legislation on animal protection.

Dogs were evaluated for the presence or absence of *D. immitis* by using a commercial ELISA test kit for the detection of circulating antigens (Uranotest *Dirofilaria*®, Urano Vet SL, Barcelona, Spain) according to manufacturer's instructions. Dogs were further evaluated for the presence or absence of microfilariae using a modified Knott test and a clinical examination was carried out.

Blood samples were drawn from the cephalic vein of each animal and collected into tubes without anticoagulant. Serum was obtained and frozen (-20°C) until analysis of APPs.

2.2. Laboratory measurements

The concentration of CRP was measured using a human immunoturbidimetric test (CRP OSR 6147 Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Lismeehan, O'Callaghan Mills, Co. Clare, Ireland) used previously in dogs (Caldin et al., 2009).

Hp concentrations were measured by a commercially available colorimetric method (kit haptoglobin Tridelta phase range, Tridelta Development Ltd.) that was previously validated for use in dogs (Martínez-Subiela and Cerón, 2005).

Albumin was determined using a commercially available Bromocresol green reagent (Albumin OSR 6102 Olympus Life and Material Science Europe GmbH (Irish branch) Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland).

Serum PON1 activity was determined using *p*-nitrophenyl acetate following a previously described method validated for use in dogs (Tvarijonavičute et al., 2012b).

All determinations were performed in serum on an automated biochemistry analyzer (Olympus AU600 Automatic Chemistry Analyzer, Olympus Europe GmbH, Hamburg, Germany).

2.3. Statistical analysis

The Graphpad Prism software was used for all data analysis. Results were evaluated for approximate normality of distribution by using the Shapiro-Wilk normality test, giving a nonparametric distribution; therefore, all data were normalized by logarithmic transformation before analysis. Unpaired *t* test was used to compare APPs concentrations between negative and positive animals. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test were used to test if there are significant differences between APPs concentrations of negative, microfilaremic and microfilaremic dogs and also, negative, asymptomatic and symptomatic dogs. Correlations between the different APPs studied were determined using Spearman correlation analysis. A value of $P < 0.05$ was determined as significant.

3. Results

3.1. Animals

38 dogs (17 females and 21 males) were negative for circulating *D. immitis* antigens. Age ranged from 2 to 8 years (mean: 4.6 years). All animals were clinically healthy, had no circulating microfilariae, and had no obvious signs of heartworm infection.

156 dogs (79 females and 77 males) were positive for circulating *D. immitis* antigens. Age ranged from 1 to 14 years (mean: 4.6 years). Of them, 47 were amicrofilaremic and 109 were microfilaremic. Of the infected dogs, 92 were asymptomatic (had no signs of heartworm infection) and 64 were symptomatic (animals showing one or more of these signs: cough, dyspnea, cachexia, exercise intolerance, syncope, ascites, hemoptysis and lung crackles).

3.2. APPs concentrations in HWD negative vs positive dogs

Results for all analyses obtained in HWD negative and positive dogs are presented in Fig. 1. Significantly higher concentrations of CRP were observed in dogs positive to filarial antigen (mean: 23.88 mg/L) when comparing

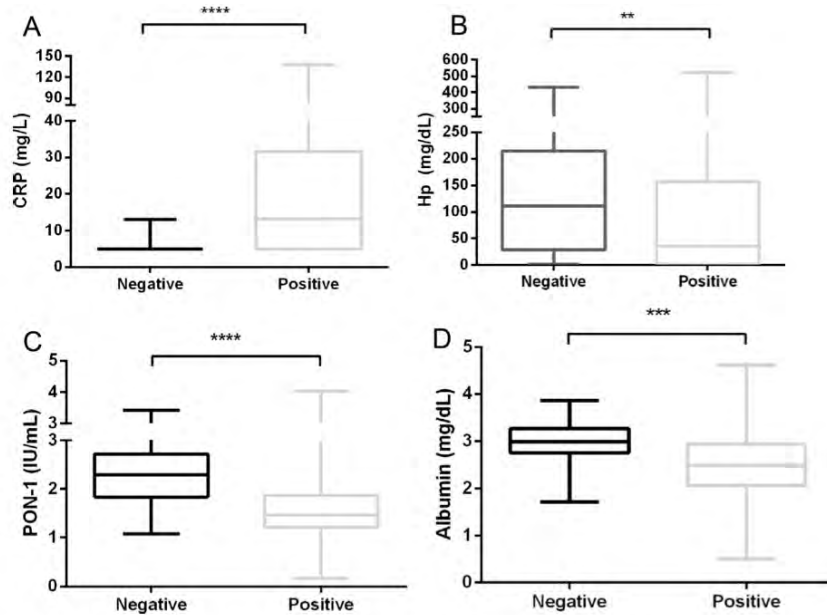


Fig. 1. Serum CRP (A), Hp (B), PON-1 (C) and albumin (D) values in dogs negative and positive for circulating *D. immitis* antigens. The plot show median (line within box), 25th and 75th percentiles (box) and minimum and maximum values (whiskers). Asterisks indicated significant differences between groups: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

with control dogs (mean: 5.9 mg/L). Contrarily, significantly decreased concentrations of Hp, albumin and PON-1 activity (mean: 101.6 g/L for Hp; 1.54 IU/mL for PON-1; 2.47 mg/dL for albumin) were observed in HWD positive dogs when compared to HWD negative dogs (mean: 129.4 g/L for Hp; 2.32 IU/mL for PON-1; 2.94 mg/dL for albumin).

3.3. APPs values with regard to dogs microfilaremic status

Results for all analyses obtained in positive microfilaremic or amicrofilaremic animals with independence of their clinical status appear in Fig. 2. Significantly higher concentrations of CRP were observed in both positive microfilaremic (mean: 25.03 mg/L) and amicrofilaremic (mean: 21.15 mg/L) dogs when comparing with HWD negative dogs (mean: 5.9 mg/L). However no significant differences were found between microfilaremic and amicrofilaremic animals.

Significantly lower concentrations of Hp were found in microfilaremic HWD positive dogs (mean: 84.1 g/L) when comparing with control negative (mean: 129.4 g/L) and with amicrofilaremic HWD positive dogs (mean: 144.8 g/L). However no significant differences were found between controls and positive amicrofilaremics dogs.

Significantly decreased concentrations of albumin and PON-1 activity were observed in microfilaremic HWD positive dogs (1.55 IU/mL for PON-1; 2.46 mg/dL for albumin) and amicrofilaremic HWD positive dogs (1.53 IU/mL for PON-1; 2.50 mg/dL for albumin) when compared to control

group (2.32 IU/mL for PON-1; 2.94 mg/dL for albumin), but no differences were seen between amicrofilaremic and microfilaremic HWD positive dogs.

3.4. APPs values with regard to dogs clinical status

Results for all analyses obtained in negative and positive HWD dogs, either asymptomatic or symptomatic animals, appear in Fig. 3. Significant differences were found between the group of HWD negative (mean: 5.9 mg/L for CRP; 129.4 g/L for Hp; 2.32 IU/mL for PON-1; 2.94 mg/dL for albumin) and the groups of HWD positive and asymptomatic (mean: 20.68 mg/L for CRP; 96.30 g/L for Hp; 1.56 IU/mL for PON-1; 2.56 mg/dL for albumin) or HWD positive and symptomatic (mean: 28.49 mg/L for CRP; 117.6 g/L for Hp; 1.51 IU/mL for PON-1; 2.34 mg/dL for albumin) dogs for all analyses measured, with significant increases in CRP and decreases in Hp, albumin and PON-1. These changes were of high magnitude in symptomatic animals, however no significant differences were found between asymptomatic and symptomatic animals, except in case of CRP in which significantly higher concentrations were found in symptomatic dogs.

3.5. Correlations between APPs

Significant but weak ($r = 0.2$) negative correlation was found between CRP and PON-1 and between CRP and albumin. No correlation was found between Hp and any other analytes.

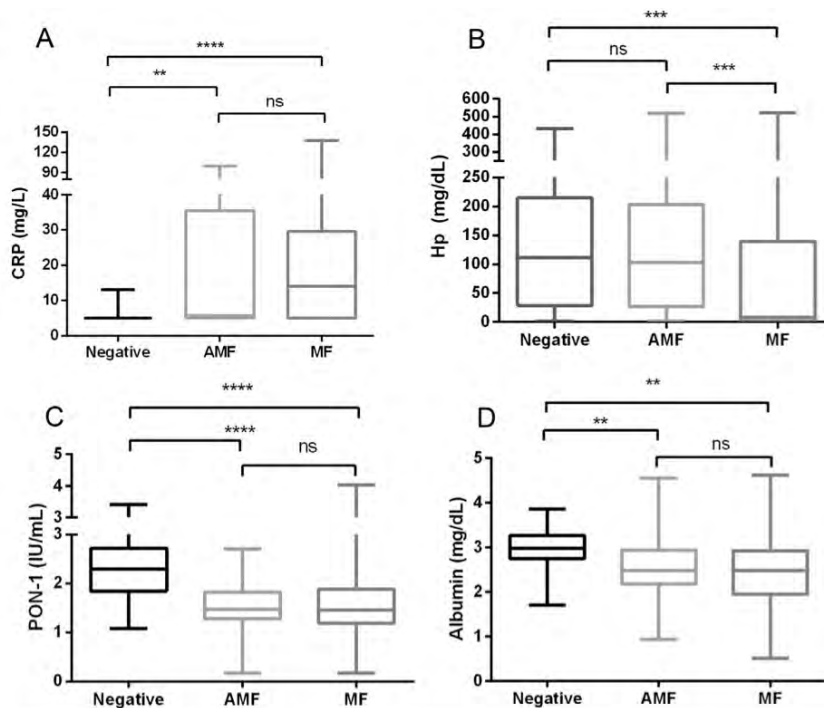


Fig. 2. Serum CRP (A), Hp (B), PON-1 (C) and albumin (D) values in negative, positive amicrofilaremic (AMF) and positive microfilaremic (MF) dogs. The plot show median (line within box), 25th and 75th percentiles (box) and minimum and maximum values (whiskers). Asterisks indicated significant differences between groups: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. ns: not significant.

4. Discussion

It is known that inflammation is involved in the pathogenesis of canine HWD (Taylor, 2002), so an acute phase response could be predicted in animals with this disease. However, to the author knowledge there is only a report (Kitagawa et al., 1987) in which the positive APPs Hp is measured in dogs with *D. immitis* and the presence of an acute phase response could not be demonstrated, since decreased Hp concentrations were observed instead of the increased values that could be expected as a consequence of an acute phase response.

The present study shows that an acute-phase response occurs in dogs with *D. immitis* since a significant increase in CRP and significant decreases in albumin and PON-1 activity were observed in HWD positive dogs. These changes appeared with independence of the presence/absence of microfilariae status or clinical signs. The increase in CRP values obtained was mild ($\times 4$ fold). This finding would probably reflect that the inflammatory process associated to the disease is not severe since major increases ($\times 15$ – 20 fold) of CRP have been reported to be associated with more severe tissue damage and inflammatory reaction in other parasitic diseases such as ehrlichia (Mylonakis et al., 2011) or babesia (Matijatko et al., 2007). Therefore the presence of a major increase in CRP in a dog with *D. immitis* could be indicative of the presence of an additional infectious

or inflammatory process that can complicate the case. CRP was the only APP that showed significant differences between asymptomatic and symptomatic HWD positive dogs similarly to that reported for dogs with leishmaniosis (Martínez-Subiela et al., 2002). It should be pointed out that the asymptomatic dogs, although had significant increases in CRP compared with healthy ones, many of them ($n=49$) had values that remain inside the reference range of our laboratory (<12 mg/L).

The negative APPs albumin and PON-1 decreased. They were correlated with CRP and therefore this decrease could be influenced by inflammation. However other factors such as the presence of proteinuria in the case of albumin (Cerón et al., 2013) or the oxidative stress in PON-1 (Tvarijonavičiute et al., 2012b) could also influenced their decrease, and further studies would be recommended to elucidate and clarify this topic.

A divergence between the behavior of the positive APPs CRP and Hp occurs in this study, since increases in CRP were not accompanied by increases in Hp, and Hp even decreased in the dogs with microfilaria. Kitagawa et al. (1987) found also decreased concentrations of Hp in dogs with *D. immitis*. One hypothesis that could explain this decrease is the possible presence of hemolytic anemia, which could be subclinical or clinically evident as occurs in severe HWD cases with caval syndrome (Sutton and Atwell, 1982; Ishihara et al., 1978, 1981; Kitagawa et al., 1989).

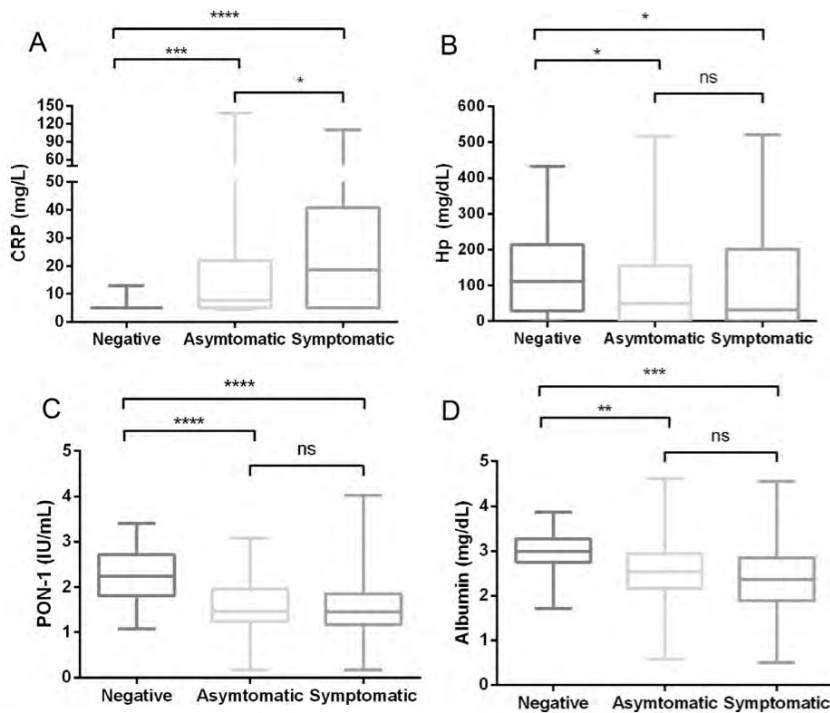


Fig. 3. Serum CRP (A), Hp (B), PON-1 (C) and albumin (D) values in negative, positive asymptomatic and positive symptomatic dogs. The plot show median (line within box), 25th and 75th percentiles (box) and minimum and maximum values (whiskers). Asterisks indicated significant differences between groups: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. ns: not significant.

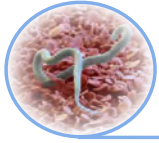
The mechanism behind would be that hemoglobin released from erythrocytes binds to and saturates Hp and is removed from the circulation (Langlois and Delanghe, 1996). Similar divergences in the behavior of positive APPs have been found in other conditions that produced intravascular hemolysis such as canine babesiosis (Matijatko et al., 2007).

In conclusion, the data presented here indicate that there is an acute phase response (with increases in CRP and decreases in albumin and PON-1) in dogs with *D. immitis*. CRP increases in heartworm infected dogs and the increase is more evident in dogs with clinical signs. In endemic areas the presence of a moderate increase in CRP and a divergence in the behaviour between CRP and Hp could raise the suspicion of HWD.

References

- Caldin, M., Tasca, S., Carli, E., Bianchini, S., Furlanello, T., Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J., 2009. Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Vet. Clin. Pathol.* 38, 63–68.
- Cerón, J.J., Eckersall, P.D., Martínez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* 34, 85–99.
- Cerón, J.J., Martínez-Subiela, S., Ohno, K., Caldin, M., 2008. A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. *Vet. J.* 177, 6–7.
- Cerón, J.J., Caldin, M., Martínez-Subiela, S., 2013. Proteínas Plasmáticas. In: Cerón, J.J. (Ed.), *Análisis clínicos en pequeños animales*. Inter-Médica, Buenos Aires, pp. 91–104.
- Eckersall, P.D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* 185, 23–27.
- Heinrich, P.C., Castell, J.V., Andus, T., 1990. In-terleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265, 621–636.
- Hise, A.G., Gillette-Ferguson, I., Pearlman, E., 2004. The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in filarial disease. *Cell. Microbiol.* 6, 97–104.
- Ishihara, K., Kitagawa, H., Ojima, M., Yagata, Y., Sugauma, Y., 1978. Clinicopathological studies on canine dirofilarial hemoglobinuria. *Nihon Juigaku Zasshi* 40 (5), 525–537.
- Ishihara, K., Kitagawa, H., Yokoyama, S., Ohashi, H., 1981. Studies on hemolysis in canine dirofilarial hemoglobinuria. Lipid alterations in blood serum and red cell membrane. *Nippon Juigaku Zasshi* 43 (1), 1–11.
- Kitagawa, H., Sasaki, Y., Matsui, A., Ishihara, K., Uchiyama, T., 1987. Serum haptoglobin levels in canine dirofilariasis. *Nihon Juigaku Zasshi* 49, 261–266.
- Kitagawa, H., Sasaki, Y., Ishihara, K., 1989. Clinical studies on canine dirofilarial hemoglobinuria: measured and calculated serum osmolalities and osmolar gap. *Nippon Juigaku Zasshi* 51 (4), 703–710.
- 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.
- Langlois, M., Delanghe, J., 1996. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin. Chem.* 42, 1589–1600.
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Eckersall, P.D., Cerón, J.J., 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.* 150, 241–244.
- 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.

-
- Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., Romić, Z., Simec, Z., Ceron, J.J., 2007. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.* 144, 242–250.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* 66, 193–285.
- Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., 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.
- Mupanomunda, M., Williams, J.F., Mackenzie, C.D., Kaiser, L., 1997. *Dirofilaria immitis*: heartworm infection alters pulmonary artery endothelial cell behavior. *J. Appl. Physiol.* 82, 389–398.
- Mylonakis, M.E., Ceron, J.J., Leontides, L., Siarkou, V.I., Martinez, S., Tvarijonavičiute, A., Koutinas, A.F., Harrus, S., 2011. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 811–817.
- 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.
- Sutton, R.H., Atwell, R.B., 1982. Renal haemosiderosis in association with canine heartworm disease. *J. Small Anim. Pract.* 23, 773–777.
- Taylor, M.J., 2002. *Wolbachia* endosymbiotic bacteria of filarial nematodes. A new insight into disease pathogenesis and control. *Arch. Med. Res.* 33, 422–424.
- Tvarijonavičiute, A., Kocaturk, M., Cansev, M., Tecles, F., Ceron, J.J., Yilmaz, Z., 2012a. Serum butyrylcholinesterase and paraoxonase 1 in a canine model of endotoxemia: effects of choline administration. *Res. Vet. Sci.* 93, 668–674.
- Tvarijonavičiute, A., Tecles, F., Caldin, M., Tasca, S., Cerón, J.J., 2012b. Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 73, 34–41.



Artículo 2

Acute phase protein response in
heartworm-infected dogs after
adulticide treatment.

Veterinary Parasitology 209 (2015) 197-201



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment



J.C. Méndez^a, E. Carretón^a, S. Martínez-Subiela^b, A. Tvarijonaviciute^b, J.J. Cerón^b, J.A. Montoya-Alonso^{a,*}

^a Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain

^b Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis (Interlab-UMU), Veterinary School, Campus of Excellence Mare Nostrum, University of Murcia, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2014

Received in revised form 16 February 2015

Accepted 28 February 2015

Keywords:

Dirofilaria immitis

Heartworm

Acute phase proteins

Adulticide treatment

ABSTRACT

During the adulticide treatment of *Dirofilaria immitis* the worms die releasing fragments of parasites and causing pulmonary thromboembolisms which could exacerbate the clinical condition. To determine the utility of acute phase proteins (APPs) to monitor the progression of the treatment, different positive [C-reactive protein (CRP), haptoglobin (hp)] and negative [albumin, paraoxonase-1 (PON-1)] APPs were measured in 15 heartworm-infected dogs (5 with high and 10 with low parasite burden) following adulticide treatment. The results showed increased concentrations of CRP, decreased concentrations of haptoglobin and PON-1 in infected dogs before starting the treatment. Progressive but not significant increases were observed in PON-1 activity and albumin concentration along the treatment. After the treatment with doxycycline and ivermectine a decrease in CRP and Hp levels was experienced, which could reflect a reduction of the vascular inflammation caused by the elimination of *Wolbachia* and reduction of microfilariae. Fifteen days after the first melarsomine injection, marked increases in CRP and Hp were observed, which could be due to pulmonary inflammation and thromboembolism caused by the post-adulticide death of the worms. This increase was greater in dogs with high parasite burden. As the pathology disappeared, there was an improvement in the concentrations of CRP and Hp, returning into reference values in dogs with low parasite burden at the end of the treatment. The measurement of CRP and Hp could be a resource of support to evaluate the magnitude of the post-adulticide complications during the adulticide treatment of *D. immitis*.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Adult *Dirofilaria immitis* (heartworm) reside in pulmonary arteries of the canine host, causing severe and potentially fatal disease, first characterized by pulmonary endarteritis which evolves to chronic vascular remodeling,

pulmonary hypertension and congestive heart failure (McCall et al., 2008; Simón et al., 2012). This pathogenic reaction is caused by the host's response to the parasite itself, adult or microfilariae, as well as the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*, which resides in all biological stages of the parasite, triggering the release of proinflammatory and chemotactic cytokines which induce cellular infiltration and amplification of the inflammatory response (Hise et al., 2004; Kramer et al., 2008). Moreover, during the adulticide treatment the worms die

* Corresponding author. Tel.: +34 928 451114; fax: +34 928 451114.
E-mail address: alberto.montoya@ulpgc.es (J.A. Montoya-Alonso).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.036>
0304-4017/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

releasing fragments of parasites and causing pulmonary thromboembolisms which could exacerbate the clinical condition and symptoms.

It has been reported that there is an acute phase response in dogs with *D. immitis* that is characterized by an increase in C-reactive protein (CRP), a decrease in albumin and paraoxonase-1 (PON-1), as well as by a divergence in the behavior between CRP and haptoglobin (Hp), since increases in CRP were not accompanied by increases in Hp, and Hp even decreased in the dogs with microfilaria (Méndez et al., 2014). Furthermore, it has been suggested that the presence of a moderate increase in CRP and this discrepancy in the results of CRP and Hp could raise the suspicion of heartworm infection in endemic areas.

Besides the utility to support in the assessment of the severity of a disease, the determination of acute phase proteins (APPs) also may be of value to monitor the progression of the disease and the response to the treatment in different inflammatory diseases in the dog (Ceron et al., 2005; Martínez-Subiela et al., 2011; Mylonakis et al., 2011). In the case of canine heartworm disease, it has been recently reported that CRP concentrations are related with the severity of the disease and the development of endothelial damage (Carretón et al., 2014; Venco et al., 2014). However, to the author's knowledge, no information is currently available regarding the utility of APPs to monitor the response to treatment in this disease.

APPs are classified into two groups based on their response to the triggering event; negative APPs are those whose levels are diminished and positive APPs are those whose levels are increased when there is an acute phase response (Ceron et al., 2005; Tvarijonavičiute et al., 2012). The aim of the present study was to evaluate the concentrations of different positive (CRP and Hp) and negative (albumin and PON-1) APPs in heartworm infected dogs following adulticide treatment.

2. Materials and methods

2.1. Animals and samples

Fifteen client-owned dogs brought to the Veterinary Medicine Service of Las Palmas de Gran Canaria University were included in the study. The dogs lived in a hyper-endemic area of *D. immitis* (Montoya-Alonso et al., 2011; Carretón et al., 2012).

Nine were males and six were females; age ranged from 2 to 10 years, with a mean age of 5.13 years. Inclusion in the study was based on a positive result for circulating *D. immitis* antigens (Uranotest Dirofilaria®, Urano Vet SL, Barcelona, Spain). Dogs were further evaluated for the presence or absence of microfilariae using a modified Knott test. In addition, echocardiographic findings (Venco et al., 2003) and qualitative antigen testing were evaluated to estimate the worm burden, and according to the results the dogs were divided into two groups (low and high parasite burden).

All the owners provided informed consent for their dogs' enrolment. The study was approved by the Ethics Committee of the Veterinary Medicine Service of Las Palmas de

Gran Canaria University and was carried out in accordance to current European legislation on animal protection.

The dogs received adulticide treatment following the American Heartworm Society recommended management protocol (American Heartworm Society, 2014). Briefly, on day 0 the dog is diagnosed and verified as heartworm positive, starting monthly heartworm preventative based on ivermectine (6 µg/kg) and the administration of doxycycline (10 mg/kg BID) for 4 weeks. On day 60 the dog is treated with the first intramuscular injection of melarsomine (2.5 mg/kg), followed on day 90 by a second injection, and a third injection on day 91. On day 120 the dog is clinically examined and discharged. Finally, on day 271, 6 months after completion, an antigen test is carried out to confirm the adulticide efficacy. It was recommended moderate exercise restriction from day 0 until the administration of the first adulticide injection (day 60), and strict exercise restriction afterwards (home rest, always on leash when walking).

Blood samples were drawn from the cephalic vein of each animal on day 0, day 60 (before the first melarsomine injection), day 75 and day 90 (2 and 4 weeks after the first melarsomine injection, respectively) and day 120. Blood was collected into tubes without anticoagulant, serum was obtained and frozen (-20 °C) until analysis.

2.2. Determination of acute phase proteins

The concentration of CRP was measured using a human immunoturbidimetric test (CRP OSR 6147 Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Lismeehan, O'Callaghan Mills, Co. Clare, Ireland) previously evaluated for use in dogs (Caldin et al., 2009).

Hp concentrations were measured by a commercially available colorimetric method (kit haptoglobin Tridelta phase range, Tridelta Development Ltd.) that was previously validated in dogs (Martínez-Subiela et al., 2003; Martínez-Subiela and Cerón, 2005).

Albumin was determined using a commercially available Bromocresol green reagent [Albumin OSR 6102 Olympus Life and Material Science Europe GmbH (Irish branch) Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland].

Serum PON-1 activity was determined using *p*-nitrophenyl acetate as substrate, following a previously described method validated for use in dogs (Tvarijonavičiute et al., 2012).

All determinations were performed in serum on an automated biochemistry analyser (Olympus AU600 Automatic Chemistry Analyzer, Olympus Europe GmbH, Hamburg, Germany).

2.3. Statistical analysis

The Graphpad Prism software was used for all data analysis. The results were evaluated for approximate normality of distribution by using the Shapiro-Wilk normality test, giving a nonparametric distribution; therefore, all data were normalized by logarithmic transformation before analysis. Medians and percentiles were calculated using routine descriptive statistical procedures. One-way ANOVA of repeated measures followed by Fisher's LSD test was

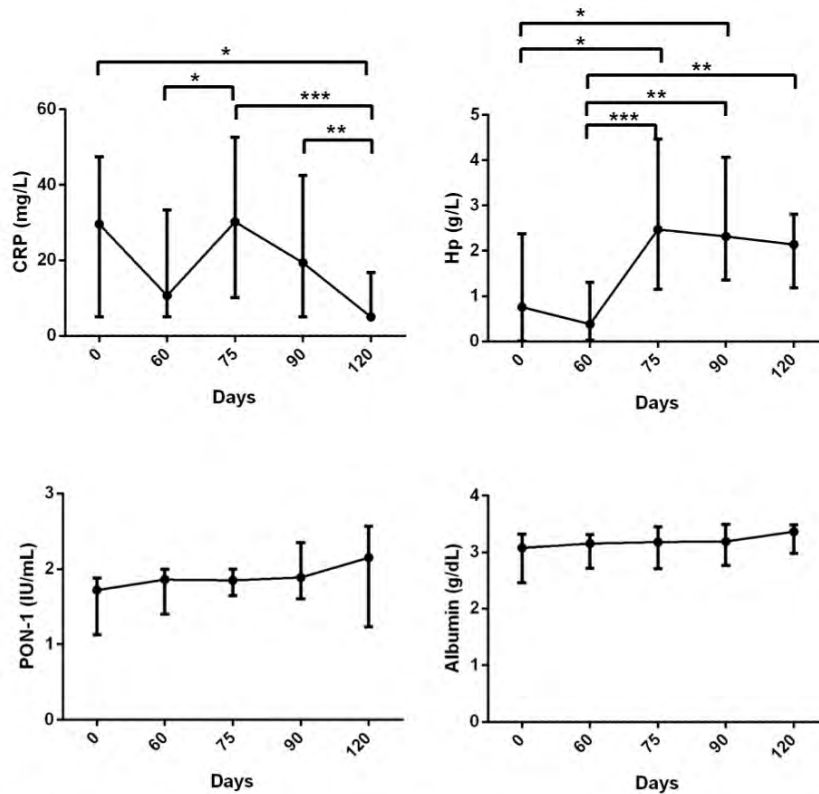


Fig. 1. Serum C-reactive protein (CRP), haptoglobin (Hp), paraoxonase-1 (PON-1) and albumin values in heartworm-infected dogs during the adulticide treatment. Circles show median values and error bars show interquartile range. Asterisks indicate significant differences between days: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

performed to assess differences in the concentrations of the analytes at different time points after beginning the treatment. A p value < 0.05 was determined as significant.

3. Results

According to Venco et al. (2003), when worms were visualized in the pulmonary trunk and/or in the proximal intralobar pulmonary arteries, the worm burden was more likely to be clinically significant, while when no worms were visualized or only a few echoes occupying the right pulmonary artery and extending to the main pulmonary artery, the worm burden was considered low. Based on these observations, five animals were considered as having a high parasite burden and 10 dogs as having a low parasite burden.

At the beginning of the treatment, nine dogs were microfilaremic and six were amicrofilaremic. All the studied animals completed the treatment. Four dogs showed mild post-adulticide signs (mainly cough and apathy), being only dogs with high parasite burden. On day 271, all dogs were negative to the antigen test, none of them revealed presence of microfilariae and the

echocardiographic examination showed no evidence of worms in any of the dogs.

Kinetics and mean values of the different analytes measured along the study are presented in Table 1 and Fig. 1. On day 0, the median values of CRP (29.6 mg/L) were above the reference range of the laboratory while the median values of Hp (0.75 g/L) and PON-1 (1.72 IU/L) were below. On the other hand, the mean values of albumin (3.08 g/dL) were within reference range.

CRP values decreased on day 60 (10.7 mg/L), increasing afterwards on day 75 (30.2 mg/L), 2 weeks after the first injection of melarsomine. Then CRP concentrations

Table 1 Median values of C-reactive protein (CRP), haptoglobin (Hp), paraoxonase-1 (PON-1) and albumin in heartworm-infected dogs during the treatment.

	CRP (mg/L)	Hp (g/L)	PON-1 (IU/L)	Albumin (g/dL)
Day 0	29.6	0.75	1.72	3.08
Day 60	10.7	0.38	1.86	3.15
Day 75	30.2	2.47	1.85	3.18
Day 90	19.4	2.31	1.89	3.19
Day 120	5	2.14	2.15	3.36

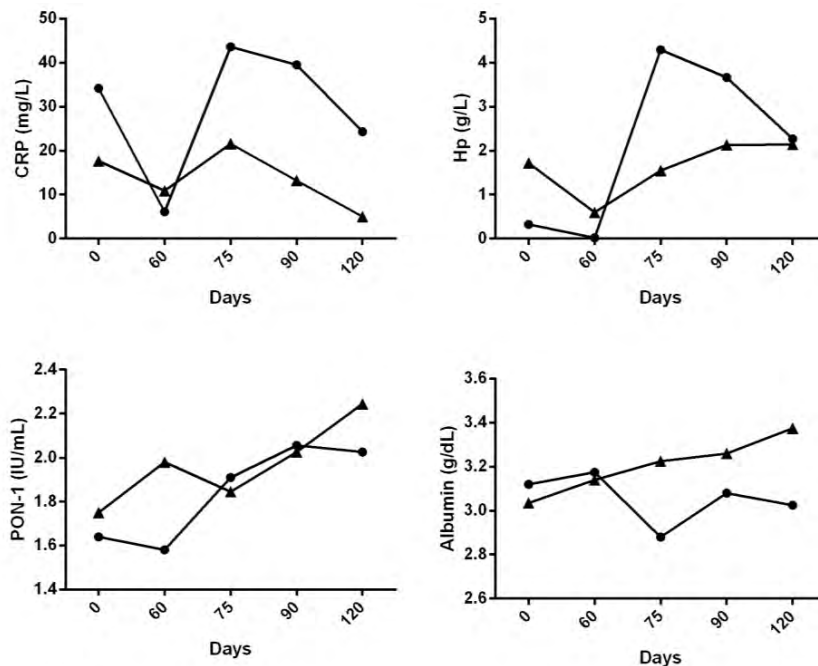


Fig. 2. Median serum C-reactive protein (CRP), haptoglobin (Hp), paraoxonase-1 (PON-1) and albumin in heartworm-infected dogs with low (▲) and high (●) parasite burden during the adulticide treatment.

decreased up to day 120 (5 mg/L). Hp concentrations showed a small decrease on day 60, followed by a significant increase on day 75 (2.47 g/L). Then the values remained stable up to day 120. Progressive but not significant increases were observed in PON-1 activity and albumin concentration from day 0 to day 120.

The results obtained in the measured APPs in dogs by parasite burden are shown in the Fig. 2. The kinetics of CRP in both groups was similar, with the levels lower in those dogs with low parasite burden. This protein showed an increase on day 75, being significant ($p < 0.05$ compared to day 60) for dogs with high parasite burden. In addition, the levels on day 120 were within reference ranges only in dogs with low parasite burden. Likewise, Hp showed a significant increase ($p < 0.05$ compared to day 60) on day 75 in both groups, being of greater magnitude in animals with high parasite burden. No significant differences were found in albumin and PON-1 when the two groups were evaluated separately although a decrease of albumin values was observed in dogs with high burden on day 75.

4. Discussion

The present study evaluates the concentration of some APPs in dogs infected by *D. immitis* during different stages of the adulticide treatment with ivermectine, doxycycline and melarsomine (American Heartworm Society, 2014). The results showed an increase in the concentrations of CRP, and a decrease in haptoglobin and

PON-1 concentrations in infected dogs before stating the treatment, which is in agreement with the results of a previous report which related these changes with the vascular inflammation and possibly hemolysis caused by the presence of the parasite (Méndez et al., 2014).

After the treatment with doxycycline and ivermectine (day 60) the decrease experienced in CRP levels could reflect a reduction of the vascular inflammation, caused by the elimination of the bacteria *Wolbachia*, and by the reduction of microfilariae (Carretón et al., 2013a, 2013b). Therefore, reducing the vascular inflammation prior the adulticide therapy could reduce the arterial lesions caused by the death of the parasites, as suggested by other authors (Kramer et al., 2011).

On the other hand, the marked increase in CRP and Hp on day 75 could be due to pulmonary inflammation and thromboembolism caused by the post-adulticide death of the worms (McCall et al., 2008; Carretón et al., 2013b; American Heartworm Society, 2014). Pulmonary thromboembolism caused by the death of the parasites is inevitable; since the degree of the severity is frequently difficult to objectively assess due to the lack of specific symptoms and diagnostic tests, the measurement of CRP and Hp could be of support in the monitoring of the animals during the treatment.

When dogs were separately evaluated based on the parasite burden, it was observed that on day 0 the dogs with high burden showed greater alterations in CRP levels, which may be increased due to inflammation, and in Hp

levels, which may be decreased due to hemolysis (Méndez et al., 2014). These findings suggest that the magnitude of the changes in APPs concentrations could be influenced by the parasite burden. Furthermore, the maximum peaks of CRP and Hp reached by these dogs on day 75 were twice the peaks reached by the dogs with low parasite burden. Carretón et al. (2013b) described evidences of greater post-adulticide pulmonary thromboembolism in dogs with high parasite burden compared with dogs with low burden; thus, the evaluation of CRP and Hp could be a resource of support to evaluate the magnitude of the post-adulticide complications as well. However, the results are limited by the low number of animals included in the present study and further research should be carried out increasing the number of evaluated subjects to confirm this observation.

At the end of the study (day 120), there is a significant decrease in CRP concentrations compared to the results of day 0. Also, a significant increase in Hp is observed as well. Apparently, as the pathology disappears, there is an improvement in the concentrations of the APPs. However, when compared by parasite burden, the results showed that dogs with high parasite burden presented CRP concentrations above reference ranges on day 120. This may be because 1 month after the last injection of adulticide, thromboembolic processes are still occurring in dogs with high parasite burden (Carretón et al., 2013b).

In conclusion the evaluation of the APPs concentrations indicate a slight improvement after the treatment against *Wolbachia* and microfilariae, characterized by a decrease of CRP and Hp. Afterwards, following the adulticide treatment with melarsomine a rise of Hp and CRP is observed and finally a tendency to return to reference values is detected. Also, the results may indicate greater anomalies in these APPs in dogs with high parasite burden. Therefore, the measurement of CRP and Hp could be a supportive test to monitor the dog during the adulticide treatment of *D. immitis*.

Acknowledgements

This research was partially supported by Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información, Gobierno de Canarias, Spain (co-financed by FSE funds).

References

- American Heartworm Society, 2014. Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs (2014). Available at: <http://www.heartwormsociety.org> (accessed 06.12.14).
- Caldin, M., Tasca, S., Carli, E., Bianchini, S., Furlanello, T., Martínez-Subiela, S., Cerón, J.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., Morchón, R., González-Miguel, J., Juste, M.C., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A., 2013a. Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Vet. Parasitol.* 197, 244–250.
- Carretón, E., Morchón, R., González-Miguel, J., Simón, F., Juste, M.C., Montoya-Alonso, J.A., 2013b. 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., Montoya-Alonso, J.A., 2012. *Dirofilariosis cardiopulmonar canina*. In: Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E. (Eds.), *Dirofilariosis: Pautas de manejo clínico*. Multimédisca Ediciones Veterinarias, Barcelona, Spain, pp. 1–130.
- Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Juste, M.C., Méndez, 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.
- Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Martínez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* 34, 85–99.
- Hise, A.G., Gillette-Ferguson, I., Pearlman, E., 2004. The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in filarial disease. *Cell. Microbiol.* 6, 97–104.
- 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., Dzimirski, M.T., Supakorndej, P., Mansour, A.M., Supakorndej, N., McCall, S.D., McCall, J.W., 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.
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Cerón, J.J., 2003. Critical differences of acute phase proteins in canine serum samples. *Vet. J.* 166, 233–237.
- 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.
- Martínez-Subiela, S., Strauss-Ayali, D., Cerón, J.J., Baneth, G., 2011. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 180, 197–202.
- 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, S., Tvarijonavičiute, A., Cerón, J.J., Montoya-Alonso, J.A., 2014. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* 204, 420–425.
- Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., 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.
- Mylonakis, M.E., Ceron, J.J., Leontides, L., Siarkou, V.I., Martínez, S., Tvarijonavičiute, A., Koutinas, A.F., Harrus, S., 2011. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 811–817.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariosis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 507–544.
- 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.
- Venco, L., Bertazzolo, W., Giordano, G., Paltrinieri, S., 2014. Evaluation of C-reactive protein as a clinical biomarker in naturally heartworm-infected dogs: a field study. *Vet. Parasitol.* 206 (November (1–2)), 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.



and 0

5. CONCLUSIONES



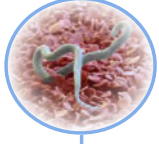
5 CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de una respuesta de fase aguda (con aumentos en la CRP y disminución de la albúmina y PON-1) en perros con *D. immitis*. Los aumentos de CRP fueron más evidentes en los perros con signos clínicos. En las zonas endémicas de dirofilariosis cardiopulmonar, la presencia de un aumento moderado de la CRP y una divergencia en el comportamiento entre la CRP y Hp, en perros, podría ser indicativo de la parasitosis.

2. La evaluación de las concentraciones de PFA después del tratamiento contra la *Wolbachia* y microfilarias, se caracteriza por una disminución de la CRP y Hp. Tras el tratamiento adulticida con melarsomina, se observó un aumento de Hp y CRP y, finalmente, se comprobó una tendencia de las PFA a volver a los valores de referencia. También pudimos determinar una mayor alteración de PFA en perros con alta carga parasitaria. Por ello, la valoración de PFA podría servir de apoyo para valorar al perro parasitado durante el tratamiento de *D. immitis*.

Lorna M.

6. RESUMEN/SUMMARY



Dirofilaria immitis, parásito que reside en las arterias pulmonares del huésped canino, causa una enfermedad grave y potencialmente fatal. Se caracteriza por la formación de endoarteritis pulmonar que posteriormente evolucionará a hipertensión crónica vascular, hipertensión pulmonar e insuficiencia cardíaca congestiva, sucesivamente. Esta reacción fisiopatológica es causada por la respuesta del huésped al parásito en sí, adulto o microfilaria, así como a la bacteria endosimbionte *Wolbachia pipientis*. Por otra parte, durante el tratamiento adulticida, los parásitos mueren y en consecuencia sus fragmentos son liberados provocando tromboembolismos pulmonares, exacerbando la condición clínica y los síntomas.

La respuesta de fase aguda se refiere a una reacción rápida, no específica y compleja, de las Proteínas de Fase Aguda (PFA) en la sangre que son parámetros biológicos que pueden ser medidos de forma objetiva, y permiten evaluar la presencia de los procesos que desencadenan la respuesta de fase aguda o el resultado de un determinado plan terapéutico. En medicina veterinaria, permiten la detección temprana de enfermedades, confirmar casos dudosos, y contribuyen al establecimiento del pronóstico, escoger un tratamiento y evaluar su eficacia.

El objetivo de esta tesis fue, por un lado, evaluar serológicamente las PFA en perros infectados naturalmente con *D. immitis* durante su diagnóstico. Y, por otro, evaluar las concentraciones de diferentes PFA durante el tratamiento adulticida, siguiendo el protocolo recomendado por la American Heartworm Society.

Los resultados obtenidos demostraron una respuesta de fase aguda (con aumentos en la CRP y disminución de la albúmina y PON-1) en perros con *D. immitis*. Los aumentos de CRP fueron más evidentes en los perros con signos clínicos. En las zonas endémicas de dirofilariosis cardiopulmonar, la presencia de un aumento moderado de la CRP y una divergencia en el comportamiento entre la CRP y Hp, en perros, podría ser indicativo de la parasitosis.

En la evaluación de las PFA después del tratamiento contra la *Wolbachia* y microfilarias, se observó una disminución de la CRP y Hp. Tras el tratamiento adulticida con melarsomina, aumentó Hp y CRP y, finalmente, se comprobó una tendencia de las PFA a volver a los valores de referencia. También se determinó una mayor alteración en perros con alta carga parasitaria. Por ello, la valoración de PFA podría servir de apoyo para valorar al perro durante el tratamiento de *D. immitis*.

6 SUMMARY

Dirofilaria immitis, the parasite that resides in the pulmonary arteries of canine host, causes severe and potentially fatal disease. It is characterized by the formation of pulmonary endoarteritis that subsequently evolve chronic vascular hypertension, pulmonary hypertension and congestive heart failure. This pathophysiologic reaction is caused by the host response to parasite itself, adult or microfilaria, and bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Moreover, during the adulticide treatment, parasites die and therefore fragments are released causing pulmonary thromboembolism, exacerbating the clinical condition and the symptoms.

The acute phase response refers to a rapid, non-specific and complex reaction of acute phase proteins (APPs) in the blood that are biological parameters that can be measured objectively, and allow to assess the presence of processes that trigger the acute phase response or outcome of a particular treatment plan. In veterinary medicine, allow early detection of diseases, confirm doubtful cases, and contribute to the establishment of the forecast, choose a treatment and assess its effectiveness.

The aim of this thesis was, on the one hand, serologically evaluate the APPs in naturally infected dogs with *Dirofilaria immitis* during diagnosis. And, secondly, assess

concentrations of different APPs during the adulticide treatment, using the recommended by the American Heartworm Society protocol.

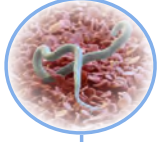
The results show the existence of an acute phase response (with increases in CRP and decreased albumin and PON-1) in dogs with *D. immitis*. CRP increases were most evident in dogs with clinical signs. In endemic areas of cardiopulmonary dirofilariosis, the presence of a moderate increase in CRP and a divergence in behavior between CRP and Hp in dogs may be indicative of the parasitosis.

Evaluating APPs concentrations after *Wolbachia* and microfilariae treatment, it is characterized by a decrease in CRP and Hp. After the adulticide treatment with melarsomine, an increase of Hp and CRP was observed and finally a tendency for APPs to return to baseline values was found. We could also determine a greater alteration of APPs in dogs with high parasite load. Therefore, the assessment of APPs could support to assess the dog during *D. immitis* treatment.



Méndez 14.

7. BIBLIOGRAFÍA



7 BIBLIOGRAFÍA

Abernathy, T.J., Avery, O.T., 1941. The occurrence during acute infection of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effects of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of pneumococcus. J Exp. Med. 73, 173.

Abramowsky, C.R., Powers, K.G., Aikawa, M., Swinehart, G., 1981. *Dirofilaria immitis*. 5. Immunopathology of filarial nephropathy in dogs. Am. J. Pathol. 104,1-12.

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

Aldridge, I.W.N., 1953. Serum esterases Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem. J. 53, 110–117.

Alper, C.A., 1974. Plasma protein measurements as a diagnostic aid. N. Engl. J. Med. 291, 287–290.

American Heartworm Society, 2015. Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs. Disponible en: <http://www.heartwormsociety.com>

Disponible en: <http://www.heartwormsociety.org>. Último acceso: Marzo 10, 2015.

Anderson, H.C., McCarty, M., 1950. Determination of C-reactive protein in the blood as a measure of the activity of the disease process in acute rheumatic fever. *Am. J. Med.* 8, 445-455.

Anderson, R.C., 2000. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. 2nd edition. CABI Publishing, Wallingford, Oxon UK. 650 pp.

Andersson, M., Sevelius, E., 2001. Abnormal microheterogeneity of haptoglobin in serum from dogs with various diseases. *Vet. Record* 148, 14–17.

Araujo, A.M., 1996. Canine and human *Dirofilaria immitis* infections in Portugal. A review. *Parassitologia* 38, 366.

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

Atkins, C., 2011. Heartworm disease in dogs: an update. En: *Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary*

7 BIBLIOGRAFÍA

Congress WSAVA, October 14th-17th, 2011. Jeju, Korea, 162-165 pp.

Atkins, C., Kirk, R., Bonagura, J., 1994. Síndrome de dirofilariosis de la vena Cava. En: Kirk, R., Bonagura, J., (Eds.), *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*, 11th ed., Intermédica, España, 802 pp.

Atkins, C.E., Miller, M.W., 2003. Is there a better way to administer heart worm adulticidal therapy? *Vet. Med.* 98, 310–317.

Atwell, R.B., 1981. Prevalence of *Dirofilaria immitis* microfilariaemia in 6 to 8 week old pups. *Aust. Vet. J.* 57, 479.

Atwell R.B., Buoro BJ, 1988. Caval syndrome. En: Boreman P.F.L., Atwell, R.B., (Eds.), *Dirofilariosis* Boca Raton, CRC Press Inc, 191-203 pp.

Atwell, R.B., Searle, A.C.E., 1989. Therapeutic efficacy of RM340 in pound dogs infected with *Dirofilaria immitis*. En: Otto, G.F. (Ed.), *Proceedings of the Heartworm Symposium '89*. American Heartworm Society, Washington DC, 143-145 pp.

Atwell, R.B., Van Kan, D.M., Cottis, L.E., Blake, A.S., Rylatt, D.B., Wastson, A.R.A., Bundesen, P.G., 1986. The use of antigen test for diagnosis as an indicator of filarial numbers, and for assessing filarial mortality following thiacetarsamide therapy. En: Otto, G.F. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium'86, American Heartworm Society, Washington DC, 71-76 pp.

Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Eroglu, J., Hsu, C., Dunlop, C., La Du, B., 1998. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18, 1617-1624.

Ballou, S.P., Kushner, I., 1992. C-reactive protein and the acute phase response, *Adv. Intern. Med.* 37, 313-336.

Baltz, M.L., De Beer, F.C., Feinstein, A., Munn, E.A., Milstein, C.P., Fletcher, T.C., March, J.F., Taylor, J., Bruton, C., Clamp, J.R., Davies, A.J.S., Pepys, M.B., 1982. Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins. *Annals of the New York Academy of Science* 389,

7 BIBLIOGRAFÍA

Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins. *Annals of the New York Academy of Science* 389, 49-75.

Bandi, C., Anderson, T.J.C., Genchi, C., Blaxter, M., 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc. R. Soc. London B.* 265, 2407–2413.

Bandi, C., McCall, J.W., Genchi, C., Corona, S., Venco, L., Sacchi, L., 1999. Effects on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbiont *Wolbachia*. *Int. J. parasitol.* 29, 357–364.

Barriga, O.O., 1982. *Dirofilariasis*. En: Steele, J.H., Schultz, M.G. (Eds.), *Handbook Series in Zoonoses*, section C. *Parasitic zoonoses*, vol II. CRC Press Inc., USA, 93-110 pp.

Basu, S., Srivastava, P. K., 2000. Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. *Cell Stress Chaper.* 5, 443–451.

Baumann, H., Gauldie, J., 1994. The acute phase response. *Immunol. Today.* 15,74-80.

Bazzocchi, C., Genchi, C., Paltrinieri, S., Lecchi, C.,

Mortarino, M., Bandi, C., 2003. Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria immitis*: the *Wolbachia* surface protein activates canine neutrophils with production of IL-8. *Vet. Parasitol.* 117, 73–83.

Bazzocchi, C., Mortarino, M., Grandi, C., Kramer, L., Genchi, C., Bandi, C., Genchi, M., Sacchi, L., McCall, J.W., 2008. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Int. J. Parasitol.* 38, 1401–1410.

Bazzocchi, C., Comazzi, S., Santoni, R., Bandi, C., Genchi, C., 2007. *Wolbachia* surface protein (WSP) inhibits apoptosis in human neutrophils. *Parasite Immunol.* 29, 73–79.

Bethin, K.E., Vogt, S.K., Muglia, L.J., 2000. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9317-9322.

Blagburn, B.L., Dillon, A.R., Arther, R.G., Butler, J.M., Newton, J.C., 2011. Comparative efficacy of four commercially available heartworm preventive products against the MP3 laboratory strain of *Dirofilaria immitis*. *Vet.*

7 BIBLIOGRAFÍA

Parasitol. 176, 189-194.

Blagburn, B.L., Dillon, A.R., Prichard, R., Geary, T., Mount, J., Land, T., Butler, J., Bourguinat, C., 2010. Characterization of heartworm prevention failures in the central United States. En: Proceeding 13th Triennial Heartworm Symposium, Peabody Hotel, Memphis, TN, April 16-18, 27 pp.

Bowman, D.D., Lynn, R.C., 1999. Georgis' Parasitology for Veterinarians 7th ed., W.B. Saunders, Philadelphia. USA. 415 pp.

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

Bourguinat, C., Keller, K., Schenker, R., Blagburn, B., Prichard, R.K., Geary, T.G., 2010. Investigation of genetic changes in *Dirofilaria immitis* after the use of macrocyclic lactone heartworm preventives. En: Proceeding 13th Triennial Heartworm Symposium, Peabody Hotel, Memphis, TN, April 16-18, 28 pp.

Bourguinat, C., Keller, K., Blagburn, B., Schenker, R., Geary, T.G., Prichard, R.K., 2011. Correlation between loss of

efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype. *Vet. Parasitol.* 176, 374-381.

Bourguinar, C., Lee, A.C.Y., Lizundia, R., Blagburn, B., Liotta, J., Kraus, M., Keller, K., Epe, C., Letourneau, L., Kleinman, C., Paterson, T., Carreton, E., Montoya-Alonso, J.A., Smith, H., Bhan, A., Peregrine, A., Carmichael, J., Drake, J., Schenker, R., Kaminsky, R., Bowman, D., Geary, T., Prichard, R., 2015. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Vet. Parasitol.* 210, 167-178.

Braeckman, L., Bacquer, D.D., Delanghe, J., Claeys, L., Backer, G.D., 1999. Association between haptoglobin polymorphism, lipids, lipoproteins and inflammatory variables. *Atherosclerosis.* 143, 383-388.

Brooks, D.R., Hoberg, E.P., 2007. How will global climate change affect parasite-host assemblages?. *Trends Parasitol.* 23, 571–574.

Burton, S.A., Honor, D.J., Mackenzie, A.L., Eckersall, P.D., Markham, R.J.F., Horney, B.S., 1994. C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. *Am. J.*

7 BIBLIOGRAFÍA

Vet. R. 55, 613-618.

Calvert, C.A., Rawlings, C.A., McCall, J.W., 1999. Canine heartworm disease. En: Fox, P.R., Sisson, D., Moise, S.N. (Eds.), Textbook of canine and feline cardiology. WB Saunders, Philadelphia, 702-726 pp.

Cancrini, G., Gabrielli, S., 2007. Vectors of *Dirofilaria* nematodes, biology, behaviour and host/parasite relationships. En: Genchi, C., Rinaldi, L., and G. Cringoli. (Eds), *Dirofilaria Immitis* and *D. repens* in Dog and Cat and Human Infections, Zagreb: Rolando Editore, pp: 47–58.

Cancrini, G., Magi, M., Gabrielli, S., Arispici, M. Tolari, F. Dell’Omodarme, M., Prati, M.C., 2006. Natural vectors of dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan region, central Italy. J. Med. Entomol. 43, 574–579.

Cancrini, G., Kramer, L., 2001. Insect vectors of *Dirofilaria* spp. En: Simón F., Genchi C. (Eds.), Heartworm infection in humans and animals, Ediciones Universidad de Salamanca, España, 63-82 pp.

Carretón, E., Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A., 2012. *Dirofilariosis* cardiopulmonar canina. En: Montoya-Alonso,

J.A., Carretón, E. (Eds.), *Dirofilariosis: Pautas de manejo clínico*. Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, Spain, pp. 1–130.

Caspi, D., Baltz, M.L., Snel, F., Gruys, E., Niv, D., Batt, R.M., Munn, E.A., 1984. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunol.* 53, 307-313.

Cerón, J.J., Eckersall, P.D., Martínez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats; Current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* 34, 85–99.

Cerón, J.J., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A., 2014. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Vet. R.* 10, 74.

Chang, K.P., Dasch, G.A., Weiss E., 1984. Endosymbionts of fungi and invertebrates other than arthropods. En: Krieg, N. R., Hoolt, J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, 833-836 pp.

Chalifoux, L., Hunt, R.D., 1971. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 158, 602-605.

7 BIBLIOGRAFÍA

Charles H., Courtney, Qi-Yun Zeng. Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariosis, 2001. *Vet. Parasitol.* 94, 199–204.

Cheville, N.F., 1988. Pathogenesis of Acute Inflammation. En: *Introduction to Veterinary Pathology*. (Eds.) Iowa State University Press. USA. 322-329 pp.

Clarke, D., Cost. K., 1983. Use of serum C-reactive protein in differentiating septic from aseptic meningitis in children. *J. Pediatr.* 102, 718–720.

Coles, E.H., 1974. Liver function. En: Coles, E.H. (Eds). *Veterinary clinical pathology*. WB Saunders, Philadelphia, USA. 203–214 pp.

Conner, J.G., Eckersall, P.D., Ferguson J., Douglas, T.A., 1988. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *R. Vet. Sci.* 45, 107-110.

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

Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalia, J., Furlong, C.E., 1996. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet.* 14, 334–336.

Debrah, A.Y., Mand, S., Marfo-Debrekyei, Y., Batsa, L., Albers, A., Specht, S., Klarmann, U., Pfarr, K., Adjei, O., Hoerauf, A., 2011. Macrophilicidal Activity in *Wuchereria bancrofti* after 2 Weeks Treatment with a Combination of Rifampicin plus Doxycycline. *J. Parasitol. Res.*, 201617, Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/201617> Último acceso: Marzo 10, 2015.

Deegan, O., Walshe, K., Kavanagh, K., Doyle, S., 2003. Quantitative detection of C-reactive protein using phosphocholine-labelled enzyme or microspheres. *Anal. Biochem.* 312, 175-181.

Dhainaut, J.F., Mrin, N., Mignon, A., Vinsonneau, C., 2001. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit. Care. Med.* 29, S42-47.

Dillon, R., 2000. Dirofilariosis in dogs and cats. En: Ettingerl, S.J., Feldman, E.C., 2000. *Textbook of veterinary internal*

7 BIBLIOGRAFÍA

medicine. Disease of the dog and cat. 5th ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia. USA.

Dillon, A. R., Brawner, W. R., Hanrahan, L., 1995. Influence of number of parasites and exercise on the severity of heartworm disease in dog. En: Soll, M.D., Knight, D.H. (Eds.), Proceedings of the heartworm Symposium '95, American Heartworm Society, Batavia, Illinois. 113 pp.

Dzimianski, M.T., McTier, T.L., McCall, J.W., 1989. Assessment of filaricidal activity of a new filaricide (RM 340) against immature and adult heartworms using experimental canine nodules. En: Otto, G.F. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium '89. American Heartworm Society, Washington DC, 147-153 pp.

Ebersole. J., Cappelli, D., 2000. Acute phase reactants in infectious and inflammatory diseases. *Periodontol.* 23, 19–49.

Eckersall, P.D., 2008. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias, En: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed. Academic Press, San Diego, USA, 117-155 pp.

Eckersall, P.D., Conner, J.G., Parton, H., 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein. *Vet. Record.* 124, 490-491.

Eckersall, P.D., Conner, J.G., Harvie, J., 1991. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Vet. R. Com.* 15, 17-24.

Eckersall, P.D., Bell R., 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* 185, 23–27

Eckersall, P.D., Duthie, S., Safi, S., Moffatt, D., Horadagoda, N.U., Doyle, S., Parton, R., Bennett, D., Fitzpatrick, J.L., 1999. An automated biochemical assay for haptoglobin: Prevention of interference from albumin. *Comp. Haematol. Internat.* 5, 117-124.

Fiedel, B.A., Simpson, R.M., Gewurz, H., 1982. Effects of C-reactive protein (CRP) on platelet function, En: Kushner, I., Volankis, J.E., Gewurz, H. (Eds.), *C-reactive protein and the plasma protein response to tissue injury*, N.Y. Aca. Sci. 389, New York, 263–273 pp.

Forest, J., Lariviere, F., Dolce, P., Masson, M., Nadeau. L.,

7 BIBLIOGRAFÍA

1986. C-reactive protein as biochemical indicator of bacterial infection in neonatos. *Clin Biochem*, 19, 192–194 pp.

Furlanello, T., Caldin, M., Vezzoni, A., Venco, L., Kitagawa, H., 1998. Patogenesi. En: Genchi, C., Venco, L., Vezzoni, A. (Eds.), *La filariosi cardiopulmonare del cane e del gatto*, Editorial Scivac, Italia, 31-46 pp:

Furlong, C.E., Suzuki, S.M., Stevens, R.C., Marsillach, J., Richter, R.J., Jarvik, G.P., Checkoway, H., Samii, A., Costa, L.G., Griffith, A., Roberts, J.W., Yearout, D., Zabetian, C.P., 2010. Human PON1, a biomarker of risk of disease and exposure. *Chem. Biol. Interact.*, 187, 355–361.

Furtado, A.P., Melo, F.T.V., Giese, E.G., Dos Santos, J.N., 2010. Morphological Redescription of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasitol.* 96, 499–504.

Gabay, C., Kushner, I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340, 448-454. Gallin, J.I., 1989. Inflammation. En: Paul, W.E. (Eds.), *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York. 721-733 pp.

Gallin, J.I., 1989. Inflammation. En: Paul, W.E. (Eds.), *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York. 721-733 pp.

García de Lorenzo y Mateos, A., López Martínez, J., Sánchez Castilla, M., 2000. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva* 24, 353-360.

Genchi, C., Kramer, L.H., Sasser, D., Bandi, C., 2012. Wolbachia and its implications for the immunopathology of filariasis. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. 12, 53–56.

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., Venco, L., Genchi, M., 2007a. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. En: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.),

7 BIBLIOGRAFÍA

Mappe Parassitologiche 8. Rolando Editore, Naples, 137-144 pp.

Genchi, C., Guerrero, J., McCall, J.W., Venco, L. 2007b. Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infections in dogs and cats. 2007. En: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), Mappe Parassitologiche 8. Rolando Editore, Naples. 147-161 pp.

Georgi, J.R., Georgil, M.E., 1994. Parasitología en clínica canina. McGraw-Hill Interamericana, Atlampa. México.

Gershov, D., Kim, S., Brot, N., Elkon, K.B., 2000. C-Reactive Protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an anti-inflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med.* 192, 1353-1364.

Giblett, E.R., 1968. The haptoglobin system. *Ser Haematol* 1, 3-20.

Gómez, M., Rojo, F. A., Guerrero, J., 1999. Filariatosis. 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.

Grandi, G., Quintavalla, C., Mavropoulou, A., Genchi, M., Gnudi, G., Bertoni, G., Kramer, L., 2010. A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). Vet. Parasitol. 169, 347–351.

Grandi, G., Živic̆njak, T., Beck, R., 2007. Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. infections En: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), Mapped Parasitologiche 8. Rolando Editore, Naples, 59-66 pp.

Guedes, M.L.P., 2012. *Culicidae* (Diptera) no Brasil: relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. Oecologia Australis; 16(2), 283-96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2012.1602.07>. Último acceso: Marzo 10, 2015.

Gotschlich, E.C., 1962. Occurrence of a substance analogous to C-reactive protein in acute phase dog sera. Federation Proceedings 21, 14.

Gutteridge, J.M.C., 1987. The antioxidant activity of

7 BIBLIOGRAFÍA

haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 17, 219-223.

Gronroos, J.M. , Forsstrom, J.J., Irjala, K., Nevalainen, T. J., 1994. Phospholipase A2, C-reactive protein, and white blood cell count in the diagnosis of acute appendicitis. *Clin. Chem.*, 40, 1757–1760.

Harada, R.T., Maeda, A., Nakashima, M., Sadakata, M., Ando, K., Yonomine, Y., Otsuji, M., Sato, H., 1970. Electron microscopical studies on the mechanism of oogenesis and fertilization in *Dirofilaria immitis*. En: Sasa M., (Eds.), *Recent Advances in Research on filariasis and schistosomiasis in Japan*, University Press, Baltimore, Md., 99-121 pp.

Harel, M., Aharoomi, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonky, O., Meged, R., 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic cozymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (5), 152-59.

Harvey, J.W., West, C.L., 1987. Prednisone-induced increases in serum alpha2-globulin and haptoglobin concentrations in dogs. *Vet. Pathol.* 24, 90-92

Hellerstein, S., Duggan, E., Welchert, E., Mansour, F., 1982. Serum C-reactive protein and the site of urinary tract infections. *J. Pediatr.* 100, 21–25.

Henry, C.J., 1992. Salivary mucocele associated with dirofilariasis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200, 1965-1966.

Hertig, M., Wolbach, S.B., 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J. Med. Res.* 44, 329–374.

Higgins, M.A., Berridge, B.R., Mills, B.J., Schultze, A.E., Gao, H.G., Searfoss, H., Baker, T.K., Ryan, T.P., 2003. Gene expression analysis of the acute phase response using a canine microarray. *Toxicological sciences* 74, 470-484.

Hiss, S., Mielenz, M., Bruckmaier, R.M., Sauerwein, H., 2004. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. *J. Dairy Sci.* 87, 3778-3784.

Howe, P.E., 1921. The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of protein in blood. *J. Biol. Chem.* 49, 93.

7 BIBLIOGRAFÍA

Ishihara, K., Kitagawa, H., Sasaki, Y., 1990. Efficacy of heartworm removal in dogs with dirofilarial hemoglobinuria using Flexible Alligator Forceps. *Jpn. J. Vet. Sci.* 53, 591-599.

Jacobsen, S., Niewold, T.A., Kornalijnslijper, E., Toussaint, M.J., Gruys, E., 2005. Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 21-31.

James, R.W., 2007. A long and winding road: defining the biological role and clinical importance of paraoxonases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44,1052–1059.

Jordan, M., Otterness, I.G., Ng, R., Gessner, A., Röllinghof, M., Beuscher, H.U., 1995. Neutralization of endogeneous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist, *J. Immunol.* 154, 4081–4090.

Jubb, K., Kennedy, P., Palmer, N., 1992. Pathology of Domestic Animals. 4ta ed. Volumen 3. Editorial Academic Press INC. USA. 68 pp.

Juvonen, T., Kiviniemi, H., Niemela, O., Kairaluoma, M.I., 1992. Diagnostic accuracy of ultrasonography and C-

reactive protein concentration in acute cholecystitis: a prospective clinical study. *Eur. J. Surg.* 158, 365–369.

Katnik, I., Pupek, M., Stefaniak, T., 1998. Cross reactivities among some mammalian haptoglobins studied by a monoclonal antibody. *Comp. Biochem Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 119, 335–340.

Keister, D.M., Dzimianski, M.T., McTier, T.L., McCall, J.W., Brown, J., 1992. Dose selection and confirmation of RM 340, a new filaricide for the treatment of dogs with immature and mature *Dirofilaria immitis*. En: Soll, M.D. (Eds.), *Proceedings of the Heartworm Symposium'92*, American Heartworm Society, Batavia, IL, 225-229 pp.

Khersonsky, O., Tawfik, D.S., 2006. Chromogenic and fluorogenic assays for the lactonase activity of serum paraoxonases. *Chem. Bio. Chem.* 7, 49–53.

Kitagawa, H., Sasaki, Y., Ishiara, K., 1987. Canine *Dirofilaria* hemoglobinuria: changes in right heart hemodynamics and heartworm migration from pulmonary artery toward right atrium following beta-blocker administration. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49, 1081-1086.

7 BIBLIOGRAFÍA

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.

Kittelson, M. D., Kienle. R. D., 2000. Medicina cardiovascular de pequeños animales. 2a ed., Multimédica, Barcelona. España.

Kjelgaard-Hansen, M., Kristensen, A.T., Jensen, A.L., 2003. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. 50,164–168.

Kjelgaard-Hansen, M., Jensen, A.L., Kristensen, A.T., 2003. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. Vet. Clin. Pathol. 32 (2), 81-7.

Knight DH, 1977. Heartworm heart disease. Adv. Vet. Sci. Comp. Med 21, 107-149.

Knight, D., 1994. Should every heartworm-infected dog be

treated with an adulticide? Vet. Med. 89, 620-628.

Knight, D.H., 1995. Guideline for diagnosis and management of heart worm (*Dirofilaria immitis*) infection. En: Bonagura, J.D., (Ed.), Kirk's Current Veterinary Therapy XII, Small Animal Practice, WB Saunders Co, Philadelphia, Pennsylvania, 879-887 pp.

Knight, D.H., 2004. Heartworm infection. En: Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats, fourth ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, 517-526 pp.

Kotani, T., Powers, K.G., 1982. Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. Am. J. Vet. Res. 43, 2199-2206.

Kozek, W.J., Figueroa, M., 1977. Intracellular bacteria in *Oncocerca vulvulus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26, 663-678.

Kozek, W.J., 1977. Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. J. Parasitol. 63, 992-1000.

Kozek, W.J., 2005. What is new in the *Wolbachia* *Dirofilaria* interaction? Vet. Parasitology. 133, 127-132.

7 BIBLIOGRAFÍA

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. Parasitolo.* 133, 133–136.

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

Kumar, V., Abbas, A.K, Aster, J.C. 2105. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* 9 ed. Elsevier Health Sciences . pp1464 Kushner, I., Mackiewicz, A., 1993. The acute phase response: an overview. En: *Acute phase protein, molecular*

biology, biochemistry and clinical applications. Mackiewicz, A., Kushner, I., Baumawn, H. CDC Press. London. 3-19.

Lavoipierre, M.M.J., Clark, J., 1974. Studies on filariasis. III. *Dirofilaria immitis*: Emergence of infective larvae from the mouthparts of *Aedes aegypti*. J. Helminthol. 48, 221-224.

Lee, C.C., 1975. *Dirofilaria immitis*: ultrastructural aspects of oocyte development and zygote formation. Exp. Parasitol. 37, 449-468.

Licastro, F., Candore, G., Lio, D., Porcellini, E., Colonna-Romano, G., Franceschi, C., Caruso, C., 2005. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. Immun. Ageing. 2, 8.

Lichtenfelds, J.R., Pilitt, P.A., Kotani, T., Powers, K.G., 1985. Morphogenesis of developmental stages of *Dirofilaria immitis* (Nematoda) in the dog. Proceeding Helminthology Society, Washington. 52, 98-113.

Liu, S.K., Das, K.M., Tashjian, R.J., 1966. Adult *Dirofilaria immitis* in the arterial system of adog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 148, 1501-1507.

7 BIBLIOGRAFÍA

Lok, J.B., 1988. *Dirofilaria* sp: taxonomy and distribution. En: *Dirofilariasis*. Boreham P.F.L., Atwell R.B. (Eds.), CRC Press, Boca Raton Florida, 249 pp.

Losonsky, J.M., Thrall, D.E., Lewis, R.E., 1983. Thoracic radiographic abnormalities in 200 dogs with heartworm infestation. *Vet. Radiol.* 24, 120-123.

Mackiewicz, A., 1997. Acute phase proteins and transformed cells, *Int. Rev. Cytol.* 170, 225–300.

Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N., 1999. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*; 286, 152-154.

MacLeod, C.M., Avery, O.T., 1941. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. II. Isolation and properties of the C-reactive protein and its differentiation from normal blood proteins, *J. Exp. Med.* 73-183.

Makimura, S., Suzuki, N., 1982. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Jap. J. Vet. Sci.* 44,15–21.

Male, D.K., Champion, B., Cooke, A., Owen, M., 1991. Cell traffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. 2ª ed. Ed Gower London-New York .

Mandelker, L., Brutus, R.L., 1971. Feline and canine dirofilarial encephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 159, 776.

Manfredi, M.T., Di Cerbo, A., Genchi, M., 2007. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats, p 39 – 47. En: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Ed.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. *Mappe parassitologiche*, 8. Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy. p. 39 – 45.

Mantovani, A., Jackson, R.F., 1966. Transplacental transmission of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. *J. Parasitol.* 52, 116.

Marcus, A., Rothschild, M.D., Murray, O., Schreiber, S.S., 1998. *Hepatology*. 8, 385–401.

Martinelli, N., Consoli, L., Girelli, D., Grison, E., Corrocher, R., Olivieri, O., 2013. Paraoxonases: ancient substrate hunters and their evolving role in ischemic heart disease. *Adv. Clin. Chem.* 59, 65–100.

7 BIBLIOGRAFÍA

Marquardt, W.C., Demaree, R.S., Grieve, R.B., 2000. Parasitol. Vect. Biol. Harcourt Academic Press, USA, 702 pp.

Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Parra, M.D., Cerón, J.J., 2001. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina Veterinaria. An. Vet. (Murcia) 17, 97-114.

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 [in Spanish]. Arch. Med. Vet. 37, 61–66.

Martínez-Subiela, S., Ginel, P.J., Cerón, J.J., 2004. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. Vet. Record 154, 814– 817.

Maudsley, S., Pepys, M.B., 1987. Immunochemical cross-reactions between pentraxins of different species. Immunol. 62, 17-22.

Mazur, A., 1946. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. J. Biol. Chem. 164, 271-289.

McCall, J.W., 1998. Recerca e dati sperimentali. En: Genchi, C., Venco, L., Vezzoni, A. (Eds.), La filariosi cardiopulmonare del cane e del gatto, Editorial Scivac, Italia, .47-54pp.

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

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., 2008b. Heartworm and *Wolbachia*: Therapeutic implications. *Vet. Parasitol.* 158, 204-214.

Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N., 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides on low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286, 152–154.

MacLeod, C.M., Avery, O.T., 1941. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. II. Isolation and properties of the C-reactive protein and its differentiation from normal blood proteins, *J. Exp. Med.* 73,183.

7 BIBLIOGRAFÍA

McGreevy, P.B., Theis, J., Lavoipierre, M.M.Y. Clark, J., 1974. Studies on filariasis. III. *Dirofilaria Immitis*: Emergence of infective larvae from the mouth parts of *Aedes aegypti*. J. Helmintol. 48, 221-224.

McGrotty, Y.L., Knottenbelt, C.M., Ramsey, I.K., Reid, S.W., Eckersall, P.D., 2004. Evaluation of a rapid assay for canine C-reactive protein. Veterinary Record 154, 175-176.

Mclaren, D.A., Worms, M.J., Laurence, B.R., Simpson, M.G., 1975. Micro-organisms in filarial larvae (nematode). Trans R Soc. Trop. Med. Hyg. 69, 509-514.

McTier, T.L., McCall, J.W., Dzimianski, M.T., Mansour, A.E., Jernigan, A., Clark, J.N., Plue, R.E., Daurio, C.P., 1992. Prevention of heartworm infection in cats by treatment with ivermectin at one month post-infection. En: Soll, M.D. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium'92, American Heartworm Society, Batavia, IL, 111-116 pp.

Miettinen, A.K., Heinonen, P.K., Laippala, P., 1993. Test performance of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessing the severity of acute pelvic inflammatory disease. Am. J. Obstet. Gynecol. 169, 1143-1149.

Miller, M.W., 1999. Filariosis cardiaca. En: MORGAN, R. V. (Ed.), Clínica de pequeños animales. 3a ed. Harcourt Brace, Madrid. España.

Miller, M.W., Keister, D.M., Tanner, M.S., Meo, N.J., 1995. Clinical efficacy of melarsomine dihydrochloride (RM 340) and thiacetarsamide in dogs with moderate (class 2) heartworm infection. En: Soll, M.D., Knight, D.H. (Eds.), Proceedings of the Heartworm Symposium 1995. American Heartworm Society, 233–241 pp.

Miyamoto, T., Takahashi, Y., Oohashi, T., Sato, K., Oikawa, S., 2005. Bovine paraoxonase 1 activities in serum and distribution in lipoproteins. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 243–248.

Mogarekar, M.R., Talekar, S.J., 2013. Serum lactonase and arylesterase activities in alcoholic hepatitis and hepatitis B. *Indian J. Gastroenterol.* 32, 307–310.

Mominoki, K., Nakagawa-Tosa, N., Morimatsu, M., Syuto, B., Saito, M., 1995. Haptoglobin in Carnivora: a unique molecular structure in bear, cat and dog haptoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.* 110B, 785–789.

7 BIBLIOGRAFÍA

Montoya, J.A., Morales, M., Ferrer, O., Molina, J.M., Corbera, J.A., 1998. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996). Vet. Parasitol. 75, 221-226.

Montoya, J.A., Morales, M., Juste, M.C., Corbera, J.A., 2007. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs: current update in Spain. En: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), Mapped Parassitologiche 8. Rolando Editore, Naples, pp.175-180.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., 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., 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.

Morchón R., Bazzocchi, C., López-Belmonte, J., Martín-Pacho, J.R., Kramer, L.H., Grandi, G., Simón, F., 2007. iNOsexpression is stimulated by the major surface protein (WSP) from *Wolbachia* symbiont bacteria of *Dirofilaria immitis* in a murine model of immunization. *Parasitol. Int.* 56, 71–75.

Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J., Mellado-Hernández, I., 2012a. Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe. New Distribution Trends. *Frontal. Physiol.* 3, 196.

Morchón, R., Carretón, E., Grandi, G., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., Genchi, C., Kramer, L.H., 2012b. Anti-Wolbachia Surface Protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 17-20.

Morchón R, González-Miguel, J., Mellado, I., Velasco, S., Rodríguez-Barbero, A., Simón, F., 2010. Adult *Dirofilaria immitis* excretory/secretory antigens upregulate the production of prostaglandin E2 and downregulate monocyte transmigration in an "in vitro" model of

7 BIBLIOGRAFÍA

endothelial cell cultures. *Vet. Parasitol.* 170, 331-335.

Morchón, R., Moya, I., González-Miguel, J., Montoya, M.N., Simón, F., 2010. Zoonotic *Dirofilaria immitis* infections in a province of Northern Spain. *Epidemiol. Infect.* 138, 380-383.

Morini, S., Venco, L., Fagioli, P., Genchi, C., 1998. Surgical removal of heartworms versus melarsomine treatment of naturally-infected dogs with risk of thromboembolism. In Seward, L., Ed. *Proceedings of the American Heartworm Symposium '98*. American Heartworm Society, Batavia, IL, 235-240 pp.

Motta, S., Letellier, C., Ropert, M., Motta, C., Thiébault, J.J., 2009. Protecting effect of vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in sedentary dogs as assessed by erythrocyte membrane fluidity and paraoxonase-1 activity. *Vet.* 181, 288-295.

Muller, W.A., 2002. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab. Invest.* 82, 521-533.

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.

Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 168, 28-40.

Murata, H., Miyamoto, T., 1993. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. *Br. Vet. J.* 149, 277-283.

Mustard, R.A., Bohnen, J.M.A., Haseeb, S., Kasina, R., 1987. C-reactive protein levels predict postoperative septic complications. *Arch. Surg.* 122, 69-73.

Nelson, G.S., Heish, R.B., Furlong, M., 1962. Studies in filariasis in East Africa. II. Filarial infections in man, animals and mosquitoes on the Kenya Coast. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 56, 202-217.

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. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*D. immitis*) infection in dogs. *Vet. Parasitol.* 133, 255-266.

7 BIBLIOGRAFÍA

Novak, F., Vavrova, L., Kodydkova, J., Novak, F., Hynkova, M., Zak, A., Novakova, O., 2010. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clin Exp Med.* 10, 21–25.

Onishi, T., Inokuma, H., Ohno, K., Soeda, S., Noguchi K., Sasaki, K., 2000. C-reactive protein concentrations in normal and diseased dogs - measured by laser nephelometric immunoassay. *J. J. Vet. Med. Assoc.* 53, 595-601.

Orihel, T.C., 1961. Morphology of the larval stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *J. Parasitol.* 47, 251-262.

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.

Parra, M.D., Martinez-Subiela, S., Tuomola, M., 2002. Evaluation of different monoclonal antibodies against human CRP in a TR-FIA for determination of canine CRP. In *Proceedings of the Third Meeting of Acute Phase Proteins.* Doorn, The Netherlands, 2002, 70 pp.

Patton, O.S., Garner, F.M., 1970. Cerebral infarction caused

by heartworm (*Dirofilaria immitis*) in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156, 600-605.

Pepys, M.B., 1981. C-reactive protein fifty years on. Lancet, 1, 653–657.

Pepys, M.B., Baltz M.L., 1983. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (Pentaxins) and serum amyloid A protein, Adv. Immunol. 34, 141–212.

Peribáñez, M.A, Lucientes, J., Arce, S., Morales, M., Castillo, J.A., Gracia, M.J., 2001. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP. Vet. Parasitol. 102, 173-175.

Peters, T., 1977. Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. Clin. chem, 23, 5-12.

Peters, T.Jr., 1995. All About Albumin Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. 1a Edición. San Diego, California: Academic Press. ISBN: 978- 0-12-552110-9.

7 BIBLIOGRAFÍA

Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Vet. R.* 35, 163–187.

Polonovski, M., Jayle, M.F., 1939. Peroxidases animales. Leur spécificité et leur rôle biologique. *Bull. Chim. Biol.* 66-91.

Pou-Barreto, C., Quispe-Ricalde, M:A.; Morchón, R., Vázquez, C., Genchi, M., Postigo, I., Valladares, B., Simón, F., 2018. Galectin and aldolase-like molecules are responsible for the specific IgE response in humans exposed to *Dirofilaria immitis*. *Parasite. Immunol.* 30, 596-602.

Rawlings, C.A., 1986. Heartworm disease in dogs and cats. WB Saunders Co, Philadelphia, 325.

Rawlings, C.A., Bowman, D.D., Howerth, E.W., Stansfield, D.G., Legg, W., Luempert, L.G., 2001. Response of dogs treated with ivermectin or milbemyacin starting at various intervals after *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Ther.* 2, 193-207.

Rawlings, C.A., Calvert, C.A., 1995. Heartworm disease.

En: Ettinger, S.J., Feldman, F.C. (Eds.), Textbook of Veterinary Internal Medicine, Diseases of the Dog and Cat. , 4th ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 1046–1068 pp.

Rawlings, C.A., Calvert, C.A., 1997. Verminosis cardiaca. En: Ettinger, S.J., Feldman, E.C., 1997. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. 4a ed., Intermédica, Buenos Aires. Argentina.

Rawlings, C.A., Dawe, D.L., McCall, J.W., Keith, J.C., Prestwood, A.K., 1982. Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 180, 1323- 1326.

Rawlings, C.A., McCall, J.W., 1996. Melarsomine: A new heartworm adulticide compound. Continuing Education 18, 373-379.

Rawlings, C.A., Tonelli, Q., Lewis, R., Duncan, J.R., 1993. Semiquantitative test for *Dirofilaria immitis* as a predictor of thromboembolic complications associated with heartworm treatment in dogs. Am. J. Vet. Res. 54, 914-919.

Raynes, J.G., Eagling, S., McAdam, K.P., 1991. Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cells: Differential

7 BIBLIOGRAFÍA

regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. *Clin. Exp. Immunol.* 83, 488-491.

Riley, R.F., Coleman, M.K., 1970. Isolation of C-reactive proteins of man monkey, rabbit and dog by affinity chromatography on phosphorylated cellulose. *Clin. Chim. Acta* 30, 483-496.

Riley, R.F., Zontine, W., 1972. Further observations on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. *J. Lab. Clin. Medi.* 80, 698-703.

Robey, F.A., Liu, T.Y., 1981. Limulin: a C-reactive protein from *Limulus polyphemus*. *J. Biol. Chem.* 256, 969-975.

Romi, R., 2001. *Aedes albopictus* in Italia, un problema sanitario sottovaluato. *Ann. Ist. Super. Sanita* 37, 241-247.

Sacchi, L., Corona, S., Casiraghi, M., Bandi, C., 2002. Does fertilization in the filarial nematode *Dirofilaria immitis* occur through endocytosis of spermatozoa? *Parasitol.* 124, 87-95.

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, 09–214 pp.

Saini, P.K., Webert, D.W., 1991. Application of reactants during antemortem and postmortem meat inspection, J. Am. Vet. Med. Assoc. 198, 1898–1901.

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.

Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S.C., Dinarello, C.A., 1990. Correlations and interactions in the production of Interleukin-6 (IL-6), IL-1 and Tumor Necrosis Factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF, Blood 75, 40–47.

Schrey, C. F.; Trautvetter, E., 1998. *Dirofilariosis canina y felina* – diagnóstico y tratamiento. Waltham Focus. 8 (2), 23-30.

Silverman, L.M., Christenson, R.H., 1994. Aminoacids and

7 BIBLIOGRAFÍA

proteins. En: Burtis, C.A., Ashwood E.R. (Eds), Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2nd edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia. 707-708 pp.

Simón, F., Morchón, R., González, J., 2009. Dirofilariosis canina en La Coruña. Argos 106, 10-12.

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

Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Di Sacco, B., Damiani, G., Genchi, C., 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in filarial worms. Mol. Biochem. Parasitol. 74, 223–227.

Skovgaard, K., Mortensen, S., Boye, M., Poulsen, K.T., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Heegaard, P.M., 2009. Rapid and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs. Vet. Research 40, 23.

Slatko, B.E., Taylor, M.J., Foster, J.M., 2010. The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. Symbiosis

51(1), 55–65.

Slocombe, J.O.D., Surgeoner, G.A., Srivastava, B., 1989. Determination of the heartworm transmission period and its use in diagnosis and control. En: Otto, G.F. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium '89. American Heartworm Society, Washington DC, 19–26 pp.

Slonka, G.F., Castleman, W., Krum, S., 1977. Adult heartworms in arteries and veins of a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 170, 717-719.

Smithies, O., Walker, N.F., 1955. Genetic control of some serum proteins in normal humans. Nature 176, 1265-1266.

Smith, R.P., Lipworth, B.J., Cree, I.A., Spiers, E.M., Winter, J.H., 1995. C-reactive protein, a clinical marker in community-acquired pneumonia. Chest, 108, 1288–129.

Solter, P., Hoffmann, W.E., Hungerford, L.L., Sielgel, J.P., St Denis, S.H., Dorner, J.L., 1991. Haptoglobin and Ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. Am. J. Vet. Res. 52: 1738-1742.

Song, K.H., Hayasaki, M., Choliq, C., Cho, K.W., Han, H.R.,

7 BIBLIOGRAFÍA

Jeon, M.H., Park, B.K., Kim, D.H., 2002. Immunological responses of dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. J. Vet. Sci. 3, 104-109.

Soulsby, E.J.L., 1987. Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los animales domésticos. 7ª ed.- Interamericana. México.

Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A., N.W. Bunnett, N.W., 2000. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. Nature Med. 6, 151–158.

Sternby, B., O'Brien, J.F., Zinsmeister, A.R., DiMagno, E.P., 1996. What is the best biochemical test to diagnose acute pancreatitis? A prospective clinical study. Mayo Clin. Proc, 71, 1138–114 pp.

Stokol, T., Tarrant, J.M., Scarlett, J.M., 2001. Overestimation of canine albumin concentration with the bromcresol-green method in heparinized plasma samples. Vet. Clin. Pathol. 30, 170–178.

Storz, J., 1971. Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases. Charles C. Thomas, Springfield, IL, 358 pp.

Suffredini, A.F., Fantuzzi, G., Badolato, R., Oppenheim, J.J., O'Grady, N., 1999. New insights into the biology of the acute phase response, J. Clin. Immunol. 19, 203–214.

Tagata, K., Yokoyama, S., Ginbo, T., 1996. Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. Vet. Res. Commun. 20, 21–30.

Tamarozzi, F., Tendongfor, N., Enyong, P.A., Esum, M., Faragher, B., Wanji, S., Taylor, M.J., 2012. Long term impact of large scale community- directed delivery of doxycycline for the treatment of onchocerci- asis. Parasit. Vectors 5 (53) <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/53>

Taylor, M.J., Bandi, C., Hoerauf, A., 2005. *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. Adv. Parasitol. 60, 248–286.

Teiber, J.F., Draganov DI, La Du, B., 2003. Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. Biochem. Pharmacol. 66, 887–896.

7 BIBLIOGRAFÍA

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

Turk, R., Juretić, D., Geres, D., Svetina, A., Turk, N., Flegar-Mestrić, Z., 2008. Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 108, 98–106.

Tvarijonaviciute, A., Cerón, J.J., Holden, S.L., Morris, P.J., Biourge, V., German, A.J., 2012a. Effects of weight loss in obese cats on biochemical analytes related to inflammation and glucose homeostasis. Domest. Anim. Endocrinol. 42,129–141.

Tvarijonaviciute, A., Kocaturk, M., Cansev, M., Tecles, F., Cerón, J.J., Yilmaz, Z., 2012b Serum butyrylcholinesterase and paraoxonase 1 in a canine model of endotoxemia: effects of choline administration. Res. Vet. Sci. 93, 668–674.

Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Caldin, M., Tasca, S., Cerón, J.J., 2012c. Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 (PON1) measurements in the dog. Am. J. Vet. R. 73, 34–41.

Tillet ,W.S., Francis T., 1930. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of Pneumococcus, J. Exp. Med. 52, 561–571.

Uni, S., Takada, S., 1986. The longitudinal cuticular markings of *Dirofilaria immitis* adult worm. Japan J Parasitol 35 (3): 191-199.

Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W., 2001. Parasitología Veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza. España.

Valentine, A., Smeak, D., Allen, D., Mauterer, J., Minihan, A., 1996. Spontaneous Pneumothorax in Dogs. Cont. Educ. Pract. Vet. 18, 53-63.

Venco, L., 1993. Approccio diagnostico alla sindrome della vena cava. Veterinaria, SCIVAC Ed. Cremona, Italia. 7 11-18 pp.

Venco, L., 2007. heartwormof (*Dirofilaria immitis*) disease in dog. En: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), Mappede Parassitologiche 8. Rolando Editore, Naples, 118-125 pp.

Venco L, Genchi C, Simón F. 2011. La filariosis

7 BIBLIOGRAFÍA

Parassitologiche 8. Rolando Editore, Naples, 118-125 pp.

Venco L, Genchi C, Simón F. 2011. La filariosis cardiopulmonar (*Dirofilaria immitis*) en el perro. En: Simón, F., Genchi, C., Venco, L., Montoya, M.N., (Ed.), La filariosis en las especies domésticas y en el hombre. Merial Laboratorios, Barcelona, España. 19–60 pp.

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. En: Seward, R.L., Knight, D.H. (Eds.), Recent Advances in Heartworm Disease, Symposium'01. American Heartworm Society, Batavia, IL, 111–124 pp.

Venco, L., McCall, J. W., Guerrero, J., Genchi, C., 2004. Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infection in dogs. Vet. Parasitol. 124, 259-268.

Venco, L., Mihaylova, L. Boon, J.A., 2015. 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, 231–240 pp.

Volanakis, J.E., 1982. Complement activation by C-reactive protein complexes, En: Kushner I., Volanakis, J.E., Gewurz, H. (Eds.), *C-reactive protein and the plasma protein response to tissue injury*, The New York Academy of Science 389, New York, 235–250 pp.

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

Wagener, F.A., Eggert, A., Boerman, O.C., Oyen, W.J., Verhofstad, A., Abraham, N.G., Adema, G., Van Kooyk, Y., De Witte, T., Figdor, C.G., 2001. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 98, 1802–1811.

7 BIBLIOGRAFÍA

Weidmeyer, C.E., Solter, P.F., 1996. Validation of human haptoglobin immunoturbidimetric detection of haptoglobin in equine and canine serum and plasma. *Vet. Clin. Pathol.* 25,141–146.

Weiner, D.J., Aguirre, G., Dubielzig, R., 1980. Ectopic-site filarid infection with immunologic follow-up of the host. En: *Proceedings of the Heartworm Symposium '80*. Otto, G.F. (Ed.), Am. Heart. Soc. Bonner Springs, KS, 51-54.

Whicher, J.T., Westacott, C.I., 1992. The acute phase response. En: Whicher JT, Evans SW, (Eds). *Biochemistry of Inflammation*. London: Kluwer Academic. 243–272.

Yamamoto, S., Tagata, K., Nagahata, H., Ishikawa, Y., Morimatsu, M., Naiki, M., 1992. Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30, 329-339.

Yamamoto, S., Tagata, K., Otabe, K., Shida, T., 1993. Serum levels of C-reactive protein in dogs and simple techniques for its measurement. *Journal of the Japan Vet. Med. Assoc.* 46, 870-873.

Yamamoto, S., Shida, T., Okimura, T., Otabe K., Honda, M.,

Ashinda, Y., Furukawa, E., Sarikaputi, M., Naiki, M., 1994. Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. *Vet. Quarterly* 16, 74-77.

Yang, F., Haile, D.J., Berger, F.G., Herbert, D.C., Van Beveren, E., Ghio, A.J., 2003. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am. J. Physiol. – L. Cell Mol. Physiol.* 284, L402–409.

Young, N.M., Williams, R.E., 1978. Comparison of the secondary structures and binding sites of C-reactive protein and the phosphorylcholine-binding murine myeloma proteins. *J. Immunol.* 121, 1893-1898.

Zouki, C., Beauchamp, M., Baron, C.M., Filep, J.G., 1997. Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein, *J. Clin. Investig.* 100, 522–529.



8. CURRÍCULUM VITAE



FORMACIÓN ACADÉMICA

Título Homologado a Licenciada en Veterinaria por el Ministerio de Educación del Gobierno de España mediante ACUERDO de fecha 21 de abril de 2010, del título de **Doctora en Ciencias Veterinarias**, Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias, San Lorenzo, Paraguay.

Master Universitario en Clínica e Investigación Terapéutica, 2010-2011. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPCG), Facultad de Veterinaria.

Personal Investigador en Formación (PIF) becada por la Agencia Canaria de Investigación, innovación y sociedad de la información (ACIISI), durante el periodo 2011-2015.

Obtención Del Certificado de Promotor de la Innovación, Nivel I del programa de Formación de Gestores en la Innovación. Noviembre de 2011. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPCG), Fundación Universitaria y Gobierno de Canarias.

Obtención Del Certificado de Agente de la Innovación, Nivel II del programa de Formación de Gestores en la

Innovación. Diciembre de 2011. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPCG), Fundación Universitaria y Gobierno de Canarias.

Obtención del Diploma en Estudios Avanzados (DEA), en el programa de Doctorado de Clínica e investigación terapéutica. 2011-2012. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPCG), Facultad de Veterinaria.

VENIA DOCENDI

Venia Docendi en Patología General y Patología y clínica de animales exóticos y salvajes. Concedida por el Vicerrector de Profesorado y Planificación académica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, para el curso académico 2012-2013.

Venia Docendi en Patología General y Patología y clínica de animales exóticos y salvajes. Concedida por el Vicerrector de Profesorado y Planificación académica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, para el curso académico 2013-2014.

ESTANCIA

Departamento de Medicina y Cirugía, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia (españa). Junio-julio (2013).

PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES INDEXADAS

Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Juste, M.C., Méndez, J.C., Montoya-Alonso, J.A. 2014. Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in the assessment of the severity of canine dirofilariosis. *Veterinary Parasitology*. 206. pp 1-2.

Montoya-Alonso, J.A., Cabrera-Pedrero, E.D., Carretón, E., Méndez, J.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F., 2011. Seroprevalence of human dirofilariosis on the island of Gran Canaria, Canary Islands-Spain. *Trop. Med. Int. Health* 16, 229.

REVISTAS NO INDEXADAS

Simón-Martín, F., Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., González-Miguel, J., Méndez, J., Carretón, E., 2012. Dirofilariosis animal y humana: una enfermedad en expansión. *Profesión veterinaria* 17, 16-28.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Montoya-Alonso, J.A., Cabrera-Pedrero, E.D., Carretón, E., Méndez, J.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F. Seroprevalence of human dirofilariosis on the island of Gran Canaria, canary islands, Spain. 7th European Congress on Tropical Medicine & International Health. 3-6 Octubre 2011. Barcelona (España). Poster.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Méndez, J.C., Juste, M.C. *Dirofilaria immitis* en las islas Canarias (España). International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Ponencia.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Méndez, J.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F. Evolución de la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en la población canina y felina en la isla

8 CURRÍCULUM VITAE

de Gran Canaria (2008-2011). International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

Montoya-Alonso, J.A., Cabrera-Pedrero, E.D., Carretón, E., Méndez, J.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F. *Dirofilaria immitis* en los carnívoros, un factor de riesgo zoonótico en la isla de Gran Canaria. International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

Carretón, E., Méndez, J.C., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Variation of cardiopulmonary biomarkers and other metabolic parameters during adulticide treatment in dogs with heartworm disease. Third European *Dirofilaria* Days. 21-22 Junio 2012. Parma (Italia). Comunicación oral.

Méndez Aimone, J.C., Pérez Acosta, P., Carretón Gómez, E., Montoya Alonso, J.A. Prevalencia de *D. immitis* en podenco canario en la isla de La Palma (islas canarias - España). II Congreso de Veterinarios de Canarias. 30 Noviembre-1 Diciembre 2012. Gran Canaria (España). Comunicación oral.

Carretón Gómez, E., Méndez Aimone, J.C., Juste de Santa Ana, M.C., Montoya Alonso, J.A. Valores de proteína C-reactiva en perros con dirofilariosis cardiopulmonar. II Congreso de Veterinarios de Canarias. 30 Noviembre-1 Diciembre 2012. Gran Canaria (España). Comunicación oral.

Méndez Aimone, J.C., Carreton Gomez, E., Montoya Alonso, J.A. Evaluación del perfil de coagulación en perros con dirofilariosis cardiopulmonar. Southern European Veterinary Conference. 48 Congreso Nacional AVEPA-SEVC. 17-19 Octubre de 2013. Barcelona (España). Poster

Méndez Aimone, J.C., Dirofilariosis el Gato: Diagnóstico y tratamiento. V Congreso Veterinario Especialistas en Pequeños Animales. Asunción (Paraguay). 11, 12 y 13 de Octubre de 2014.

Méndez Aimone, J.C., Pautas para el diagnóstico, prevención y Tratamiento de la dirofilariosis cardiopulmonar canina. V Congreso Veterinario Especialistas en Pequeños Animales. Asunción (Paraguay). 11, 12 y 13 de Octubre de 2014.

CAPÍTULOS DE LIBROS Y MONOGRAFÍAS

Méndez, J., Carretón, E., Montoya Alonso, J.A., 2012. Dirofilariosis cardiopulmonar felina. En: Montoya-Alonso JA, Carretón E (Eds.), Dirofilariosis. Pautas de manejo clínico, Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, España, pp. 131-158.

Montoya-Alonso, J.A., Mendez, J.C., García-Guasch, L., Carretón-Gomez, E, 2013. Dirofilariosis felina: enfermedad pulmonar asociada. *Canis et Felis* 120, 78-88.

ACTIVIDADES DE DIVULGACIÓN

La filaria en perros y gatos. Organizado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción, 14 y 15 de Octubre de 2014. San Lorenzo (Paraguay).

Estudio de las Proteínas de Fase Aguda en perros con Dirofilariosis cardiopulmonar. Organizado por el Vicerectorado de Investigación de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 28 y 29 de Marzo de 2015. Gran Canaria (España).

