



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Avaliação das alterações hematológicas e bioquímicas e eficácia das lactonas macrocíclicas em associação com tetraciclina no tratamento de cães naturalmente infectados com *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856)

NADINE LOUISE NICOLAU DA CRUZ

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C957a Cruz, Nadine Louise Nicolau da
Avaliação das alterações hematológicas e bioquímicas e eficácia das lactonas macrocíclicas em associação com tetraciclinas no tratamento de cães naturalmente infectados com *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) / Nadine Louise Nicolau da Cruz. – 2017.
60 f. : il.

Orientador: Leucio Camara Alves.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife,
BR-PE, 2017.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Dirofilariose 2. Hematologia 3. Diagnóstico I. Alves, Leucio
Camara, orient. II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Avaliação das alterações hematológicas e bioquímicas e eficácia das lactonas macrocíclicas em associação com tetraciclinas no tratamento de cães naturalmente infectados com *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856)

NADINE LOUISE NICOLAU DA CRUZ

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2017

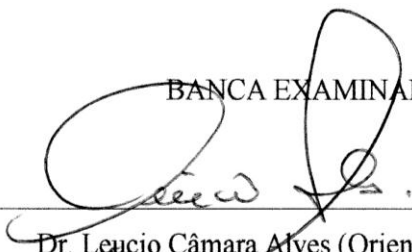
NADINE LOUISE NICOLAU DA CRUZ

Avaliação das alterações hematológicas e bioquímicas e eficácia das lactonas macrocíclicas em associação com tetraciclina no tratamento de cães naturalmente infectados com *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856)

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biociência Animal.

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:



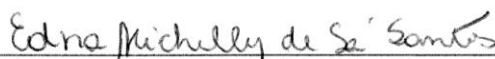
Dr. Leucio Câmara Alves (Orientador)
Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE



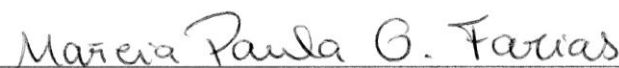
Dr. Rafael Antônio Nascimento Ramos
Professor Adjunto da Unidade Acadêmica de Garanhuns - UAG



Dra. Lorena Adão Vescovi Séllos Costa
Médica Veterinária Radiologista - UFRPE



Dra. Edna Michelly de Sá Santos
Professora Adjunta do Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE



Dra. Márcia Paula de Oliveira Farias
Professora Adjunta do *Campus* Professora Cinobelina Elvas - UFPI

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo meu coração a Carlos Alberto e a Elsa Maria, meus amados pais, e meu sobrinho Pedro, pelo apoio, força e incansável amor que me dedicam, sempre recarregando minhas energias nos momentos mais difíceis.

A minha querida Nidiane Rocha pelo “incentivo” a fazer o doutorado, pela paciência, apoio e companhia em tantos momentos da minha vida.

Agradeço a meu orientador Dr. Leucio Câmara Alves pela orientação, ensinamentos, paciência e carinho que sempre teve comigo.

A todos os colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), pela ajuda e coleguismo, particularmente Lorena por dividir o projeto comigo, Victor por trazer motivação com seu entusiasmo, Irma, Ingrid, Marcia Paula, Sandra, Luciana, Raphael Lepold por fazer o lindo desenho do ciclo e Edna pelos momentos divertidos no decorrer do mestrado e doutorado.

A toda equipe do Focus Centro de Diagnóstico Veterinário, em especial a Thaiza que me aguentaram tantos meses na realização dos exames de imagem.

A toda equipe do Laborvet que com muito carinho me ensinou e guiou por novos caminhos, e ajudou na execução de todos os exames hematológicos, principalmente a Paola Teles minha amada mestra.

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao curso de Pós Graduação em Biociência Animal pela oportunidade de realização do doutorado, e a CAPES pela concessão de bolsa, tornando possível a efetivação deste trabalho.

RESUMO

Dirofilaria immitis é um nematódeo responsável por infecção cardiopulmonar em caninos e felinos. No Brasil tem sido relatado um número crescente de cães infectados, entretanto a maioria deles não apresentam sinais clínicos aparentes, porém alterações laboratoriais podem ser encontradas. Sendo os exames complementares essenciais, junto com o histórico e exame físico, para a avaliação do estado clínico do animal antes do tratamento aduítico. O único tratamento reconhecido é o dicloridrato de melarsomina, porém além de causar tromboembolismo nos animais tratados não se encontra disponível no mercado brasileiro, levando alguns autores a estudar tratamentos alternativos, utilizando tetraciclina e lactonas macrocíclicas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas, além da eficácia das lactonas macrocíclicas em associação com tetraciclina em cães naturalmente infectados com *D. immitis*. Para avaliação hematológica foram analisados 51 animais sorologicamente positivos, domiciliados, de ambos os sexos, sem critério racial, idade superior a seis meses, negativos para hematozoários no exame parasitológico, bem como animais que não fizeram uso de doxiciclina e lactonas macrocíclicas nos últimos seis meses. Todos foram submetidos ao exame parasitológico, onde foram divididos em grupos microfilarêmicos e amicrofilarêmicos. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram interpretados baseados nos valores de referência. Dos 51 animais, 35,3% (18) eram microfilarêmicos e 64,7% (33) amicrofilarêmicos. Em ambos os grupos foi observado microcitose, eosinofilia e hiperproteinemia sem diferenças estatísticas. Os monócitos estavam dentro dos valores de referência, porém apresentaram diferença estatística entre os grupos, com maior quantidade no grupo microfilarêmico, além disso, foi encontrado trombocitopenia apenas no grupo amicrofilarêmico com diferença estatística. Entretanto a média dos valores bioquímicos estavam dentro dos valores de normalidade e sem diferenças estatísticas entre os grupos. Para a realização do tratamento foram utilizados seis cães, provenientes do atendimento ambulatorial do Hospital Veterinário da UFRPE, destes 50% fêmeas, todos de raças variadas e adultos. Foram avaliados do ponto de vista clínico, submetidos ao exame sorológico SNAP® 4DX, teste rápido DPP® para Leishmaniose Visceral Canina, e pesquisa parasitológica de hematozoários e microfíliarias circulantes. Os animais foram submetidos ao protocolo de tratamento com doxiciclina na dose de 5mg/kg a cada 12 horas durante 30 dias, e posteriormente ivermectina na dose de 0,006mg/kg uma vez por mês, por tempo indeterminado. Para avaliação da eficácia do tratamento foram realizadas avaliações clínicas e laboratoriais nos momentos zero, seis meses e doze meses pós tratamento. Além disso, em todos os momentos foram realizados exames hematológicos e bioquímicos e a cada seis meses testes sorológico e parasitológico para detecção de antígenos e microfíliarias circulantes, respectivamente. De acordo com o exposto, pode-se concluir que os valores hematológicos e bioquímicos são fundamentais pois fornecem ao clínico veterinário subsídios importantes para avaliar as condições clínicas, estágio da doença e prognóstico, auxiliando a definir a melhor conduta terapêutica. Além disso, os resultados do protocolo de tratamento mostraram que a associação utilizada levou a morte de parasitos adultos e microfíliarias, contudo apenas 50% dos animais foram negativos para antígenos circulantes ao final dos 12 meses de tratamento.

ABSTRACT

Dirofilaria immitis is a nematode responsible for cardiopulmonary infection in canine and feline. In Brazil, a growing number of infected dogs have been reported, however, most of them do not show any apparent clinical signs, but laboratory changes can be found. The complementary exams are essential, together with the historic and physical examination, for the evaluation of the clinical state of the animal before adulticide treatment. The only recognized treatment is melarsomine dihydrochlorid, but in addition to causing thromboembolism in treated animals is not available in the Brazilian market, leading some authors to study alternative treatments using tetracyclines and macrocyclic lactones. Thus objective of this work was to evaluate the hematological and biochemical alterations, besides the efficacy of the macrocyclic lactones in association with tetracyclines in dogs naturally infected with *D. immitis*. We analyzed 51 serologically positive animals, domiciled, of both sexes, without racial criteria, more than six months of age, negative for hematozoas in parasitological examination, as well animals that have not used doxycycline and macrocyclic lactones in the last six months. All were submitted to parasitological examination, where they were divided into microfilaremic and amicrofilaremic groups. Hematological and biochemical parameters were interpreted based on reference values. Of the 51 animals, 35.3% were microfilaremic and 64.7% were amicrofilaremic. In both groups, was observed microcytosis, eosinophilia and hypoproteinemia without statistical differences. The monocytes were within the reference values, but showed a statistical difference between the groups, with a greater amount in the microfilaremic group, and the thrombocytopenia was found only in the amicrofilaremic group with statistical difference. However the average of the biochemical values were within normal values and without statistical differences between the groups. For the treatment, six dogs were used, from the ambulatory care of the Veterinary Hospital in UFRPE, of these 50% females, all of them of varied races and adults. They were evaluated from the clinical point of view, submitted to the serological examination SNAP® 4DX, DPP® rapid test for Visceral Canine Leishmaniasis, and parasitological research for hematozoas and circulating microfilariae. The animals were submitted to treatment protocol with Doxycycline at a dose of 5mg / kg every 12 hours for 30 days, and thereafter ivermectin at a dose of 0.006mg / kg once a month for an indeterminate time. Clinical and laboratory evaluations were performed to evaluate the efficacy of the treatment in moments zero, six months and twelve months post treatment. In addition, hematological and biochemical tests were performed at all times and every six months serological and parasitological tests for the detection of circulating antigens and microfilaria, respectively. Accordingly, it can be concluded that the hematological and biochemical values are fundamental because they provide the clinical veterinarian important subsidies to evaluate the clinical conditions, stage of the disease and prognosis, helping to define the best therapeutic behavior. In addition, the results of the treatment protocol showed that the association used led to the death of adult and microfilaria parasites, but only 50% of the animals were negative for circulating antigens at the end of the 12 months of treatment.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO.....	11
2.2. CICLO BIOLÓGICO.....	12
2.3. DISTRIBUIÇÃO DA DIROFILARIOSE NO BRASIL.....	14
2.4. FISIOPATOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS.....	15
2.5. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS.....	17
2.6. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	18
2.7. TRATAMENTO.....	19
2.8. TRATAMENTO CIRÚRGICO.....	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
4. OBJETIVOS	31
4.1. OBJETIVO GERAL	31
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
CAPÍTULO I- AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CÃES COM INFECÇÃO POR <i>Dirofilaria immitis</i>	32
RESUMO	33
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	35
2.2. ÁREA DE ESTUDO E ANIMAIS.....	35
2.3. ANÁLISES LABORATORIAIS.....	35
2.4. ANÁLISE DE DADOS.....	36
3. RESULTADOS	36
4. DISCUSSÃO	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

Tabela 1. Resultados dos parâmetros hematológicos dos grupos microfilarêmicos e amicrofilarêmicos naturalmente infectados por <i>Dirofilaria immitis</i> provenientes do litoral de Pernambuco.....	43
--	----

Tabela 2. Resultados dos parâmetros bioquímicos dos grupos de cães microfilarêmicos e amicrofilarêmicos naturalmente infectados por <i>Dirofilaria immitis</i> provenientes do litoral de Pernambuco.....	44
--	----

CAPÍTULO II- EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E IVERMECTINA NO TRATAMENTO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM <i>Dirofilaria immitis</i>	45
--	----

RESUMO	46
---------------------	----

ABSTRACT	46
-----------------------	----

1. INTRODUÇÃO	47
----------------------------	----

2. MATERIAL E MÉTODOS	48
------------------------------------	----

2.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	48
---------------------------	----

2.2. ANIMAIS DE ESTUDO.....	48
-----------------------------	----

2.3. PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	49
-----------------------------------	----

2.4. ANÁLISES LABORATORIAIS.....	49
----------------------------------	----

3. RESULTADOS	50
----------------------------	----

4. DISCUSSÃO	52
---------------------------	----

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
--	----

Tabela 2. Tabela dos parâmetros hematológicos de cães naturalmente infectados submetidos ao protocolo de tratamento com associação de doxiciclina e ivermectina nos momentos M0, M6 e M12.....	59
---	----

Tabela 3. Tabela dos parâmetros bioquímicos de cães naturalmente infectados submetidos ao protocolo de tratamento com associação de doxiciclina e ivermectina nos momentos M0, M6 e M12.....	60
---	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Classificação do grau dos sinais clínicos na dirofilariose canina (AHS, 2014)	16
--	----

CAPÍTULO I

Tabela 1. Resultados dos parâmetros hematológicos dos grupos microfilarêmicos e amicrofilarêmicos naturalmente infectados por <i>Dirofilaria immitis</i> provenientes do litoral de Pernambuco.....	43
--	----

Tabela 2. Resultados dos parâmetros bioquímicos dos grupos de cães microfilarêmicos e amicrofilarêmicos naturalmente infectados por <i>Dirofilaria immitis</i> provenientes do litoral de Pernambuco.....	44
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Pesquisa de microfíliarias circulantes através do método modificado de Knott ^a e pesquisa de antígeno circulante no ensaio imunoenzimático em cães naturalmente infectados com <i>D. immitis</i> tratados com a combinação de doxiciclina e ivermectina.....	51
--	----

Tabela 2. Tabela dos parâmetros hematológicos de cães naturalmente infectados submetidos ao protocolo de tratamento com associação de doxiciclina e ivermectina nos momentos M0, M6 e M12.....	59
---	----

Tabela 3. Tabela dos parâmetros bioquímicos de cães naturalmente infectados submetidos ao protocolo de tratamento com associação de doxiciclina e ivermectina nos momentos M0, M6 e M12.....	60
---	----

1. INTRODUÇÃO

A dirofilariose canina é a principal causa de cardiopatia adquirida em todos os membros da família Canidae (NELSON et al., 2005), cujo agente etiológico é um nematódeo filarídeo, *Dirofilaria immitis*, transmitido por culicídeos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (CDC, 2012). Apesar de ter o cão como seu hospedeiro definitivo, por vezes o gato e o homem, outros mamíferos como raposas, focas, cavalos, ursos e lontras (MAR et al. 2002; McCALL et al., 2008b, SILVA; LANGONI, 2009) podem também ser infectados (MORCHÓN et al., 2012; OTRANTO et al., 2011; FALIDAS et al., 2016).

Sendo considerada de grande importância na clínica veterinária de pequenos animais por causar alterações patológicas, incluindo lesões cardiovasculares, pulmonares, hepáticas e renais (PAES-DE-ALMEIDA et al., 2003; PASCA et al., 2012; JANG et al., 2015), com graves complicações que podem levar o animal a morte (SIMÓN et al., 2014). Apresenta-se distribuída em todos os continentes, principalmente nos trópicos, subtropicais e zonas temperadas (BAUTISTA et al., 1998; MCCALL; GUERRERO, 2010).

O diagnóstico da dirofilariose canina pode ser realizado pela detecção de microfírias circulantes, através de técnicas parasitológicas (AHS, 2014; MAGNIS et al., 2013), além da pesquisa de antígenos circulantes por meio de técnicas sorológicas (SILVA; LANGONI, 2009; SÍMON et al., 2012).

Entretanto, alguns autores relatam que exames laboratoriais podem ser utilizados como marcador de infecção (ATKINS, 2010) ou no monitoramento da infecção, prognóstico e planejamento terapêutico, bem como a evolução do animal frente ao tratamento de escolha (NIWETPATHOMWAT et al., 2007). Porém são escassos os trabalhos relatando as alterações hematológicas e bioquímicas em cães infectados com *D. immitis* e sua importância no diagnóstico da infecção.

Por outro lado, o tratamento convencional da dirofilariose é realizado pela aplicação do hidrocloreto de melarsomina (AHS, 2014) e posterior tratamento microfilaricida com lactonas macrocíclicas (LABARTHE; ALVES; SERRÃO, 2002). Contudo em áreas onde não há a disponibilidade deste fármaco, surge como opção de tratamento a utilização das lactonas macrocíclicas em associação com tetraciclina (BAZZOCCHI et al., 2008; McCALL et al., 2008a, 2008b; GRANDI et al., 2010).

Tendo em vista o aumento da casuística da dirofilariose canina na clínica de pequenos animais, além da falta de informação dos médicos veterinários sobre diagnóstico, prognóstico e tratamento, que contribui para uma alta morbidade e mortalidade dos cães infectados, este estudo teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas, bem como a eficácia das lactonas macrocíclicas em associação com tetraciclinas em cães naturalmente infectados com *Dirofilaria immitis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A classificação sistemática do helminto está bem documentada por Furtado e colaboradores (2010).

Reino: Animalia

Filo: Nematoda

Classe: Secernentea

Subclasse: Spiruria

Ordem: Spirurida

Superfamília: Filaroidea Weiland (1958)

Família: Onchocercidae Leiper (1911)

Subfamília: Dirofilarinae Sandground (1921)

Gênero: *Dirofilaria* Railliet; Henry (1911)

Espécie: *Dirofilaria immitis* Leidy (1856)

D. immitis é um nematódeo alongado, com estrias transversais na superfície do corpo, extremidade cefálica levemente fina e arredondada, de cor branca que pode medir até 31 cm de comprimento. Os machos distinguem-se das fêmeas pelo seu menor tamanho (12 a 20 cm) e porque a sua extremidade posterior termina em espiral. Nas fêmeas a vulva encontra-se atrás do esófago, a extremidade caudal é arredondada e não enrolada em espiral. O ânus, tanto na fêmea como no macho, está em posição subterminal (TROTTI et al., 1996; BAUTISTA et al., 1998; FURTADO et al., 2010). As fêmeas são vivíparas e eliminam microfilárias para a circulação medindo aproximadamente 308 x 7 µm, sem bainha, fusiformes, com a extremidade cefálica mais estreita que o corpo e com a cauda longa, pontiaguda e reta (LOK, 1988; SONG et al., 2009).

Muitos filarídeos, incluindo *D. immitis*, abrigam bactérias intracelular obrigatórias, gram-negativas, endo-simbióticas pertencentes ao gênero *Wolbachia* (Rickettsiales) (KOZEK, 2005; TAYLOR et al., 2005), que se localizam nos cordões longitudinais de todos os indivíduos desta espécie e no trato reprodutivo das fêmeas (oogonias, oócitos, embriões) (BANDI; TREES; BRATTING, 2001). Desta forma, as microfilárias já são liberadas na circulação infectadas por *Wolbachia sp.* (KOZEK, 2005).

A importância da relação simbiótica que existe entre a bactéria do gênero *Wolbachia* e diversas espécies de filarídeos tem sido muito relatada (KOSEK, 2005), pois além da sua presença ser indispensável para o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência da *D. immitis* (BANDI, 2001; KOSEK, 2005), tem um papel importante na patogênese e na resposta imune frente à infecção por filarídeos, principalmente pela resposta imunoinflamatória/imunomoduladora do hospedeiro contra uma proteína de superfície (WSP-*Wolbachia* Surface Protein) (KRAMER et al., 2003; SIMON et al., 2007).

2.2 CICLO BIOLÓGICO

D. immitis possui um ciclo biológico (Fig. 1) com uma duração relativamente longa, variando entre os sete e os nove meses (AHS, 2014). Apresenta cinco fases de desenvolvimento larval tendo um hospedeiro intermediário, atuando como vetor, e um hospedeiro definitivo vertebrado (GENCHI et al., 2009). O gênero *Dirofilaria* é o único, na família Onchocercidae, cujas larvas desenvolvem-se em tubos de Malpighi de mosquitos da família Culicidae (SYMES, 1960; WALTERS; LAVOPIERRE, 1982; SAUERMAN; NAYAR, 1983). Apesar de poder infectar várias espécies de mamíferos (BAUTISTA et al., 1998; ATKINS, 2010; McCALL; GUERRERO, 2010), apenas os canídeos são considerados como hospedeiro definitivo e reservatório (VENCO et al., 2008).

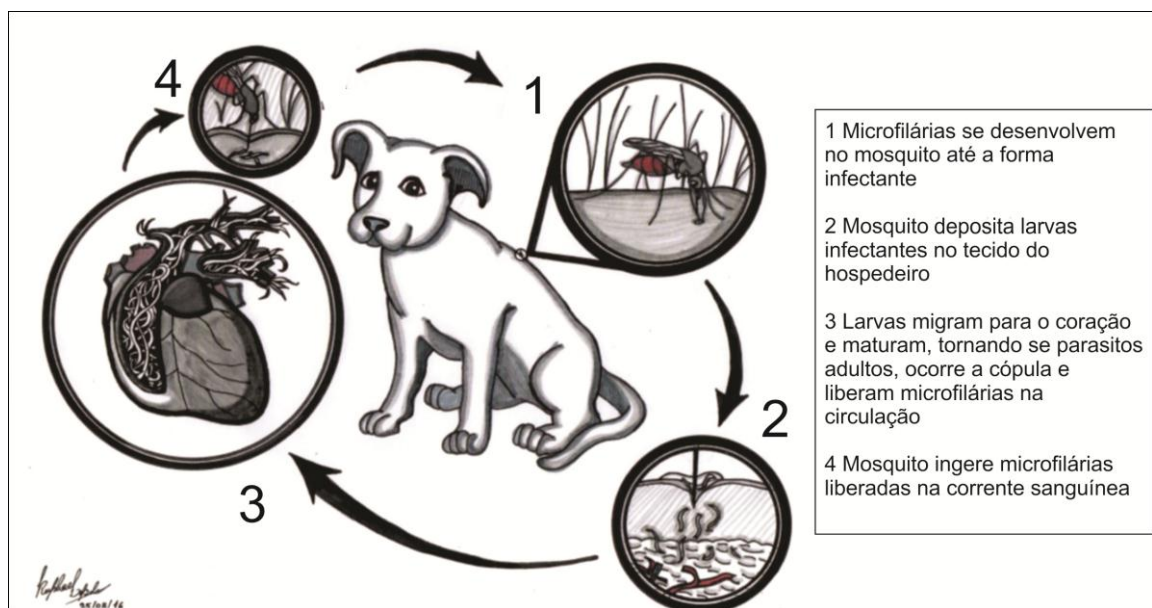


Figura 1. Ciclo de vida do nematódeo *D. immitis* (AHS, 2014)

Na ocasião do repasto sanguíneo em um hospedeiro microfilarêmico, os culicídeos suscetíveis tornam-se infectados, nestes a Larva 1 (L1) invade os túbulos de Malpighi, em seguida, muda para o estágio Larval 2 (L2) e em seguida para larva de terceiro estágio (L3) ou Larva Infectante (TAYLOR, 1960). Posteriormente a L3 migra pela hemocele para os espaços cefálicos e peças bucais, para no momento do repasto sanguíneo migrar ativamente pela probóscide, sendo depositada na pele e posterior penetração no tecido subcutâneo do hospedeiro vertebrado (ABRAHAM, 1988). O tempo necessário do desenvolvimento de L1 a L3 no mosquito é temperatura-dependente, sendo ideal com temperatura de 27°C e humidade relativa de 80%, ocorrendo entre 10 a 14 dias, sendo este tempo maior em temperaturas mais baixas (KARTMAN, 1953; SLOCOMBE et al, 1989; AHS, 2014).

Os vetores da dirofilariose são mosquitos da família Culicidae (AHID; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999). Entretanto, das mais de 70 espécies com capacidade de se infectar com *D. immitis*, (OTTO; JACHOWSKI, 1981; CANCRINI et al., 1995; VEZZANI et al., 2011; BOCKOVÁ et al., 2015), apenas os gêneros *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta* e *Coquilletidia* tem sido identificados como potenciais vetores, embora a competencia vetorial somente foi comprovada em algumas espécies (CANCRINI; KRAMER, 2001; CANCRINI, 2006; FERREIRA et al., 2015).

Desta forma, as espécies mais eficientes na transmissão do parasito são as que se reproduzem ativamente durante todo o ano e fazem pelo menos dois repastos sanguíneos diários, bem como os que moderam a invasão do nematódeo, permitindo o desenvolvimento de um número limitado de larvas compatível com sua sobrevivência, por meio de mecanismos próprios de defesa (CANCRINI; GABRIELLI, 2007).

No hospedeiro vertebrado, em três ou quatro dias passam ao quarto estágio (L4) e migram para outros tecidos subcutâneos, adiposos e musculares, onde mudam novamente para o quinto estágio larval (L5) (ABRAHAM, 1988; KNIGHT, 1987). Após 70 a 110 dias aproximadamente, a larva L5 completa a migração somática dentro do tórax do hospedeiro atingindo o sistema vascular e perfurando as veias periféricas, chegando até as artérias pulmonares e ventrículo direito (HOCH; STRICKLAND, 2008; SIMÓN et al., 2012). É ainda no estágio L5 que podem surgir migrações erráticas, mais comuns em felinos domésticos com destaque para localizações no sistema nervoso central (BOWMAN et al., 2002).

Dentro de três meses os nematódeos atingem a maturidade sexual (190 dias após a infecção), após a cópula, as fêmeas começam a liberar microfilárias na circulação do hospedeiro vertebrado, que pode ocorrer por mais de cinco anos (FLYNN, 1973; KETTLE,

1995; SCHREY; TRAUTVETTER, 1998; LOK; WALKER; SCOLES, 2000). As microfilárias são encontradas na circulação periférica aproximadamente seis meses após a infecção e aí podem sobreviver por até dois anos e meio (UNDERWOOD; HARWOOD, 1939).

Apesar da presença de microfilárias no sangue ser imprescindível para a perpetuação da espécie, infecções podem cursar sem a presença de microfilárias circulantes, podendo ocorrer em 20 a 30% dos casos (GRIEVE et al., 1986; NELSON et al., 2005a; RAWLINGS et al., 1982). Esse fenômeno ocorre nas infecções unisexuais, terapêutica microfilaricida, resposta imune do hospedeiro e infecção pré-patente (RAWLINGS et al., 1982; GRIEVE; LOK; GLICKMAN, 1983; LOK; WALKER; SCOLES, 2000; NELSON et al., 2005a;).

2.3 DISTRIBUIÇÃO DA DIROFILARIOSE NO BRASIL

A epidemiologia da dirofilariose canina vem sofrendo mudanças na distribuição e prevalência, quando comparada a década passada, levando a um aumento significativo principalmente nas áreas costeiras (LABARTHE et al., 2014). Diversos fatores, como alterações climáticas e o aquecimento global que propiciam a proliferação dos vetores (GENCHI; RINALDI; GENCHI, 2010); a mudança do ambiente pela densificação humana; o aumento de deslocamentos de animais de companhia e abandonados; as resistências aos inseticidas e a redução do controle e prevenção da dirofilariose devido a problemas econômicos (LABARTHE et al., 2014).

No Brasil, a infecção canina por *D. immitis* foi reportada em diferentes estados por Barbosa e Alves (2006) encontrando prevalência nacional de 9,1% a 10,2% na dependência do método diagnóstico utilizado. Contudo Labarthe e colaboradores em 2014 encontraram prevalência de 23,1% por meio de exames sorológicos, indicando um aumento significativo na prevalência nacional. A frequência encontrada na região Nordeste foi de 29,7% com as duas maiores cidades da região, Salvador e Recife exibindo altas taxas, com 20 e 36,7%, respectivamente, em áreas menos antropizadas (LABARTHE et al., 2014).

Na região Centro-Oeste, há relato de 0,41% pelo método de Knott e 11,81% por meio de Immunoblot, em Cuiabá-MT (FERNANDES et al., 2000). Na região Norte, 10,7% pelo Knott modificado em Belém-PA (SOUZA; BENIGNO; FIGUEIREDO, 1997); 61,8% pelo Knott, 67,6% pelo método da gota espessa e 73,5% pelo ELISA na Ilha de Marajó-PA

(GARCEZ et al., 2006); e 12,5% pelo método da gota espessa em Coari-AM (SILVA et al., 2008).

Na região Sul, foi observado uma prevalência de 13,2% (LABARTHE et al., 2014), na região Sudeste, encontrou-se 26,3% de prevalência e no Nordeste 29,7%, todos pelo teste imunocromatográfico (LABARTHE et al., 2014).

2.4 FISIOPATOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A gravidade das lesões e as consequentes manifestações clínicas que delas se originam estão relacionadas com o número relativo de nematódeos adultos, assim como a duração da infecção e a interação hospedeiro-parasito (ATKINS, 2010; MORCHON et al., 2010). Animais com cargas parasitárias mais elevadas, geralmente apresentam doença vascular pulmonar mais grave e hipertensão pulmonar mais severa do que animais levemente parasitados (CALVERT et al., 1999; COCCHIARO, 2008).

A ação traumática das L5, nas artérias pulmonares, bem como a liberação de fatores tóxicos e o desencadeamento de mecanismos imunológicos, originam alterações no endotélio da vasculatura pulmonar (GOMES, 2009), ocorrendo descamação do endotélio com exposição do subendotélio, estimulando a adesão e ativação de plaquetas e aderência de neutrófilos e macrófagos ativados. Em seguida, abaixo das áreas desprovidas de endotélio, há produção de colágeno e células musculares lisas que formam projeções, seguindo de reendotelização e formação de vilosidades (RAWLINGS; CALVERT, 1989; GERRERO, 2005). As artérias tornam-se rugosas e apresentam trajetos tortuosos, alterando o fluxo sanguíneo, levando ao aumento da permeabilidade do endotélio permitindo a saída de proteínas séricas e fluido plasmático para o interstício perivascular, levando a alterações pulmonares parenquimatosas tais como hiperemia, edema e inflamação (RAWLINGS; CALVERT, 1989; SIMÓN et al., 2012).

As alterações endoteliais parenquimatosas e a própria presença de *D. immitis* na artéria pulmonar, gera aumento progressivo da pós-carga, dilatação ventricular direita e, no caso de hipertensão pulmonar grave, hipertrofia ventricular direita, levando a um quadro de insuficiência cardíaca (CALVERT; RAWLINGS, 2002; LOMBARD, 1987). Pneumonite eosinófila foi descrita com maior frequência em dirofilarioses ocultas quando a destruição imunomediada de microfilárias na microcirculação pulmonar produz amicrofilaremia (MORCHON et al., 2007; OLEAGA et al., 2009). Os parasitos mortos e suas partículas

originam tromboembolismo pulmonar e infarto que podem levar a óbito (GUERRERO, 2005; MEIRELES et al., 2014).

As situações patológicas pulmonares crônicas resultam geralmente em fibrose pulmonar (KITTLESON, 1999). Imunocomplexos que se formam em resposta aos antígenos do parasito (OLEAGA et al., 2009) podem induzir glomerulonefrite nos animais infectados acompanhada de proteinúria e, mais raramente, insuficiência renal (PAES-DE-ALMEIDA et al., 2003; ARESU et al., 2007). A lesão hepática pode ocorrer como resposta à insuficiência cardíaca direita, que pode ser observado no painel bioquímico dos animais (BAUTISTA et al., 1998; PAES-DE-ALMEIDA et al., 2003).

À medida que a carga parasitária aumenta, os nematódeos começam a se alojar no ventrículo direito, deste modo, cães com mais de 40 helmintos são mais propensos a desenvolver a síndrome da veia cava, onde os parasitos adultos realizam uma migração retrógrada das artérias pulmonares para o ventrículo direito, átrio e veia cava, comprometendo a função da válvula tricúspide (ISHIHARA et al., 1978; ATWELL, BUORO, 1988; AHS, 2014), que associada a hipertensão pulmonar leva a regurgitação sanguínea e aumento da pressão venosa central (CALVERT et al., 1999; COCCHIARO, 2008).

O animal pode apresentar hemoglobinemia, hemoglobinúria, anemia normocítica normocrômica, podendo chegar ao óbito entre 24 e 72 horas por choque cardiogênico, complicado por anemia, acidose metabólica ou coagulação vascular disseminada (KITOH et al., 2001; CALVERT, THOMASON, 2008).

Tabela 1. Classificação do grau dos sinais clínicos na dirofilariose canina (AHS, 2014)

SINAIS CLÍNICOS	GRAU
Assintomático ou apresenta tosse	Leve
Tosse, intolerância ao exercício, presença de sons anormais nos pulmões	Moderado
Tosse, intolerância ao exercício, dispneia, sons anormais no coração e nos pulmões, hepatomegalia, síncope, ascites, morte	Severo
Aparecimento súbito de letargia e fraqueza, acompanhado de hemoglobinemia e hemoglobinúria	Síndrome da veia cava

Os sinais clínicos (Tabela 1) desenvolvem-se de forma gradual e, geralmente, têm início com uma tosse crônica que vai evoluindo para uma dispneia moderada a severa, prostração e síncope pós-exercício ou excitação (VENCO et al., 2005). Com o desenvolvimento da insuficiência cardíaca direita, o animal pode apresentar anorexia, perda de peso progressiva, intolerância ao exercício e distensão abdominal (ascite) (POLIZOPOULOU et al., 2000; KITAGAWA et al., 2000; CALVERT; THOMASON, 2008; CVBD, 2012).

2.5 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

As alterações hematológicas e bioquímicas são consideradas de uso limitado no que concerne à sua capacidade de diagnóstico da dirofilariose, porém essas alterações constituem ferramentas de apoio bastante úteis na confirmação do diagnóstico e na avaliação de doenças concomitantes (ATKINS, 2010).

Anemia regenerativa, resultante de hemólise intravascular e é frequentemente acompanhada de hemoglobinúria (CALVERT et al., 1999), pode também está presente em animais com síndrome da veia cava ou doença pulmonar arterial grave, assim como trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada (CID). Não obstante após o início do tratamento adulticida distúrbio da coagulação tem sido reportado (ATKINS, 2010). Contudo, Niwetpathomwat et al. (2007) relataram que anemias leves e não regenerativas são comuns em cães com dirofilariose crônica e severa.

Por outro lado, aumento dos valores absolutos de leucócitos, particularmente, eosinófilos e basófilos são observações frequentes, mas sem especificidade para infecção por *D. immitis* (CALVERT et al., 1999), sendo observadas de forma mais frequente em cães com pneumonia eosinofílica e dirofilariose oculta quando a destruição imunomediada de microfilárias na microcirculação pulmonar produz amicrofilaremia (MORCHÓN et al., 2007; OLEAGA et al., 2009).

A hipoalbuminemia também tem sido relatada em cães com doença crônica ou severa tanto como resultado da glomerulopatia por perda de proteína ou como manifestação de insuficiência cardíaca congestiva direita (CALVERT et al., 1999).

Há relatos de cães infectados que apresentam aumento nos valores de fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, aspartato transaminase sanguíneas, uréia e creatinina

(NIWETPATHOMWAT et al., 2007; HASHEM; BADAWY, 2008), indicando lesão tecidual do órgão onde se localizam (NIWETPATHOMWAT et al., 2007), porém estas alterações não estão diretamente relacionadas com a infecção por *D. immitis* e sim com doença renal e ou hepática (PASCA et al., 2012) que pode estar presente na dirofilariose.

2.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da dirofilariose canina baseia-se na detecção de microfilárias no sangue periférico, através da técnica de Knott (1939) modificada por Newton e Wright (1956), por ser considerada padrão ouro para a diferenciação de microfilárias (RAWLINGS, 1986), permitindo a observação da morfologia das larvas e a mensuração de suas dimensões, diferenciando entre *D. immitis* e outras espécies de filarídeos, como *Acanthocheilonema reconditum* (NELSON et al., 2005).

Em função da baixa sensibilidade da técnica parasitológica, o diagnóstico definitivo deve ser realizado através de técnicas sorológicas para detecção de antígenos circulantes do parasito adulto (SILVA; LANGONI, 2009), pela sua alta especificidade e sensibilidade (SIMÓN et al., 2012), sendo o método imunoenzimático (ELISA), considerado o teste padrão (AHS, 2014).

Segundo McCALL et al. (2008), na última década tem-se desenvolvido métodos moleculares para identificação de filarídeos que permite um diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade. No método da PCR em tempo real, podem ser detectadas simultaneamente diferentes espécies de filárias como *D. immitis* e *D. repens*, tanto nos vetores como nos hospedeiros vertebrados, tornando-se uma ferramenta importante em levantamentos epidemiológicos de áreas endêmicas (LATROFA et al., 2012).

Por outro lado, a imagiologia tem sido utilizada na suspeita diagnóstica, planejamento terapêutico e o estadiamento da severidade das lesões decorrentes da infecção por *D. immitis* (McCALL et al., 2008b; NELSON et al., 2014).

A radiografia de tórax fornece evidências de aumento no diâmetro da artéria pulmonar, alterações do parênquima pulmonar e cardiomegalia cardíaca direita em estágios avançados da doença (VENCO et al., 2004), e em casos de insuficiência cardíaca congestiva direita, pode ser observadas alterações como a efusão pleural (SCHAFER; BERRY, 1995; CALVERT; RAWLINGS, 2002; McCALL et al., 2008b).

A ecocardiografia Doppler pode ser utilizada para avaliar a função cardíaca direita, estimar a localização dos vermes, determinar o grau de hipertensão pulmonar, o prognóstico e direcionar a forma de tratamento a ser administrada, uma vez que a carga parasitária, assim como pelo grau de lesão dos vasos pulmonares podem sugerir adequação ao procedimento terapêutico (CALVERT; RAWLINGS; McCALL, 1999; SIMÓN et al., 2012).

2.7 TRATAMENTO

A terapêutica da dirofilariose canina tem como finalidade melhorar a condição clínica do animal e a eliminação de *D. immitis* com o mínimo de complicações durante e após o tratamento (McCALL; GUERRERO, 2010; AHS, 2014).

O tratamento em pacientes assintomáticos ou em pacientes que exibem sinais clínicos leves (Tabela 1) normalmente não causa maiores problemas se houver um controle das atividades físicas (AHS, 2014). Em animais que apresentam um grau de infecção moderado a grave, o tratamento tem um nível de dificuldade maior, e desta forma não deve ser iniciado até que o paciente seja estabilizado, podendo ser necessário a utilização de glicocorticoesteróides, diuréticos, vaso-dilatadores, agentes inotrópicos positivos e fluidoterapia (AHS, 2014).

Quanto aos indivíduos que apresentam síndrome da veia cava e hipertensão pulmonar, o tratamento adulticida é contraindicado (ETTINGER; FELDMAN, 2004; AHS, 2014), indicando se a intervenção cirúrgica (KITAGAWA et al., 1997; AHS, 2014).

A eliminação dos parasitos adultos pode ser realizada pela aplicação do organoarsênico hidrocloreto de melarsomina, intramuscular profunda, entretanto, essa droga leva a uma severa trombose pulmonar, além de não ser comercializada no Brasil (KRAMER et al., 2008). Como opção, pode-se usar lactonas macrocíclicas, notadamente a ivermectina (6 a 12µg/kg), associada ou não ao pamoato de pirantel (5mg/kg), mensalmente, por via oral, durante pelo menos 12 meses consecutivos. (McCALL et al., 1998). A administração mensal e contínua dessas doses de ivermectina é altamente eficaz contra estágios larvais pré-cardíacos e jovens adultos (McCALL et al., 1998; AHS, 2014).

O efeito adulticida da ivermectina requer mais de um ano de administrações mensais contínuas, podendo levar mais de dois anos para eliminar todos os parasitos (McCALL et al., 2004; NELSON et al., 2005).

Apesar da eficácia das drogas utilizadas na terapêutica de cães com dirofilariose, a ocorrência de quadro clínico de choque em animais submetidos ao tratamento profilático ou adulticida com dietilcarbamazina (DEC), milbemicina e ivermectina, tem sido reportada por Kitoh et al., (1994) e Kitoh et al. (2001a). A DEC leva o animal a choque devido a constrição da veia hepática, ocorrendo aumento do volume do vaso e hepatomegalia, resultando em choque hipovolêmico, sem entretanto o envolvimento da histamina. Por outro lado, Kitoh et al. (2001b) demonstraram que a histamina participa no desenvolvimento do quadro de choque em cães inoculados com extrato bruto de *D. immitis*.

Estudos tem apontado para a importância da relação simbiótica que existe entre a bactéria *Wolbachia* e a *D. immitis*, pois além de ser indispensável para sobrevivência do nematódeo, ela apresenta uma proteína de superfície localizada na parede celular, a WSP (*Wolbachia surface protein*) que induz o hospedeiro a desenvolver uma resposta específica mediada por IgG (McCALL et al., 2008a). Dessa forma, com a morte dos parasitos, uma grande quantidade de bactérias é liberada na circulação canina (McCALL et al., 2004; GUERRERO, 2005), levando a reações inflamatórias sistêmicas graves (CROSS et al., 2001), pois interagem principalmente com macrófagos e neutrófilos, participando da patogênese e resposta imune da dirofilariose (BANDI; TREES; BRATTING, 2001; TAYLOR et al., 2001; KRAMER et al., 2004).

Entretanto, essa relação tem tido um efeito positivo no tratamento da dirofilariose, visto que a eliminação da bactéria com antibioticoterapia leva a muitos resultados benéficos como inibição do desenvolvimento larval, esterilidade das fêmeas e efeito adulticida (McCALL et al., 2014).

Para este propósito tem sido utilizado um antibiótico da família das tetraciclina, a doxiciclina, na dosagem de 10mg/kg durante 30 dias (ETTINGER; FELDMAN, 2004; MEIRELES et al., 2014; AHS, 2014), a qual reduz o número de *Wolbachia* em todas as etapas evolutivas de *D. immitis* (McCALL et al, 2011). Em cães com parasitos adultos, ocorre a supressão da microfílemia gradualmente após a administração da doxiciclina (BAZZOCCHI et al, 2008; McCALL et al, 2008a). Estudos têm demonstrado que a administração de doxiciclina (10mg/kg/sid/5 semanas) em combinação com ivermectina (6µg/kg/semana) fornece atividade adulticida mais rápida do que a ivermectina sozinha, assim como o uso deles combinados reduz de forma mais eficaz o número *Wolbachia*, do que só a administração da doxiciclina (BAZZOCCHI et al, 2008; GRANDI et al., 2010; AHS, 2014).

Vale ressaltar que após o tratamento adulticida, fragmentos de nematódeos mortos pode dar origem a tromboembolismos pulmonares que podem levar o paciente a óbito (MEIRELES et al., 2014), por isso durante o período do tratamento o nível de atividade física dos cães representa um dos fatores mais importantes que contribui para a ocorrência dessas complicações pós-tratamento (DILLON et al., 1995; FUKAMI et al., 1998). Desta forma a restrição ao exercício e, em alguns casos, o confinamento dos animais, de modo a promover o seu repouso total, são medidas necessárias durante todo o processo, permitindo a melhoria da circulação sanguínea cardiopulmonar e reduzindo a hipertensão pulmonar (VENCO, 2007).

A prevenção da infecção por *D. immitis* é realizada através do uso de quimioterápicos, que devem ser iniciados antes da oitava semana de vida, principalmente em áreas endêmicas (AHS, 2014). Existem diversos fármacos que podem ser utilizados como medicação profilática, podendo ser administradas por via oral e tópica, os mais comumente utilizados e com maior eficácia são as lactonas macrocíclicas: ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina e selamectina (LABARTHE et al., 2015; BOWMAN et al., 2016; MORAES-DA-SILVA et al., 2016).

2.8 TRATAMENTO CIRÚRGICO

A síndrome da veia cava se desenvolve de forma aguda em cães infectados por grande número de nematódeos adultos, pois os parasitos causam obstrução parcial do fluxo de sangue através da válvula tricúspide, podendo interferir no fechamento da mesma (AHS, 2014), levando o animal a óbito caso não haja intervenção cirúrgica (KITAGAWA et al., 1997).

Para a realização da remoção cirúrgica dos parasitos é necessário apenas uma leve sedação e anestesia local, de modo a permitir a incisão da veia jugular direita, onde se introduz pinças longas e flexíveis com o auxílio do fluoroscópio, até o átrio direito e veia cava, retirando o máximo possível de helmintos adultos (ISHIGARA et al., 1990; CALVERT; THOMASON, 2008; AHS, 2014).

Um estudo de Kitagawa et al. (1997) permitiu observar que a sobrevivência nos cães era maior naqueles em que foram retirados um maior número de parasitas. Também foi possível demonstrar que a remoção cirúrgica dos parasitas é eficaz na maioria dos animais com síndrome da veia cava mas pode ser menos eficaz em cães com a forma crônica desta síndrome.

Depois da recuperação cirúrgica, o animal deve ser sujeito a um tratamento aduicida de modo a remover quaisquer parasitas remanescentes, particularmente se estes continuarem a ser visíveis na ecocardiografia (LEE et al., 2008).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, D. Biology of *Dirofilaria immitis*. In **Dirofilariasis**. CRC Press Florida, p.29-46, 1988.

AHID, S.M.M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R; SARAIVA, L.Q. Dirofilariose canina na Ilha de São Luiz, Nordeste do Brasil: uma zoonose potencial. **Cadernos de Saúde pública**, Rio de Janeiro, vol.15, p.405-412, 1999.

AHS-AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **Current canine guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs**, 2014. Disponível em: < <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines> >. Acessado em: 26 de junho de 2016.

ARESU, L. et al. Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. vol.19, p. 569-572, 2007.

ATKINS, C. Heartworm Disease. In: STEPHEN, E.J.; FELDMAN, E.C. **Eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 7th Ed. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier Inc. 2010: 1353-1380.

ATWELL, R.B.; BUORO, I.B.J. Caval syndrome. In: BOREMAN, P.F.L.; ATWELL, R.B. (eds): **Dirofilariasis**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988: 191-203.

BANDI, C.; TREES, A.J.; BRATTING, N.W. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. **Veterinary Parasitology**. vol.98, p.215-238, 2001.

BARBOSA, C.L.; ALVES, L.C. Dirofilariose canina: situação atual no Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, vol.1, p.57-62, 2006.

BAZZOCCHI, C. et al. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and aduicidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. **International Journal for Parasitology**. vol. 38, p. 1401-1410, 2008.

BAUTISTA, M.G.; ROJO VÁZQUEZ, F.A.; GUERRERO, J. Filariatosis. In: CAMPILLO, M.C.; ROJO VÁZQUEZ, F.A. **Parasitología Veterinaria**. McGraw-Hill-Interamericana de España.1998: 679- 693.

BOCKOVÁ1, E.; IGLÓDYOVÁ, A.; KOČIŠOVÁ1, A. Potential mosquito (Diptera:Culicidae) vector of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in urban areas of Eastern Slovakia. **Parasitology Research**. 114:4487-4492, 2015.

BOWMAN, D.D. et al. **Feline Clinical Parasitology**. 1st ed. A Blackwell Science Company, Iowa, (2002). pp. 331-334.

BOWMAN, D.D. et al. Protection of dogs against canine heartworm infection 28 days after four monthly treatments with Advantage Multi[®] for Dogs. **Parasites & Vectors**. vol. 9, art. 12, p. 2-7, 2016.

CALVERT, C.A.; RAWLINGS, C.A.; McCALL, J.W. Canine Heartworm Disease. In: **Textbook of canine and feline Cardiology, Principles and clinical practice**. FOX, P.R.; SISSON, D.; MOISE, N.S. WB Saunders, 1 ed. p.702-726, 1999.

CALVERT, C.A.; THOMASON, J. Heartworm Disease. In: TILLEY, L.P.; FRANCIS, J.; SMITH, W.K.; OYAMA, M.A.; SLEEPER, M.M. Eds. **Manual of canine and feline cardiology**. 4th ed. Saunders Elsevier Inc. 2008: 183-199.

CALVERT, C.A; RAWLINGS, C.A. Dirofilariose canina. In: **Manual de cardiologia para cães e gatos**, TILLEY, L.P.; GOODWIN, JOHN- KARL, 3^a ed. 2002.

CANCRINI, G. et al. Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes in *Aedes albopictus*. **Parassitologia**. Vol. 37, p.141-145, 1995.

CANCRINI, G. Natural vectors of Dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan region (Central Italy). **Journal of Medical Entomology**. vol. 43, p. 574-579, 2006.

CANCRINI, G.; GABRIELLI, S. Chapter 3: Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships. In: GENCHI, C; RINALDI, L.; CRINGOLI, G. (Eds.), **Proceedings of the First European Dirofilaria Days: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections**, Zagreb, Croatia, pp. 49-58, 2007.

CANCRINI, G.; KRAMER, L.H. Insect vectors of *Dirofilaria* spp. In: SIMON, F.; GENCHI, C. (Eds), **Heartworm infection in humans and animals**. Universidad Salamanca Ed, 63-82 pp. 2001.

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. BIOLOGY. 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/dirofilariasis/biology_d_immitis.html> Acesso em: 15 de Julho de 2016.

COCCHIARO, M.F. Medical and Interventional Management of Canine Heartworm Disease. In: **Canine Medicine Symposium**, 2008. Disponível em: <<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=UCDCMC2008&PID=23487&O=Geric>> Acesso em: 6 de Maio de 2016.

CROSS, H.F. et al. Severe reactions to filarial chemotherapy and release of *Wolbachia* endosymbionts into blood. **The Lancet**. vol. 358, p.1873-1875, 2001.

CVBD- COMPANION VECTOR-BORNE DISEASES. 2012. Disponível em: <<http://www.cvbd.org/en/mosquito-borne-diseases/heartworm-disease/>> Acesso em: 15 de Julho de 2016.

DILLON, A.R.; WARNER, A.E.; MOLINA, R.M. Pulmonary parenchymal changes in dogs and cats after experimental transplantation of dead *Dirofilaria immitis*, In: **Proceedings of the Heartworm Symposium '92**. American Heartworm Society, Batavia, IL. p 97–101. 1995.
 ETTINGER, S.; FELDMAN, E. **Textbook of veterinary internal medicine**. Volume 2. 6th ed. Saunders Elsevier, 2004, p.1118-1144.

FALIDAS, E. et al. Human subcutaneous dirofilariasis caused by *Dirofilaria immitis* in a Greek adult. **Journal of Infection and Public Health** sup. 9, p. 102-104, 2016.

FERNANDES, C. G. N. et al. Aspectos epidemiológicos da dirofilariose canina no perímetro urbano de Cuiabá, Mato Grosso: emprego do "Immunoblot" e do teste de Knott modificado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. vol.37, n.6, dez. 2000.

FERREIRA, C.A.C. et al. First molecular identification of mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in continental Portugal. Ferreira et al. **Parasites & Vectors** vol.8:139, p.2-11, 2015.

FLYNN, R.J. **Parasites of Laboratory animals**. Vol. I. Ames: The Iowa State University Press, 1973, 442p.

FUKAMI, N. et al. Influence of exercise on recovery of dogs following heartworm adulticide treatment with melarsomine. In **Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '98**, Tampa, FL. American Heartworm Society, 1998, pp 225-227.

FURTADO, A.P. et al. Morphological Redescription of *Dirofilaria immitis*. **Journal of Parasitology**, vol.96:3, p.499-504, 2010.

GARCEZ, L. M. et al. Focos de dirofilariose canina na Ilha do Marajó: um fator de risco para a saúde humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, vol.39, p.333-336, 2006.

GENCHI, C. et al. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. **Veterinary Parasitology**. vol.163, p.286–292, 2009.

GENCHI, C.; RINALDI, L.; GENCHI, M. Impact of climate change on *Dirofilaria* infections in animals and humans. **Nuova Acta Leopoldina**. vol. NF 111, p.71–77, 2010.

GOMES, B. **Doenças parasitárias do cão transmitidas por insectos culicídeos e psicodídeos no funchal e em barcelona**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

GRANDI, G. et al. A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). **Veterinary Parasitology**. vol.169, p.347-351, 2010.

GRIEVE, R.B. et al. Canine *Dirofilaria immitis* infection in a hyperenzootic area: examination by parasitologic findings at necropsy and by two serodiagnostic methods. **American Journal of Veterinary Research**. vol.47, p.329-332, Feb 1986.

GRIEVE, R.B.; LOK, J.B.; GLICKMAN, L.T. Epidemiology of canine heartworm infection. **Epidemiologic Reviews**. vol.5, p.220-246, 1983.

GUERRERO, J. Heartworm Pathophysiology in Dogs and Cats. In: **Proceedings of the 30th Congress of the World Small Animal Veterinary Association Proceedings Online**, México, 2005.

HASHEM, M.; BADAWY, A. Hematological and biochemical studies on filariasis of dogs. **The Internet Journal of Veterinary Medicine**. vol.4, 2008.

HOCH, H.; STRICKLAND, K. Canine and feline dirofilariasis: life cycle, pathophysiology and diagnosis. **Compendium**, vol. 3, p. 133-141. 2008.

ISHIHARA, K. et al. Clinico pathological studies on canine dirofilarial hemoglobinuria. **The Japanese Journal of Veterinary Science**. vol.40, p.525-537, 1978.

JANG, H.M.; LEE, H.C.; JUNG, D.I. A case of canine ectopic parasitism of Heartworm in the systemic circulation. **Journal of Veterinary Clinics**. vol.32:4, p. 347-351, 2015.

KARTMAN, L. Factors influencing infection of the mosquito with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Experimental Parasitology**. vol.2, p.27-78, 1953.

KETTLE, D. S. **Medical and Veterinary Entomology**. 2a ed. Wellingsfors: CAB International, 1995, 725p.

KITAGAWA H. et al. Comparison of laboratory data in dogs with heartworm caval syndrome surviving and non surviving after surgical treatment. **The Journal of Veterinary Medical Science**. vol.59, pag.609-611, 1997.

KITAGAWA, H. et al. Plasma renin activities, angiotensin II concentrations, atrial natriuretic peptide concentrations and cardiopulmonary function values in dogs with severe heartworm disease. **The Journal of Veterinary Medical Science**. vol.62, p.453-455, 2000.

KITOH, K. et al. Clinical, Haematologic and Biochemical Findings in dogs after induction of shock by injection of heartworm extract. **American Journal of Veterinary Research**, vol. 55, n 11, p. 1535-1541, 1994.

KITOH, K. et al. Hemodynamic alterations in dogs with shock induced by intravenous injection of heartworm extract. **The Journal of Veterinary Medicine Science**. vol.63, p.179-182, 2001a.

KITOH, K. et al. Role of histamine in heartworm extract induced shock in dogs. **American Journal of Veterinary Research**. vol. 62, n. 5, p. 770-774, 2001b.

KITTLESON, M.D. Heartworm Infection and Disease (Dirofilariasis). In: KITTLESON, M.D.; KIENLE, R.D., Eds. **Small Animal Cardiovascular Medicine**. 2nd ed. W.B. Saunders, p.370-398, 1999.

KNIGHT, D.H. Heartworm Infection. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. vol.17, p.1463-1517, 1987.

KOZEK, W.L. What is new in the *Wolbachia/Dirofilaria* interaction? **Veterinary Parasitology**, vol.133, p.127-132, 2005.

KRAMER, L. H. et al. Immunohistochemical/immunogold detection and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* using a polyclonal antiserum raised against WSP (Wolbachia Surface Protein). **Parasitology Research**, v.89, p.381-386, 2003.

KRAMER, L. et al. Wolbachia endosymbionts and the immunopathogenesis of filarial disease. In: MCCALL, J.W.; GUERRERO, J.; GENCHI, C.; KRAMER, L. (Eds.). Recent Advances in Heartworm Disease. (Symposium). **Veterinary Parasitology**. vol.125, p.127-130, 2004.

KRAMER, L. et al. Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. **Veterinary Parasitology**. vol. 158, p.191-195. 2008.

LABARTHE, N. et al. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. **Parasites & Vectors**, vol. 7:493, p.2-8, 2014.

LABARTHE, N.V. et al. Chemoprophylaxis of *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856) infection at a high challenge environment. **Parasites & Vectors**. vol.8:523, p.2-4, 2015.

LABARTHE, N.V.; ALVES, L.C.; SERRÃO, M.L. Dirofilariose em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonose. In: ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitose em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda., 135p., 2002.

LATROFA, M.S. et al. A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. **Veterinary Parasitology**, vol.185, p. 181– 185, 2012.

LEE, S.G.; MOON, H.S.; HYUN, C. Percutaneous heartworm removal from dogs with severe heartworm (*Dirofilaria immitis*) infestation. **Journal of Veterinary Science**. vol.9, pag.197-202, 2008.

LOK, J.B. *Dirofilaria* sp.: Taxonomy and Distribution. In: Boreham PFL, Atwell RB, eds. *Dirofilariases*. **CRC Press Florida**. p.249, 1988.

LOK, J.B.; WALKER, E.D.; SCOLES, G.A. Filariasis, In: **Medical Entomology**: EDMAN, J. D.; ELDRIDGE, B.F.A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/ Boston/ London, p. 299-375, 2000.

LOMBARD, C.W. Heartworm disease. In: BONAGURA, J.D. (Ed.), **Cardiology**. Churchill Livingstone, New York, p. 275–299, 1987.

MAGNIS J. et al. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. **Parasites & Vectors**. vol.6, p.1-5, 2013.

- MAR, P. et al. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). **Veterinary Parasitology**. Vol.106:3, p. 243-252, 2002.
- McCALL, J.W. et al. Heartworm and *Wolbachia*: therapeutic implications. **Veterinary Parasitology**. vol.158, p.204-214, 2008a.
- McCALL, J.W. et al. Heartworm disease in animals and humans. In: ROLLINSON, D.; HAY, S.I. (eds): **Advances in Parasitology**. New York: Academic Press, vol. 66, p. 193-285, 2008b.
- McCALL, J.W. et al. Effects of doxycycline on early infections of *Dirofilaria immitis* in dogs. **Veterinary Parasitology**. vol.176, p.361-367, 2011.
- McCALL, J.W. et al. In: **Proceedings of the heartworm symposium'98**. p.209-215, Tampa, Florida, 1998.
- McCALL, J.W. et al. Recent advances in heartworm disease. In: **Veterinary Parasitology**. vol.125, p.105-130, 2004.
- McCALL, J.W. et al. Safety and efficacy of 10% imidacloprid + 2.5% moxidectin for the treatment of *Dirofilaria immitis* circulating microfilariae in experimentally infected dogs. **Veterinary Parasitology**. vol.206, p.5-13, 2014.
- MCCALL, J.W.; GUERRERO, J. Diagnosis, Prevention and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Guidelines for Canine Heartworm Disease**. American Heartworm Society. p.1-14, 2010.
- MEIRELES, J.; PAULOS, F.; SERRÃO, I. Dirofilariose canina e felina. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**. vol.109:591-592, p.70-78, 2014.
- MORAES-DA-SILVA, M.F. et al. Selamectin for the prevention of canine *Dirofilaria immitis* infection: field efficacy in client-owned dogs in a high risk area. **Parasites & Vectors**. Vol. 9(407), p. 2-5, 2016.
- MORCHÓN, R. et al. Dogs with patent *Dirofilaria immitis* infection have higher expression of circulating IL-4, IL-10 and iNOS mRNA than those with occult infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. vol.115, p.184-188, 2007.
- MORCHÓN, R. et al. Adult *Dirofilaria immitis* excretory/secretory antigens upregulate the production of prostaglandin E2 and downregulate monocyte transmigration in an "in vitro" model of vascular endothelial cell cultures. **Veterinary Parasitology**. vol.170, p.331-335, 2010.
- MORCHÓN, R. et al. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – new distribution trends. **Frontiers Physiology**, vol. 3, article 196, p. 1-11, 2012
- NELSON, C.T. et al. Executive Board of the American Heartworm Society. 2005 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Veterinary Parasitology**. vol.133, n.2-3, p.255-66, 2005.

NELSON, C.T.; McCALL, J.W.; CARITHERS, D. Biology and life cycle. In: **Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs**. American Heartworm Society. 2014.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **The Journal of Parasitology**. vol.42, p.246-258, 1956.

NIWETPATHOMWAT, A. et al. A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. **Research in Veterinary Science**. vol.82, p.364-369, 2007.

OLEAGA, A. et al. Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**. vol.166, p.134-141, 2009.

OTRANTO D. et al. Human intraocular filariasis caused by *Dirofilaria* sp. Nematode, Brazil. **Emerging Infectious Diseases journal**. vol.17, p.863-866, 2011.

OTTO, G.F.; JACHOWSKI, L.A.Jr. Mosquitoes and canine heartworm disease. In: OTTO, G.F. ed. **Proceedings of Heartworm Symposium '80**. Edwardsville, KS:Veterinary Medicine Publishing Co, p.17-32, 1981.

PAES-DE-ALMEIDA, E.C. et al. Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Veterinary Parasitology**. vol.113, p.157-168, 2003.

PASCA S.A. et al. Vascular, hepatic and renal lesions by *Dirofilaria immitis* invasion in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol.64, p.841-846, 2012.

POLIZOPOULOUS, Z.S. et al. Clinical and laboratory observations in 91 dogs infected with *Dirofilaria immitis* in northern Greece. **The Veterinary Record**, p.466-469, 2000.

RAWLINGS, C.A. et al. Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. vol.180, n.11, p.1323-1326, 1982.

RAWLINGS, C.A. Diagnosis of infection. In: PEDERSEN, D. **Heartworm disease in dogs and cats**. Philadelphia: WB Saunders.209-229, 1986.

RAWLINGS, C.A.; CALVERT, C.A. Heartworm Disease. In: ETTINGER SJ. **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of Dogs and Cats**. 3 ed. W.B.Saunders Co. Philadelphia, USA, p.1378-1399, 1989.

SAUERMAN, D.M.; NAYAR, J.K. A survey for natural potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Vero Beach, Florida. **Mosquito News**. vol.43, p. 222-225, 1983.

SCHAFFER, M; BERRY, C.R. Cardiac and pulmonary artery mensuration in feline heartworm disease. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, vol. 36, n.6, p.499-505. 1995.

SCHREY, C. F.; TRAUTVETTER, E. Canine and feline heartworm disease - diagnosis and therapy. **Waltham focus**, vol.8, n.2, p.23-30, 1998.

SILVA, A.M.A. et al. Dirofilariose canina no município de Coari, Amazonas, Brasil. **Archives of Veterinary Science**. vol.13, p. 145-150, 2008.

SILVA, R.C.; LANGONI, H. Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol. 39, n.5, p. 1614-1623, 2009.

SIMON, F. et al. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. **Veterinary Research Communications**, v.31, p.161-171, 2007.

SIMÓN, F. et al. Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. **Clinical Microbiology Reviews**, vol.35:3, p.507-534, 2012.

SIMÓN, F. et al. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a mosaic. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 25, n.3. 2014.

SLOCOMBE, J.O.D.; SURGEONER, G.A.; SRIVASTAVA, B. Determination of the heartworm transmission period and its used in diagnosis and control. In: **Proceedings of the Heartworm Symposium '89**, CHARLESTON, S.C. American Heartworm Society, p. 19-26, 1989.

SONG, K.H.; TANAKA, S.; HAYASAKI, M. Scanning electron microscopic observation of ultrastructure of *Dirofilaria immitis* microfilaria. **The Journal of Veterinary Medical Science**. vol.71, p.779-783, 2009.

SOUZA, N.F.; BENIGNO, R.N.M.; FIGUEIREDO, M.J.F.M. Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém, PA, com base na microfílaemia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. vol. 6, n. 1, p. 83-86, 1997.

SYMES, C.B. A note on *Dirofilaria immitis* and its vectors in Fiji. **Journal of Helminthology**. vol.34, p.39-42, 1960.

TAYLOR, M.J. et al. *Wolbachia* bacteria in filarial immunity and disease. **Parasite Immunology**. vol.23, p.401-409, 2001.

TAYLOR, M.J.; BANDI, C.; HOERAUF, A. *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. **Advances in Parasitology**. vol.60, p.245-284, 2005.

TAYLOR, A.E.R. The development of *D. immitis* in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Helminthology**. vol.34, p.27-38, 1960.

TROTTI, G.C.; PAMPIGLIONE, S.; RIVASI, F. The Species of The Genus *Dirofilaria* Raillet & Henry, 1911. In: **Proceedings of VII European Multicolloquium of Parasitology**. Parassitologia. Suppl. 1-2, p.354, 1996.

UNDERWOOD, P.C.; HARWOOD, P.D. Survival and location of the microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. **The Journal of Parasitology**. vol.25, p.23-33, 1939.

VENCO, L. et al. Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infections in dogs. **Veterinary Parasitology**, vol. 124 (3–4), p. 259–268, 2004.

VENCO, L.; KRAMER, L.; GENCHI, C. Heartworm disease in dogs: unusual clinical cases. **Veterinary Parasitology**. vol.133, p.207-218, 2005.

VENCO, L. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs. In: **Mappe parassitologiche Dirofilaria: *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections**. Edited by GENCHI, C.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G. Naples: Rolando Editore. p.117–125, 2007.

VENCO, L. et al. Field efficacy and safety of a combination of moxidectin and imidacloprid for the prevention of feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. **Veterinary Parasitology**. vol.154:1-2, p. 67-70, 2008.

VEZZANI, D. PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina. **Parasitology Research**. vol. 108, p.985-989, 2011.

WALTERS, L.L.; LAVOPIERRE, M.M.J. *Aedes vexans* and *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae): Potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Tehama County, Northern California, US. **Journal of Medical Entomology**. vol.19, p.15-23, 1982.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas e a eficácia das lactonas macrocíclicas em associação com tetraciclinas no tratamento de cães naturalmente infectados com *Dirofilaria immitis*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais naturalmente infectados com *D. immitis*;
- Avaliar a eficácia da associação de doxiciclina e ivermectina no tratamento de cães naturalmente infectados com *D. immitis*.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CÃES COM INFECÇÃO POR *Dirofilaria immitis*

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CÃES COM INFECÇÃO POR *Dirofilaria immitis*

Nadine Louise Nicolau da Cruz¹; Maria Luiza Farias Lima²; Lorena Adão Vescovi Séllos Costa³; Victor Fernando Santana Lima⁴; Paola Teles Soares⁵; Márcia Paula Oliveira Farias⁶; Leucio Câmara Alves⁷

^{1,4,7} Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Medicina Veterinária, Av. Dom Manuel de Medeiros S/N, CEP: 52171-930, Recife-PE

^{2,5} Médicas Veterinárias autônomas

³ Médica Veterinária Radiologista-UFRPE

⁶ Universidade Federal do Piauí-Campus Professora Cinobelina Elvas

RESUMO

Dirofilariose canina tem grande importância por ser uma das principais causas de cardiopatia parasitária na clínica veterinária, além do seu potencial zoonótico. Apresenta distribuição mundial e é considerada endêmica em muitas regiões do Brasil. Apesar da maioria dos animais serem assintomáticos, possíveis alterações laboratoriais podem ser encontradas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas de cães com infecção por *D. immitis*. Foram analisados 51 animais sorologicamente positivos, sendo submetidos ao exame parasitológico, onde foram divididos em grupos microfilarêmicos e amicrofilarêmicos. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram interpretados baseados nos valores de referência. Dos 51 animais, 35,3% eram microfilarêmicos e 64,7% amicrofilarêmicos. Em ambos os grupos foi observado microcitose, eosinofilia e hiperproteinemia sem diferenças estatísticas. Os monócitos estavam dentro dos valores de referência, porém apresentaram diferença estatística entre os grupos, com maior quantidade no grupo microfilarêmico, além disso, foi encontrado trombocitopenia apenas no grupo amicrofilarêmico com diferença estatística. Entretanto a média dos valores bioquímicos estavam dentro dos valores de normalidade e sem diferenças estatísticas entre os grupos. Com isso, conclui-se que os valores hematológicos e bioquímicos são fundamentais pois fornecem ao clínico veterinário subsídios importantes para avaliar as condições clínicas, estágio da doença e prognóstico, auxiliando a definir a melhor conduta terapêutica.

Palavras chaves: Dirofilariose, hematologia, diagnóstico

ABSTRACT

Canine heartworm disease is very important to be a major cause of parasitic disease in the veterinary clinic, in addition to its zoonotic potential. It has a worldwide distribution and is considered endemic in many regions of Brazil. While most animals are asymptomatic, laboratory findings possible can be found. Thus, the aim of this study was to evaluate the hematological and biochemical changes in dogs infected with *D. immitis*. 51 seropositive animals were analyzed, were submitted to the parasitological test, which were divided into microfilaremic and occult groups. Hematological and biochemical parameters were interpreted based on reference values. Of the 51 animals, 35.3% were microfilaremic and 64.7% occult. In both groups was observed microcytosis, eosinophilia and Hyperproteinemia without statistical differences. Monocytes were within the reference values, but showed no statistical difference between the groups, with higher amounts in microfilaraemic group, moreover, thrombocytopenia was found only in amicrofilarêmico group with statistical

difference. However the average biochemical values were within normal values with no significant differences between groups. Thus, it is concluded that hematological and biochemical values are critical because they provide the clinical veterinary important information to assess the clinical conditions, stage of the disease and prognosis, helping to define the best treatment.

Keywords: Dirofilariose, hematology, diagnosis

1. INTRODUÇÃO

A dirofilariose é causada pelo nematódeo *Dirofilaria immitis*, e tem sido reportada em diferentes regiões do mundo, podendo infectar vários hospedeiros incluindo cães, gatos, ferrets, raposas, lobos, leão marinho (MAR et al., 2002; McCALL et al., 2008b; SILVA; LANGONI, 2009; MONTOYA et al., 2010; MORCHÓN et al., 2012), bem como o homem (SIMÓN et al., 2009; AVELLIS et al., 2011; OTRANTO et al., 2011; FALIDAS et al., 2016).

Os cães infectados podem apresentar desde uma doença subclínica a síndrome da veia cava e morte (ATWELL; SUTTON; MOODIE, 1988; ATKINS, 2010). Quando os sinais clínicos estão presentes são variáveis como mudanças de comportamento, perda de peso, tosse, dispneia e intolerância ao exercício (VENCO, 2007; GRANDI et al., 2014).

No início da infecção ocorrem reações inflamatórias nos vasos pulmonares e artérias, que podem levar a alterações pulmonares e cardíacas irreversíveis nos casos de doença crônica e severa (ATKINS, 2010). Desta forma, achados clínicos patológicos como anemia, trombocitopenia (NIWETPATHOMWAT et al., 2007), leucocitoses (NIWETPATHOMWAT et al., 2007; RANJBAR-BAHADORI et al. 2010), e alterações na ureia, creatinina, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamil transferase (SODICOFF, 1995; SEVIMLI et al., 2007) tem sido reportados em animais infectados.

O diagnóstico da infecção é realizado através da visualização e identificação de microfilárias circulantes, bem como pela presença de antígenos no sangue do hospedeiro (NELSON et al., 2005; AHS, 2014) ou por meio de diagnóstico molecular (OGAWA et al., 2013).

O prognóstico da doença está relacionado a carga parasitária, tempo de infecção e grau de severidade das lesões (McCALL et al., 2004), desta forma exames adicionais são necessários para avaliar as condições fisiológicas dos animais, indicando a gravidade das lesões e estágio da doença (AHS, 2014), além disso desempenha um papel importante na

identificação da relação parasito-hospedeiro durante a infecção por *D. immitis*. Estudos com alterações hemato-bioquímicas encontradas nessa patologia são escassos, com isso o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas dos animais com infecção natural por *D. immitis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos éticos

O estudo foi realizado mediante aprovação da Comissão de Ética para Uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, segundo licença 039/2014.

2.2. Área de estudo e animais

Foi realizado um estudo clínico a campo, em Itamaracá, Recife e Serrambi, localizados no Estado de Pernambuco, região endêmica para *D. immitis*.

Foram avaliados 51 cães que apresentaram antígenos circulantes, onde 16 animais foram diagnosticado por meio do Ensaio Imunoenzimático SNAP® 4DX¹, e 35 por meio do Witness® Heartworm.

Os animais eram domiciliados; de ambos os sexos; sem critério racial; idade superior a seis meses; negativos para hematozoários no exame parasitológico, bem como animais que não fizeram uso de doxiciclina e lactonas macrocíclicas nos últimos seis meses.

2.3. Análises laboratoriais

As amostras de sangue foram coletadas através de venopunção da veia cefálica e transferidas para tubos tipo vacutainer siliconizados² com e sem anticoagulante (ácido etilenodiaminotetraacético-EDTA)³. Os hemogramas foram realizadas utilizando contador automático da marca Rocher® (modelo POCH 100 IV)⁴. Os soros foram encaminhados para processamento bioquímico para determinação de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), Fostatase alcalina (FA), uréia, creatinina, Gama glutamil transferase (GGT) e Fósforo (P), através do método cinético e colorimétrico utilizando analisador bioquímico automático ADVIA 1800-Siemens⁵, realizado de acordo com o fabricante. Os resultados dos hemogramas foram confrontados com os valores de referência citados por Jain (1986) e Coles (1984), já os bioquímicos por Bush (2004).

¹ kit SNAP® 4DX – Biobrasil, BR

² Tubo Vacutainer BD, São Paulo-SP

³ Hemstab, LABTEST, Lagoa Santa-Minas Gerais

⁴ Contador automático POCH 100 IV Roche, Rio de Janeiro-RJ

⁵ ADVIA 1800-Siemens Healthcare Diagnostics, Erlange, Germany

Todos os animais foram submetidos ao exame parasitológico para pesquisa de microfilárias circulantes de *D. immitis* através do Método Modificado de Knott (NEWTON; WRIGHT, 1956).

2.4. Análise dos dados

Realizou-se uma análise de normalidade das variáveis pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os parâmetros que apresentaram distribuição normal e não normal foram então submetidos aos testes de t de Student e Mann-Whitney U, respectivamente, a fim de se identificar diferenças entre os grupos (SAMPAIO, 1998). O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

3. RESULTADOS

Dos 51 animais sorologicamente positivos apenas para *D. immitis*, 35,3 % (n=18) e 64,7% (n=33) dos cães foram classificados como microfilarêmicos e amicrofilarêmicos, respectivamente, de acordo com os resultados do teste parasitológico.

Em relação a variação nos valores hematológicos analisados (Tabela 1), foi possível observar uma diminuição do VGM, indicando microcitose em ambos os grupos, além de eosinofilia e hiperproteinemia, contudo uma leucocitose foi verificada apenas no grupo microfilarêmico, sem entretanto diferença estatística significativa entre os grupos.

Os monócitos estavam dentro do valor de referência, porém apresentaram diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$), com maior quantidade no grupo microfilarêmico. Na contagem de plaquetas, foi observado trombocitopenia no grupo amicrofilarêmico, com diferença significativa ($P < 0,05$).

A média dos valores bioquímicos, descritos na (Tabela 2), mostra que os níveis séricos de ureia, creatinina, AST, ALT, Fosfatase alcalina, GGT e fósforo estavam dentro dos valores de normalidade, sem entretanto diferença estatística significativa entre os grupos.

4. DISCUSSÃO

Amicrofilaremia encontrada na população canina do presente estudo foi superior a relatada por Niwetpathomwat et al. (2007), Ranjbar-Bahadori et al. (2010) e Oliveira et al. (2013) que reportaram ausência de microfilaremia em menos de 40% da população canina estudada. McCall (2005) observou que infecções ocultas ocorrem principalmente em áreas onde a prevalência da dirofilariose canina é maior que 20%, como no caso da região estudada

onde a prevalência foi considerada alta, com 36,7% em Recife e 49,5% em Itamaracá (LABARTHE et al., 2014), justificando a alta prevalência de cães com infecção oculta.

Contudo outros fatores que podem levar a amicrofilaremia são o envelhecimento de parasitos fêmeas, adultos de um único gênero, resposta imune do hospedeiro (SIMÓN; GENCHI, 2000; SIMÓN et al., 2012), infecção pré-patente ou o uso de medicamentos com efeito microfilaricida (LOK; WALKER; SCOLES, 2000; NELSON et al., 2005; BOWMAN; ATKINS, 2009).

A ausência de anemia nos animais deste estudo, contrasta com os resultados de Atwell e Buoro (1983), Niwetpathomwat et al. (2007), Sevimli et al. (2007), Ranjbar-Bahadori et al. (2010), Borthakur et al (2011) e Oliveira et al. (2013) que relataram a anemia normocítica normocrômica nos animais com dirofilariose.

Entretanto foi encontrado microcitose em ambos os grupos, que ocorre nas anemias ferroprivas ou quando os valores de ferritina sérica estão diminuídos, podendo ter na sua gênese hemorragias crônicas, ocasionadas por endoparasitas gastrointestinais, ectoparasitas hematófagos, úlceras, neoplasias gastrointestinais, doença intestinal inflamatória e mais raramente trombocitopenia ou distúrbios hemostáticos hereditários (THRALL et al., 2015). Devido a possibilidade de uma dessas patologias ocorrerem concomitantes à dirofilariose, torna-se difícil o esclarecimento da provável causa dessa alteração.

O aumento de monócitos no grupo microfilarêmico pode ser devido a remoção fagocítica estimulada pela migração das microfilárias levando a um aumento na liberação de monócitos (CROS et al., 2010), aliando resposta inflamatória e imunidade inata à imunidade adaptativa, sendo capazes de apresentar antígenos e ativar linfócitos T (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009).

Por outro lado, a eosinofilia encontrada pode ser justificada pela resposta das células da imunidade inata, particularmente os eosinófilos que contêm proteínas que se ligam e lesionam as membranas de parasitos, sendo responsáveis pelo mecanismo de defesa contra os estágios larvários (THRALL et al., 2015). Apesar destes resultados corroborarem com os achados de Niwetpathomwat et al. (2007), Ranjbar-Bahadori et al. (2010) e Oliveira et al. (2013) em animais microfilarêmicos, a eosinofilia em ambos os grupos pode estar relacionada a presença de endoparasitas gastrointestinais, ectoparasitas ou doenças alérgicas.

Segundo Calvert e colaboradores (1999) o aumento de eosinófilos é frequente mas pouco específico, sendo comumente observado em cães com pneumonite na dirofilariose clínica, sendo descrita com maior frequência em infecções ocultas, em função da destruição imunomediada de microfilárias (MORCHON et al., 2007; OLEAGA et al., 2009).

Apenas o grupo amicrofilarêmico apresentou trombocitopenia, divergindo dos resultados de Waner et al. (1995), Su et al. (2004), Niwetpathomwat et al. (2007) e Oliveira et al. (2013) que encontraram essa alteração apenas no grupo microfilarêmico. Essa alteração pode ser justificada pela ação traumática dos adultos no endotélio das artérias pulmonares, bem como a liberação de fatores tóxicos e desencadeamento de mecanismos imunológicos, que levam a alterações no endotélio estimulando a adesão e ativação de plaquetas (RAWLINGS; CALVERT, 1989; MEIRELES et al., 2014). Além da presença de lesões pulmonares com formação de microtrombos no seio arterial (PASCA et al, 2012).

A hiperproteinemia encontrada em ambos os grupos pode ser devido a presença do parasito adulto e microfilária circulante (BICHARD; SHERDING, 2008) além de quadros clínicos de desidratação (THRALL et al., 2015). Entretanto será necessário novos estudos para melhor compreensão da patogênese dessa alteração.

Os animais avaliados não apresentaram alterações nos valores dos exames bioquímicos, indicando que a carga parasitária era baixa, levando a uma relação parasito-hospedeiro mais estável, não ocasionando alterações nos parâmetros da função renal e hepática (ATKINS, 2010; MORCHÓN et al., 2010).

Conclui-se que a avaliação das alterações nos valores hematológicos e bioquímicos, apesar de não ter valor diagnóstico, são fundamentais pois fornecem ao clínico veterinário subsídios importantes para avaliar as condições clínicas, classificando o estágio da doença em que o animal se encontra, e dessa forma obter um prognóstico, definindo a melhor conduta terapêutica, bem como avaliar a evolução clínica do animal durante o tratamento. Além disso, estes parâmetros exercem um papel importante no estudo da relação parasito-hospedeiro durante a infecção.

Neste estudo, observou-se alterações em vários parâmetros como microcitose, eosinofilia, trombocitopenia e hiperproteinemia em grande número de animais, apesar dessas alterações não serem sugestivas de dirofilariose, pois podem ser observadas inclusive em populações de animais saudáveis, em virtude do tipo de alimentação, manejo e estado emocional (THRALL et al., 2015), devem ser levadas em consideração para o diagnóstico, prognóstico, tratamento e como marcadores durante as avaliações terapêuticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs**, 2014.

Disponível em: <<https://heartwormsociety.org/images/pdf/2014-AHS-Canine-Guidelines.pdf>>. Acessado em: 19 de Novembro de 2015.

ATKINS, C. Heartworm Disease. In: STEPHEN, E.J.; FELDMAN, E.C. Eds. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 7th Ed. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier Inc. 2010: 1353-1380.

ATWELL, R.B.; BUORO, I.B. Clinical presentations of canine dirofilariasis with relation to their haematological and microfilarial status. **Research in veterinary Science**. vol.35, p.364-366, 1983.

ATWELL, R.B.; SUTTON, R.H.; MOODIE, E.W. Pulmonary changes associated with dead filariae (*Dirofilaria immitis*) and concurrent antigenic exposure in dogs. **Journal of comparative pathology**. vol.98, p.349-361, 1988.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, vol. 27, p. 669-92, 2009.

AVELLIS, F.O. et al. A case of human conjunctival Dirofilariasis by *Dirofilaria immitis* in Italy. **Vector-Borne and zoonotic diseases**, vol. 11 (4), p.451-452, 2011.

BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders- Clínica de Pequenos Animais**. 3ª ed., edit. Roca, Brasil, 2008, 2072p.

BORTHAKUR, S.K.; ALI, M.A.; PATRA, G. Clinical, hematological and biochemical studies in dirofilariasis in dog. **Journal of Veterinary Parasitology**, vol.25 (1), p.63-66, 2011.

BOWMAN, D.D.; ATKINS, C.E. Heartworm Biology, Treatment, and Control. **Veterinary Clinics: Small Animal practice**. vol.39, p.1127-1158, 2009.

BUSH, B.M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. 371p.

CALVERT, C.A.; RAWLINGS, C.A.; McCALL, J.W. Canine heartworm disease. In: FOX, P.R.; SISSON, D.; MOISE, N.S. eds **Textbook of Canine and Feline Cardiology Principles and Clinical Practice**. pp. 702_726, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1999.

COLES, E.H. **Patologia Clínica veterinária**. 3ed. São Paulo: Manole, 1984, 566p

CROS, J. et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. **Immunity**, vol. 33, n. 3, p. 375-86, 2010.

FALIDAS, E. et al. Human subcutaneous dirofilariasis caused by *Dirofilaria immitis* in a Greek adult. **Journal of Infection and Public Health**, vol. 9, p 102-104, 2016.

GRANDI, G.; ZIVICNJAK, R.; BECK, R. Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. infections. In: **Mappe parassitologiche-Dirofilaria: *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and**

human infections. Edited by GENCHI, C.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G. Naples: Rolando Editore; 2014:59–66.

JAIN, M.C. The dog: Normal hematology with comments on response to disease. In: JAIN, M.C. (Ed.), **Veterinary Hematology**. Fourth ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, pp. 103–125, 1986.

LABARTHE, N.V. et al. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in áreas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. **Parasites & Vectors**, 7:493, p. 1-8, 2014

LOK, J.B.; WALKER, E.D.; SCOLES, G.A.; Filariasis, In: **Medical Entomology**. EDMAN, J.D.; ELDRIDGE, B.F.A. Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/ Boston/ London, p. 299-375, 2000.

MAR, P.H. et al. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). **Veterinary Parasitology**. vol.106, p.243-252, 2002.

MCCALL, J.W. et al. American Heartworm Society, 2004. Recent advances in heartworm disease. **Veterinary Parasitology**. vol.125, p.105–130.

McCALL, J.W. et al. Heartworm disease in animals and humans. In: ROLLINSON, D.; HAY, S.I. (eds): **Advances in Parasitology**. New York: Academic Press, vol 66, pp 193-285, 2008.

McCALL, J.W. The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: A review, an update, and recommendations. **Veterinary Parasitology**. vol.133, p.197-206, 2005.

MEIRELES, J.; PAULOS, F.; SERRÃO, I. Dirofilariose canina e felina. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**. vol.109:591-592, p.70-78, 2014.

MONTOYA, J.A. et al. Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the Island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. **Parasitology Research**, vol.107, p.1265–1269, 2010.

MORCHÓN, R. et al. Dogs with patent *Dirofilaria immitis* infection have higher expression of circulating IL-4, IL-10 and iNOS mRNA than those with occult infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. vol.115, p.184-188, 2007.

MORCHÓN, R. et al. Adult *Dirofilaria immitis* excretory/secretory antigens upregulate the production of prostaglandin E2 and downregulate monocyte transmigration in an "in vitro" model of vascular endothelial cell cultures. **Veterinary Parasitology**. vol.170, p.331-335, 2010.

MORCHÓN, R. et al. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – new distribution trends. **Frontiers in Physiology**. vol.3, p.196, 2012.

NELSON, C.T. et al. Executive Board of the American Heartworm Society. 2005 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Veterinary Parasitology**. vol. 133, n.2-3, p.255-66, 2005.

NEWTON, W.L.; WRIGHT. W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **The Journal of Parasitology**. v.42, p.246-258, 1956.

NIWETPATHOMWAT, A. et al. A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. **Research in Veterinary Science**. vol.82, p.364-369, 2007.

OGAWA, G.M. et al. Canine heartworm disease in Porto Velho: first record, distribution map and occurrence of positive mosquitoes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, vol.22, p. 559-564, 2013.

OLEAGA, A. et al. Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**. vol.166, p.134-141, 2009.

OLIVEIRA, I.N.V. et al. Perfil hematológico e bioquímico de cães infectados por *Dirofilaria immitis* da localidade da Ilha de Algodual, Pará. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, vol.35(Supl.2), p.74-80, 2013.

OTRANTO, D. et al. Human intraocular filariasis caused by *Dirofilaria* sp. Nematode, Brazil. **Emerging Infectious Diseases journal**. vol.17, p.863-866, 2011.

PASCA, S.A. et al. Vascular, hepatic and renal lesions by *Dirofilaria immitis* invasion in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol.64, p.841-846, 2012.

RANJBAR-BAHADORI, S.M. et al. Clinic-Pathologic Evaluation of the Canine Heartworm Infestation. **The Journal of Parasitology**. vol.5, p.90-98, 2010.

RAWLINGS, C.A.; CALVERT, C.A. Heartworm Disease. In: ETTINGER SJ. **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of Dogs and Cats**. 3 ed. W.B.Saunders Co. Philadelphia, USA, p.1378-1399, 1989.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SEVIMLI, F.K. et al. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: unusually located and unusual findings. **Parasitology Research**. vol.101, p.1487-1494, 2007.

SILVA, R.C.; LANGONI, H. Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rural**. vol.39, p.1614-1623, 2009.

SIMÓN, F. et al. What is new about animal and human dirofilariosis? **Trends in Parasitology**. vol.25, p.404-409, 2009.

SIMÓN, F. et al. Human and animal dirofilariosis: the emergence of a zoonotic mosaic. **Clinical Microbiology Reviews**. vol.25, p.507-544, 2012.

SIMÓN, F.; GENCHI, C. Dirofilariasis and other zoonotic filariasis: an emerging public health problem in developed countries. **Research and Reviews in Parasitology**. vol.60, p.1–16, 2000.

SODICOFF, C.H. **Laboratory Profiles of Small Animal Diseases, A Guide to Laboratory Dsiagnosis**. 2nd Edn., Mosby-Year Book, Inc., St Louis, 1995. pp: 3-20.

SU, W.L. et al. Clinical pathologic, electrocardiographic, and echocardiographic findings in the Taiwanese dogs with class 1 or 2 dirofilariasis. **Advances in Animal Cardiology**. vol.37(2), p. 47-56, 2004

THRALL, M.A. et al. **Hematologia e Bioquímica –Clínica Veterinária**, 2^a ed. Roca, 2015, 688p.

VENCO, L. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs. In: **Mappe parassitologiche Dirofilaria: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections**. Edited by GENCHI, C.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G. Naples: Rolando Editore. p.117–125, 2007.

WANER, T. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. vol.48, p.177–182, 1995.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros hematológicos dos grupos microfilarêmicos e amicrofilarêmicos naturalmente infectados por *Dirofilaria immitis* provenientes do litoral de Pernambuco.

Parâmetros Hematológicos	Microfilarêmicos (n=18)			Infecção Oculta (n=33)			Valores de Referência ³
	Média ± DP	Mediana	Intervalo	Média ± DP	Mediana	Intervalo	
Hemácias (x10 ⁶ /μL) ¹	7,63±1,50	7,44	5,20-10,39	7,01±1,59	7,13	3,71-10,46	5,50-8,50
Hemoglobina (g/dL) ¹	14,37±2,57	14,15	9,30-19,10	14,12±12,67	15,00	8,80-18,68	12,00-18,00
Hematócrito (%) ¹	40,83±6,90	41,50	28,00-54,00	39,39±7,42	40,00	29,00-55,00	37,00-55,00
VGM (μ ³) ¹	54,29±8,01	55,15	34,60-67,20	57,72±10,22	59,00	33,10-78,20	60,00-77,00
CHGM (%) ²	34,38±3,38	33,25	31,80-43,40	36,65±5,99	34,00	30,30-50,80	31,00-35,00
Leucócitos (n ^o /μL) ¹	18,31±49,37	17,80	7,90-34,50	16,44±5,79	16,30	7,10-28,40	6,00-17,00
Eosinófilos (x10 ³ /μL) ²	2,04±2,04	1,37	0,00-7,51	1,61±1,04	1,47	0,21-4,83	0,10-1,25
Bastonetes (x10 ³ /μL) ²	0,08±0,02	0,00	0,00-0,69	0,049±0,12	0,00	0,00-0,58	0,00-0,30
Segmentados (x10 ³ /μL) ²	10,55±4,14	9,69	5,76-21,23	9,75±4,20	8,70	3,66-23,12	3,00-11,50
Linfócitos (x10 ³ /μL) ²	4,38±2,94	3,36	1,14-10,69	4,31±3,24	3,60	0,47-16,32	1,00-4,80
Monócitos (x10 ³ /μL) ¹	1,24±0,65 ^a	1,14	0,09-2,82	0,78±0,44 ^b	0,68	0,16-1,98	0,15-1,35
Plaquetas (n ^o /μL) ¹	223,88±79,29 ^a	235,00	100,00-400,00	181,36±59,46 ^b	180,00	80,00-300,00	200,00-500,00
Proteína plasmática total (g/dL) ¹	9,02±0,70	9,00	7,50-10,00	9,13±0,91	9,00	7,00-10,00	6,00-8,00

¹ Comparação entre médias pelo teste t de Student; ² Comparação entre medianas pelo teste de Mann-Whitney U; DP – Desvio Padrão; Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indica diferença estatística (P<0,05); ³JAIN (1986).

Tabela 2. Resultados dos parâmetros bioquímicos dos grupos de cães microfilarêmicos e amicrofilarêmicos naturalmente infectados por *Dirofilaria immitis* provenientes do litoral de Pernambuco.

Parâmetros Bioquímicos	Microfilarêmicos (n=18)			Infecção Oculta (n=33)			Valores de Referência ³
	Média ± DP	Mediana	Intervalo	Média ± DP	Mediana	Intervalo	
Uréia (mg/dL) ¹	34,56±14,46	34,70	14,90-69,40	38,21±22,48	32,20	15,00-114,40	21,00-60,00
Creatinina (mg/dL) ¹	1,18±0,20	1,20	0,80-1,60	1,13±0,32	1,10	0,70-2,20	0,50-1,50
AST (UI/mL) ¹	46,68±24,17	47,30	15,20-110,70	48,68±21,74	47,50	13,40-95,10	20,00-67,00
ALT (UI/mL) ²	57,02±35,81	43,55	15,60-135,80	51,43±65,72	34,40	20,20-405,80	13,00-92,00
FA (UI/L) ¹	99,00±42,99	95,90	26,50-204,00	123,39±99,81	103,60	27,00-580,70	20,00-156,00
GGT (U/L) ²	7,45±8,15	4,65	1,00-30,20	4,46±5,22	2,20	0,30-23,10	1,20-10,00
P (mg/dL) ¹	4,12±1,26	4,10	2,50-6,60	3,84±2,38	3,00	1,50-10,50	2,50-5,00

¹ Comparação entre médias pelo teste t de Student; ² Comparação entre medianas pelo teste de Mann-Whitney U; DP – Desvio Padrão; Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indica diferença estatística (P<0,05); ³COLES (1984); BUSH (2004).

CAPÍTULO II

EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E IVERMECTINA NO TRATAMENTO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Dirofilaria immitis*

EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E IVERMECTINA NO TRATAMENTO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Dirofilaria immitis*

Nadine Louise Nicolau da Cruz¹; Lorena Adão Vescovi Séllos Costa²; Paola Teles Soares³; Leucio Câmara Alves⁴

^{1,4} Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Medicina Veterinária, Av. Dom Manuel de Medeiros S/N, CEP: 52171-930, Recife-PE

³ Médica Veterinária autônoma

² Médica Veterinária Radiologista-UFRPE

RESUMO

Dirofilariose canina tem sido responsável por problemas cardiopulmonares, como insuficiência cardíaca congestiva direita e até a morte dos animais infectados quando não são tratados. O único tratamento reconhecido como adulticida e microfilaricida é o dicloridrato de melarsomina, porém além de causar tromboembolismo nos animais tratados não se encontra disponível no mercado brasileiro. Desta forma alguns autores tem estudado tratamentos alternativos utilizando tetraciclina e lactonas macrocíclicas. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da combinação de Doxíciclina e Ivermectina em cães naturalmente infectados. Foram utilizados seis cães, provenientes do atendimento ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, destes 50% fêmeas, todos de raças variadas e adultos. Foram avaliados do ponto de vista clínico, submetidos ao exame sorológico SNAP® 4DX, teste rápido DPP® para Leishmaniose Visceral Canina, e pesquisa parasitológica de hematozoários e microfílarias circulantes. Os animais foram submetidos ao protocolo de tratamento com doxíciclina na dose de 5mg/kg a cada 12 horas durante 30 dias, e posteriormente ivermectina na dose de 0,006mg/kg uma vez por mês, por tempo indeterminado. Para avaliação da eficácia do tratamento foram realizadas avaliações clínicas e laboratoriais nos momentos zero, seis meses e doze meses pós tratamento. Além disso, em todos os momentos foram realizados exames hematológicos e bioquímicos e a cada seis meses testes sorológico e parasitológico para detecção de antígenos e microfílarias circulantes, respectivamente. Os resultados mostraram a associação utilizada levou a morte de parasitos adultos e microfílarias, contudo apenas 50% dos animais foram negativos para antígenos circulantes ao final dos 12 meses de tratamento.

Palavras chaves: Dirofilariose, terapêutica, *Wolbachia*

ABSTRACT

Canine heartworm disease has been responsible for cardiopulmonary problems, as right congestive heart failure and even death of infected animals when they are not treated. The only treatment recognized as adulticide and microfilaricide is melarsomine dihydrochloride, but in besides to causing thromboembolism in treated animals it is not available in the brazilian market. In this, way some authors have studied alternative treatments using tetracyclines and macrocyclic lactones. Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficacy of the combination of Doxycycline and Ivermectin in

naturally infected dogs. Six dogs from the ambulatory attendance of the Veterinary Hospital of the Federal Rural University of Pernambuco were used, of these 50% females, all of them races and adults. They were evaluated from the clinical point of view, submitted to the serological examination SNAP® 4DX, DPP® rapid test for Visceral Canine Leishmaniasis, and parasitological research for hematozoas and circulating microfilariae. The animals were submitted to treatment protocol a 5 mg / kg dose of doxycycline each 12 hours for 30 days, and posteriorly ivermectin at the dose of 0.006 mg / kg once a month for an indeterminate time. To evaluate the efficacy of the treatment, clinical and laboratory evaluations were performed the moment zero, six months and twelve months after treatment. In addition, hematological and biochemical tests were performed at all times and every six months serological and parasitological tests for the detection of circulating antigens and microfilaria, respectively. The results showed that the association used led to the death of adult and microfilaria parasites, however only 50% of the animals were negative for circulating antigens at the end of the 12 months of treatment.

Keywords: Heartworm, therapy, *Wolbachia*

1. INTRODUÇÃO

A infecção por *D. immitis* tem sido reportada como causa de disfunção múltipla nos animais infectados, podendo comprometer o pulmão, coração, com repercussão no fígado e rins (PAES-DE-ALMEIDA et al., 2003; PASCA et al., 2012; JANG et al., 2015) sendo comum os sinais de insuficiência cardíaca congestiva direita e a morte dos cães infectados (ATKINS, 2010).

A gravidade das lesões e as conseqüentes manifestações clínicas estão relacionadas com o número relativo de nematódeos adultos, assim como a duração da infecção e a interação hospedeiro-parasito (ATKINS, 2010; MORCHON et al., 2010). Sendo assim os sinais clínicos desenvolvem-se de forma gradual e, geralmente, têm início com uma tosse crônica que vai evoluindo para uma dispnéia moderada a severa, prostração e síncope pós-exercício ou excitação (VENCO et al., 2005).

Com o desenvolvimento da insuficiência cardíaca o animal pode apresentar, intolerância ao exercício, ascite, perda de peso progressiva e anorexia, (POLIZOPOULOU et al., 2000; KITAGAWA et al., 2000; CALVERT; THOMASON, 2008; AHS, 2014).

Desta forma, a terapêutica da dirofilariose canina tem como finalidade melhorar a condição clínica do animal e a eliminação de *D. immitis* com o mínimo de complicações durante e após o tratamento (McCALL; GUERRERO, 2010).

O dicloridrato de melarsomina é o único tratamento adulticida disponível sendo eficaz na eliminação de helmintos jovens maduros e imaturos (RAYNAUD, 1992; NELSON; COUTO, 2006), porém devido ao tromboembolismo (KRAMER et al., 2008) e problemas com sua eficácia, há um crescente interesse em tratamentos adulticidas alternativos (COLBY et al., 2011).

Protocolos de tratamento utilizando uma combinação de ivermectina e doxiciclina tem sido estudado, mostrando eficácia como adulticida e microfilaricida, quando comparado a administração desses fármacos isoladamente em animais naturalmente e experimentalmente infectados (BAZZOCCHI et al., 2008; GRANDI et al., 2010).

Estudos recentes tem demonstrado que a doxiciclina atua como adulticida nas infecções por *Wuchereria bancrofti*, (DEBRAH et al., 2007) *Onchocerca volvulus*, (HOERAUF et al., 2008), *Onchocerca ochengi*; (GILBERT et al., 2005) e *D. immitis* (McCALL et al., 2011), atuando contra *Wolbachia*, uma bactéria intracelular obrigatória simbiótica, (KRAMER et al., 2003) abrindo um novo capítulo no tratamento e controle de infecções filariais.

Atualmente a melarsomina não está disponível no mercado nacional, não existindo nenhum outro fármaco para o tratamento da dirofilariose canina. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do tratamento utilizando a combinação de Doxiciclina e Ivermectina em cães naturalmente infectados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos éticos

Os procedimentos foram realizados mediante aprovação da Comissão de Ética para Uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, segundo licença 039/2014.

2.2. Animais de estudo

Foram utilizados seis cães, provenientes do atendimento ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, destes 50% fêmeas, todos de raças variadas, adultos, sendo três idosos com idade entre sete e 10 anos e o restante com idade entre três e seis anos.

Os animais foram avaliados do ponto de vista clínico, seguindo as normas semiológicas observando as alterações sugestivas para dirofilariose, classificando os sinais clínicos de acordo com a AHS (2014).

Testes sorológicos para antígeno circulante de *D. immitis* (SNAP® 4DX⁶) e teste rápido, Dual Path Platform (DPP®) Leishmaniose Visceral Canina e parasitológico de hematozoários foram realizados em todos os animais.

Todos os animais foram submetidos a pesquisa de microfilárias circulantes de *D. immitis* através do Método Modificado de Knott (NEWTON; WRIGHT, 1956). Exames clínicos, imaginológicos e avaliação cardiológica foram realizados, sendo considerados aptos ao protocolo de tratamento, além disso nenhum animal havia utilizado doxiciclina e lactonas macrocíclicas nos últimos seis meses.

2.3. Protocolo de tratamento

Os animais foram submetidos ao protocolo de tratamento com doxiciclina (Doxifin®, Ourofino) na dose de 5mg/kg a cada 12 horas, via oral, durante 30 dias, e posteriormente ivermectina (TopDog®, Ourofino) na dose de 0,006mg/kg uma vez por mês, via oral, por tempo indeterminado.

Todos os animais receberam praziquantel, pamoato de pirantel e febantel o (TopDog®, Ourofino) como parte do controle anti-helmíntico mensal.

Para avaliação da eficácia do tratamento foram realizadas avaliações clínicas e laboratoriais nos momentos zero (M0), seis meses (M6) e doze meses (M12) pós tratamento. Além disso, a cada seis meses foram realizados os testes sorológico para detecção de antígenos circulantes e Método Modificado de Knott para pesquisa de microfilárias circulantes.

Como prevenção foi recomendado que todos os animais utilizassem coleira repelente a base de Deltametrina (Scalibor®), durante todo o período do tratamento e pós-tratamento como profilaxia.

2.4. Análises laboratoriais

As amostras de sangue foram coletadas através de venopunção cefálica e transferidas para tubos tipo vacutainer siliconizados⁷ com e sem anticoagulante ácido

⁶ kit SNAP® 4DX – Biobrasil, BR

⁷ Tubo Vacutainer BD, São Paulo-SP

etilenodiaminotetraacético (EDTA)⁸. Os hemogramas foram realizadas utilizando contador automático da marca Rocher® (modelo POCH 100 IV)⁹. Os soros foram encaminhados para processamento bioquímico para determinação de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), Fostatase alcalina (FA), uréia, creatinina, Gama glutamil transferase (GGT) e Fósforo (P), através do método cinético e colorimétrico utilizando analisador bioquímico automático ADVIA 1800-Siemens¹⁰, realizado de acordo com o fabricante. Os resultados dos hemogramas foram confrontados com os valores de referência citados por Jain (1986) e Coles (1984), já os bioquímicos por Bush (2004).

3. RESULTADOS

O resultado da avaliação clínica revelou que 50% (3/6) dos animais apresentaram doença respiratória caracterizada por tosse seca não produtiva, 83,3% (5/6) com cansaço, em 33,3% (2/6) emagrecimento e 16,6% (1/6) destes animais apresentaram ascite.

Apesar dos sinais clínicos apresentados, 83,3% (5/6) foram classificados com grau leve segundo a American Heartworm Society (2014) e 16,6% (1/6) dos animais apresentaram grau severo.

Todos os animais responderam bem ao tratamento, sem complicações e com melhora progressiva dos sinais clínicos.

Em relação ao exame sorológico, todos os animais apresentavam-se positivos para pesquisa de antígenos circulantes no momento zero, após seis meses apenas 16,6% (1/6) foram negativos, e 50% (3/3) foram negativos após 12 meses.

A presença de microfilárias de *D. immitis*, com quantidades variando entre 150 a 37.100 mf/ml foi observada no M0 (Tabela 1). Após o tratamento um decréscimo no número de microfilárias circulantes foi observado em 100 % dos animais, sendo que 66,6% (4/6) dos animais foram negativos a presença de microfilarias no M6 e M12.

Vale salientar que um dos animais que apresentava-se negativo no M6 apresentou microfilárias circulantes no M12.

Resultados negativos foram observados no teste rápido e no exame parasitológico para pesquisa de hematozoário.

⁸ Hemstap, LABTEST, Lagoa Santa-Minas Gerais

⁹ Contador automático POCH 100 IV Roche, Rio de Janeiro-RJ

¹⁰ ADVIA 1800-Siemens Healthcare Diagnostics, Erlange, Germany

Tabela 1. Pesquisa de microfilárias circulantes através do método modificado de Knott^a e pesquisa de antígeno circulante no ensaio imunoenzimático em cães naturalmente infectados com *D. immitis* tratados com a combinação de doxiciclina e ivermectina.

Animais	Tempo de Tratamento				
	M0	M6	SNAP M6	M12	SNAP M12
1	450	0	Positivo	0	Positivo
2	37100	150	Positivo	0	Negativo
3	3100	0	Positivo	0	Negativo
4	5950	0	Negativo	0	Negativo
5	150	140	Positivo	3100	Positivo
6	7200	0	Positivo	82500	Positivo

^aNúmero de mf/ml

Em relação à hematimetria no momento M0 apenas 16,6% dos animais apresentaram anemia segundo os valores da hemoglobina e hematócrito e 50% (3/3) apresentaram eritrocitose. No M6 não houve diferença na quantidade de animais com anemia e eritrocitose, porém no M12 os valores voltaram à normalidade, apenas um dos animais 16,6% (1/6) apresentou o valor de hemoglobina abaixo do valor de referência (Tabela 2).

No que concerne ao VGM, todos os animais apresentaram o valor abaixo da referência no M0 e no M6 83,3% (5/6) apresentaram microcitose, retornando aos valores normais no M12, enquanto que os valores de CHGM estavam dentro dos valores de referência no M0, porém no M6 16,6% (1/6) dos animais apresentaram valores superiores aqueles de referência e no M12 hipocromia foi observada em 50% (3/3) dos animais.

Com relação à leucometria, no M0 33,3% (2/6) dos animais avaliados apresentaram leucocitose, bem como eosinofilia. No M6 apenas um dos animais 16,6% (1/6) apresentou leucocitose, e no M12 todos estavam dentro do valor de referência. No M6 e M12 33,3% (2/6) estavam com eosinofilia, contudo um dos animais só apresentou no M12 devido a possível reinfecção. E 16,6% (1/6) apresentou aneosinofilia.

Neutrofilia foi encontrada em 16,6% (1/6) no M0, retornando aos valores normais no M6 e no M12 apenas 16,6% (1/6) apresentou neutrofilia. Monocitose foi observada no M0 em 33,3% (2/6) dos animais, no M6 todos normalizaram e no M12 16,6% (1/6) apresentaram os valores abaixo da normalidade.

Apenas 16,6% (1/6) dos cães avaliados apresentaram trombocitopenia no momento M0, contudo 33,3% (2/6) apresentaram este tipo de alteração no M6 e M12. Hiperproteinemia foi observado em 66,6% no M0, e 100% no M6 e M12.

Na avaliação da bioquímica sérica (Tabela 3) foi observado que em relação a dosagem de uréia houve um aumento no M6 em 33,3% (2/6) dos animais. O AST estava aumentado no M0 em 16,6%, (1/6) no M6 em 50% e no M12 em 33,3% (2/6) dos animais. No ALT apenas 16,6% (1/6) apresentou aumento no M0, nos outros momentos os parâmetros estavam dentro dos valores de referência.

Valores de GGT sem alteração foi observado 66,66% dos animais no M0 e 33,3% (2/6) apresentavam valores discordantes daqueles referenciais, visibilizado em apenas um animal no M6, evoluindo para normalidade em 100% dos animais no M12.

Em relação ao fósforo apenas no M6 observou-se alterações, com 33,3% (2/6) dos animais apresentando hipofosfatemia, no M12 todos estavam dentro dos valores de referência.

4. DISCUSSÃO

Os sinais clínicos aqui observados foram compatíveis com aqueles observados por Atwell, (1988); Venco et al., (2005), que reportaram além de animais assintomáticos, tosse crônica que vai evoluindo para dispneia, perda de peso, prostração e intolerância a exercício. Por outro lado, a perda de peso e ascite evidenciados em um dos animais estudados pode caracterizar insuficiência cardíaca congestiva direita relatada em animais com dirofilariose crônica (POLIZOPOULOU et al., 2000; KITAGAWA et al., 2000; CALVERT; THOMASON, 2008).

Apesar da boa resposta ao tratamento e prognóstico favorável, com remissão dos sinais clínicos, as manifestações clínicas resultantes da infecção natural por *D. immitis* não comprometeram o estado geral dos animais tratados.

Segundo Mctier et al, (1994), a melhora clínica do paciente é possível sem eliminar por completo os parasitos adultos, principalmente aqueles que foram tratados com doxiciclina e receberam tratamento preventivo a base de lactonas macrocíclicas durante e depois da terapia.

A soroconversão aqui observada é compatível com os achados de Ettinger e Feldman (2004), que asseguraram que a concentração de antígenos baixa para níveis indetectáveis em animais tratados, particularmente após seis meses. A variação na soroconversão e até mesmo aumento e posterior detecção de antígenos circulantes pode

ser explicada pela morte recente de nematódeos adultos (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

O decréscimo no número de microfilárias circulantes observado nos animais tratados está em concordância com Grandi et al., (2010) que observaram infecção oculta após seis a nove meses após o tratamento com doxiciclina devido a supressão da microfilaríemia (BAZZOCCHI et al., 2008; McCALL et al., 2008).

Não obstante, lactonas macrocíclicas administradas como microfilaricida podem causar uma rápida diminuição do número de microfilárias (AHS, 2014).

Ainda não foi esclarecida a razão dessas drogas funcionarem melhor combinadas, eliminando uma larga população de parasitos em relativamente curto período de tempo (8 a 10 meses) (MENOZZI et al., 2015). Kramer e Genchi (2014) sugeriram que pode ser simplesmente por um efeito somatório devido ao sinergismos que há entre essas drogas.

A recorrência da microfilaremia após seis meses aqui relatada, pode ser devido à incompleta ação adulticida, a evolução de formas imaturas, reinfecção ou um lapso temporal na quimioprofilaxia (AHS, 2014), sendo este último a provável causa para a reinfecção de 33,3% dos animais aqui avaliados.

O animal que apresentou anemia regenerativa foi o único observado com grau severo na classificação de sinais clínicos (AHS, 2014), provavelmente o mesmo trazia uma alta carga parasitária em comparação aos outros animais, visto que as manifestações clínicas e gravidade das lesões estão relacionadas ao número de nematódeos adultos, assim como a duração da infecção e a interação hospedeiro-parasito (ATKINS, 2010; MORCHON et al., 2010).

De acordo com os achados hematológicos, observou se que após os 12 meses de tratamento alguns dos valores que se encontravam alterados, passaram a estar dentro dos valores de referência, com exceção do CHGM, onde 50% dos animais apresentaram hipocromia, contudo não há uma explicação consistente que justifique essa alteração sem que alterassem outros parâmetros hematimétricos.

Outro parâmetro que permaneceu alterado foi dos eosinófilos, vale salientar que este parâmetro persistiu apenas nos animais onde não ocorreu a soroconversão, esta alteração se deve a ligação das proteínas de superfície às membranas de parasitos, particularmente estágios larvários, fazendo parte da imunidade inata (MORCHON et al., 2007; OLEAGA et al., 2009; THRALL et al., 2015).

Em estudo experimental Marcos-Atxutegi e colaboradores (2003) mostraram que houve aumento nas populações de eosinófilos e neutrófilos, quando o sistema imunológico foi estimulado pela migração das L3 e pelos antígenos dos parasitos adultos. Os neutrófilos se acumularam nos rins e nas paredes das artérias pulmonares durante a infecção, sugerindo que os neutrófilos participam do desenvolvimento das reações inflamatórias na dirofilariose (MARCOS-ATXUTEGI et al., 2003; SIMÓN et al., 2007), além disso essa alteração pode ocorrer devido à liberação de produtos do parasito ou ainda à morte das microfilárias (NIWETPATHOMWAT et al., 2007).

Um aspecto interessante, foi a pequena proporção de animais que apresentaram neutrofilia incompatível com desenvolvimento das reações inflamatórias que ocorrem durante a infecção por *D. immitis* (SIMÓN et al., 2007).

A trombocitopenia persistente no M12 pode ser justificada pela ocorrência de tromboembolismo originado pela libertação de fragmentos de parasitos mortos dentro da vasculatura pulmonar, que provocam trombose e obstrução ao nível das artérias pulmonares, exarcebando os fenômenos de adesão plaquetária e ativação de plaquetas induzindo o início da cascata de coagulação (WARE, 2011; MEIRELES et al., 2014).

A hiperproteinemia encontrada pode ser devido a presença do parasito adulto e microfilária circulante (BICHARD; SHERDING, 2008), de acordo com Nelson, Couto (2006) e Bush (2004) as alterações nos níveis de proteínas séricas podem estar relacionadas ao tipo de alimentação, desidratação, vômito ou pelo aumento das globulinas. Entretanto, serão necessário novos estudos para melhor compreensão da patogênese dessa alteração, pois ela estava presente em todos os animais nos vários momentos do tratamento.

O aumento da ureia no M6 pode ser justificado por deposição de imunocomplexos nos rins (PASCA et al., 2012), como observado por Kramer et al. (2005) e Simón et al. (2007) que relataram a presença da *Wolbachia sp.* nas células dos túbulos renais e glomérulos, assim como a proteína de superfície desta bactéria (NELSON et al., 2005; SIMÓN et al., 2007).

Os níveis séricos de ALT apresentavam-se aumentados em 16,6% dos animais indicando lesão hepática, contudo para uma avaliação mais precisa de lesão de hepatócitos utiliza-se ALT por ser mais hepato-específico que o AST, pois este indica lesão a nível de hepatócitos e células da musculatura esquelética e cardíaca (THRALL et al., 2015). Desta forma as alterações aqui observadas nos níveis de AST são

inconclusivas, sendo o único parâmetro que permaneceu alterado ao final do tratamento em 33,3% dos animais.

Da mesma forma o aumento e diminuição de GGT nos momentos estudados não demonstrou um perfil condizente com lesão hepática, já que não houve alteração conjunta de GGT e ALT.

Um dado importante que esclarece a razão da elevação dos níveis séricos da ureia aqui encontrada e conseqüentemente lesão renal foi a hipofosfatemia em 33,3% no M6. Anormalidades na reabsorção de fosfato na filtração glomerular nos túbulos renais pode promover hipofosfatemia, que pode ocorrer devido a distúrbios no transporte tubular renal (THRALL et al., 2015).

Com isso, conclui-se que o protocolo de tratamento instituído com associação de doxiciclina e ivermectina promoveu a cura em 50% dos animais, seguindo os critérios da AHS (2014) que preconiza como finalidade da terapêutica melhorar a condição clínica do animal e eliminação de *D. immitis* com o mínimo de complicações durante e após o tratamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **Current canine guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs**, 2014. Disponível em: < <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines> >. Acessado em: 26 de junho de 2016.

ATKINS, C. Heartworm Disease. In: STEPHEN, E.J.; FELDMAN, E.C. **Eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 7th Ed. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier Inc. 2010: 1353-1380.

ATWELL, R.B.; BUORO, I.B.J. Caval syndrome. In: BOREMAN, P.F.L.; ATWELL, R.B. (eds): **Dirofilaria**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988: 191-203.

BAZZOCCHI, C. et al. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. **International Journal for Parasitology**. vol. 38, p. 1401-1410, 2008.

BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders- Clínica de Pequenos Animais**. 3ª ed., edit. Roca, Brasil, 2008, 2072p.

BUSH, B.M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. 371p.

CALVERT, C.A.; THOMASON, J. Heartworm Disease. In: TILLEY, L.P.; FRANCIS, J.; SMITH, W.K.; OYAMA, M.A.; SLEEPER, M.M. **Eds. Manual of canine and feline cardiology**. 4th ed. Saunders Elsevier Inc. 2008: 183-199.

COLBY, K.N. Diagnostic, treatment, and prevention protocols for canine heartworm infection in animal sheltering agencies. **Veterinary Parasitology**, vol. 176, p. 333-341, 2011.

COLES, E.H. **Patologia Clínica veterinária**. 3ed. São Paulo: Manole, 1984, 566p.

DEBRAH, A.Y. Macrofilaricidal effect of 4 weeks of treatment with doxycycline on *Wuchereria bancrofti*. **Tropical Medicine & International Health**, vol. 12, p. 1433-1441, 2007.

ETTINGER, S.; FELDMAN, E. **Textbook of veterinary internal medicine**. Volume 2. 6th ed. Saunders Elsevier, 2004, p.1118-1144.

GILBERT, J. Antibiotic chemotherapy of onchocerciasis: in a bovine model, killing of adult parasites requires a sustained depletion of endosymbiotic bacteria (*Wolbachia* species). **The Journal of Infectious Diseases**, vol.192, p. 1483-1493, 2005.

GRANDI, G. et al. A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). **Veterinary Parasitology**. vol.169, p.347-351, 2010.

HOERAUF, A. *Wolbachia* endobacteria depletion by doxycycline as antifilarial therapy has macrofilaricidal activity in onchocerciasis: a randomized placebo-controlled study. **Medical Microbiology and Immunology**. vol.197, p. 295-311, 2008.

JAIN, M.C. The dog: Normal hematology with comments on response to disease. In: JAIN, M.C. (Ed.), **Veterinary Hematology**. Fourth ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, pp. 103-125, 1986.

JANG, H.M.; LEE, H.C.; JUNG, D.I. A case of canine ectopic parasitism of Heartworm in the systemic circulation. **Journal of Veterinary Clinics**. vol.32:4, p. 347-351, 2015.

KITAGAWA, H. et al. Plasma renin activities, angiotensin II concentrations, atrial natriuretic peptide concentrations and cardiopulmonary function values in dogs with severe heartworm disease. **The Journal of Veterinary Medical Science**. vol.62, p.453-455, 2000.

KRAMER, L.; GENCHI, C. Where are we with *Wolbachia* and doxycycline: An in-depth review of the current state of our knowledge. **Veterinary Parasitology**, vol. 206, p.1-4, 2014.

KRAMER, L. H. et al. Immunohistochemical/immunogold detection and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* using a polyclonal antiserum raised against WSP (*Wolbachia* surface protein). **Parasitology Research**. v.89, p.381-386, 2003.

KRAMER, L.H. et al. Immune response to and tissue localization of the Wolbachia Surface Protein (WSP) in dogs with natural heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. **Veterinary Immunology Immunopathology**. vol. 106, p.303-308, 2005.

KRAMER, L. et al. Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. **Veterinary Parasitology**. vol. 158, p.191-195, 2008.

MARCOS-ATXUTEGI, C. et al. Th1 response in BALB/c mice immunized with *Dirofilaria immitis* soluble antigens: a possible role for *Wolbachia*? **Veterinary Parasitology**, vol.112, p.117-130, 2003.

McCALL, J.W. et al. Heartworm and Wolbachia: therapeutic implications. **Veterinary Parasitology**. vol.158, p.204-214, 2008.

McCALL, J.W.; GUERRERO, J. Diagnosis, Prevention and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Guidelines for Canine Heartworm Disease**. American Heartworm Society. p.1-14, 2010.

McCALL, J.W. et al. Effects of doxycycline on early infections of *Dirofilaria immitis* in dogs. **Veterinary Parasitology**. vol.176, p.361-367, 2011.

McTIER, T.L. et al. Use of melarsomine dihydrochloride (RM 340) for adulticidal treatment of dogs with naturally acquired infections of *Dirofilaria immitis* and for clinical prophylaxis during reexposure for 1 year. **Veterinary Parasitology**. vol.55, p.221-233, 1994.

MEIRELES, J.; PAULOS, F.; SERRÃO, I. Dirofilariose canina e felina. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**. vol.109:591-592, p.70-78, 2014.

MENOZZI, A. Doxycycline levels and anti-Wolbachia antibodies in sera from dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* and treated with a combination of ivermectin/doxycycline. **Veterinary Parasitology**, vol. 209, p. 281-284, 2015.

MORCHÓN, R. et al. Dogs with patent *Dirofilaria immitis* infection have higher expression of circulating IL-4, IL-10 and iNOS mRNA than those with occult infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. vol.115, p.184-188, 2007.

MORCHÓN, R. et al. Adult *Dirofilaria immitis* excretory/secretory antigens upregulate the production of prostaglandin E2 and downregulate monocyte transmigration in an "in vitro" model of vascular endothelial cell cultures. **Veterinary Parasitology**. vol.170, p.331-335, 2010.

NELSON, C.T. et al. Executive Board of the American Heartworm Society. 2005 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Veterinary Parasitology**. vol. 133, n.2-3, p.255-66, 2005.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina interna de pequenos animais. 3ª ed. São Paulo: Elsevier, 2006, 590p.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **The Journal of Parasitology**. v.42, p.246-258, 1956.

NIWETPATHOMWAT, A. et al. A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. **Research in Veterinary Science**. vol.82, p.364-369, 2007.

OLEAGA, A. et al. Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**. vol.166, p.134-141, 2009.

OLIVEIRA, I.N.V. et al. Perfil hematológico e bioquímico de cães infectados por *Dirofilaria immitis* da localidade da Ilha de Algodoal, Pará. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, vol.35(Supl.2), p.74-80, 2013.

PAES-DE-ALMEIDA, E.C. et al. Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Veterinary Parasitology**. vol.113, p.157-168, 2003.

PASCA S.A. et al. Vascular, hepatic and renal lesions by *Dirofilaria immitis* invasion in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol.64, p.841-846, 2012.

POLIZOPOULOUS, Z.S. et al. Clinical and laboratory observations in 91 dogs infected with *Dirofilaria immitis* in northern Greece. **The Veterinary Record**, p.466-469, 2000.

RANJBAR-BAHADORI, S.M. et al. Clinic-Pathologic Evaluation of the Canine Heartworm Infestation. **The Journal of Parasitology**. vol.5, p.90-98, 2010.

RAYNAUD J. P. Thiacetarsamida (adulticide) Versus Melarsomine (RM 340) Developed as Macroparicidal (adulticid and larvicid) to Cure Canine Heartworm Infection in Dogs. **Annals of veterinary research**, vol.23, p. 1-25, 1992.

SIMÓN, F. et al. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. **Veterinary Research Communications**. v.31, p.161-171, 2007.

THRALL, M.A. et al. **Hematologia e Bioquímica –Clínica Veterinária**, 2ª ed. Roca, 2015, 688p.

VENCO, L.; KRAMER, L.; GENCHI, C. Heartworm disease in dogs: unusual clinical cases. **Veterinary Parasitology**. vol.133, p.207-218, 2005.

WARE, W.A. **Cardiovascular Disease in Small Animal Medicine** (2nd edition). CRC Press. 396 p. 2011.

Tabela 2. Tabela dos parâmetros hematológicos de cães naturalmente infectados submetidos ao protocolo de tratamento com associação de doxiciclina e ivermectina nos momentos M0, M6 e M12.

Cães		1			2			3			4			5			6		
VALORES PADRÃO		M0	M6	M12	M0	M6	M12	M0	M6	M12	M0	M6	M12	M0	M6	M12	M0	M6	M12
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	5,5 a 8,5	9,79	11,33	7,69	10,39	9,49	8,6	5,54	5,21	6,38	6,96	7,25	7,98	7,38	11,19	7,43	9,9	7,4	5,61
Hemoglobina (g/dL)	12 a 18	17,8	18	14,1	17,5	17	14,6	9,3	10,2	13,6	13,6	16	17	14	17,2	15,6	15,5	13	11,1
Hematócrito (%)	37 a 55	45	47	47,2	52	51	52,8	28	30	44,3	40	49	53	44	49	53,6	48	40	38,8
VGM (μ ³)	60 a 77	45,9	41,5	61	50	53,7	61	50,5	57,6	69	57,5	67,5	66,4	59,6	43,8	72	48,8	54	69
CHGM (%)	31 a 35	32,8	38,3	31	33,6	33,3	27,6	33,2	34	31	34	32,6	32	31,8	35,1	29	32,2	32,5	28,6
Leucócitos (n°/mm ³)	6,0 a 17,0	14,5	10,6	13,1	28,7	13,5	13,2	20,3	19,6	17,4	10,9	7,7	7,7	12,5	10,4	9,7	9,5	10,4	13,7
Eosinófilos (n°/mm ³)	100 a 1250	435	3604	4061	2583	1080	0	7511	5684	522	218	385	154	250	312	485	380	312	2877
Segmentados (n°/mm ³)	3000 a 11500	10150	4028	6681	21238	8100	11352	8729	10584	12700	7630	5544	5698	9000	8632	6984	6650	6656	8768
Linfócitos (n°/mm ³)	1000 a 4800	2320	2438	2227	3157	3510	1320	3045	3136	3480	2180	1001	1078	2250	1248	1261	1425	2184	1233
Monócitos (n°/mm ³)	150 a 1350	1595	530	131	1722	810	528	1.015	196	696	872	770	770	875	208	970	1045	1248	822
Plaquetas (n°/mm ³)	200 a 500	230	110	249	180	120	80	330	240	282	250	270	275	230	240	254	210	230	153
Proteína plasmática total (g/dL)	6,0 a 8,0	8,5	8,8	8,6	7,5	8,5	8,5	10	>10	10	7,0	8,5	8,5	8,5	9,5	8,5	>10	10	10

Tabela 3. Tabela dos parâmetros bioquímicos de cães naturalmente infectados submetidos ao protocolo de tratamento com associação de doxiciclina e ivermectina nos momentos M0, M6 e M12.

CÃES		1			2			3			4			5			6		
VALORES PADRÃO		M0	M6	M12	M0	M6	M12	M0	M6	M12	M0	M6	M12	M0	M6	M12	M0	M6	M12
Uréia (mg/dL)	21 a 60	40,4	23	24,2	32,3	78,7	35,5	39,2	76,5	41,4	36,4	59,3	29,6	33,7	49,9	38,8	27,9	50,2	37,6
Creatinina (mg/ dL)	0,5 a 1,5	1,3	1,3	1,2	1,5	0,92	1,29	1	1,41	1,45	0,8	1	1	1,2	1,2	1,1	1,3	1	0,8
AST/ TGO (UI/ mL)	20 a 67	43	17,3	19,4	54,5	81,5	45,2	45,4	77,9	26,7	55,2	25,3	36,3	110,7	39,9	68,3	48,5	57,9	41,9
ALT/ TGP (UI/ mL)	13 a 92	132,9	33,5	42,6	61,8	36,1	21,5	41	39,4	20,1	48,4	51,3	28,3	79,4	43,8	51,9	47,3	34,7	30,2
Fosfatase Alcalina (UI/L)	20 a 156	90,1	90,7	107	40,6	20,4	106,1	107	106,1	69,4	27	90,1	112,2	112,2	106,1	76,6	121,8	90,9	53,3
GGT (U/L)	1,2 a 10,0	2,3	0,7	3,8	2,5	2,2	4,1	1	2,7	3	3,9	3	3,3	14,1	2,2	4,8	1,6	6,9	2,8
P (mg/dL)	2,5 a 5	2,7	5	4,6	3	2,1	2,8	4	0,45	3,6	2,6	5	2,5	4,7	2,3	3,1	3,4	5,0	4,4