



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização da resposta imunoinflamatória na coinfeção
Dirofilaria spp. – *Wolbachia* spp. no cão

Ana Carolina Pacheco

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
EM ESPECIALIDADE EM PARASITOLOGIA MÉDICA**

ABRIL, 2016



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização da resposta imunoinflamatória na coinfeção
Dirofilaria spp. – *Wolbachia* spp. no cão

Autor: Ana Carolina Pacheco

Orientador: Professora Doutora Silvana Maria Duarte Belo

Coorientador: Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas em Especialidade em Parasitologia Médica

Apoio financeiro da Fundação da Ciência e Tecnologia através do projeto
PTDC/SAUSAP/113523/2009

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de algum modo, contribuíram para que pudesse realizar e concluir este mestrado.

À minha Orientadora, Professora Doutora Silvana Belo e coorientador, Investigador Doutor Marcelo Silva por toda a ajuda, disponibilidade e paciência durante todo o meu percurso.

Às professoras de Helminologia e Malacologia Médicas, especialmente à Professora Doutora Manuela Calado, por todo o auxílio na realização do trabalho e toda a paciência e simpatia que sempre demonstrou.

Aos meus colegas de Helminologia e Malacologia Médicas e de Clínica Tropical pela ajuda no laboratório.

A todos os professores que partilharam os seus conhecimentos durante o VIII Mestrado em Ciências Biomédicas.

À minha família, amigos, colegas de mestrado e namorado pelo apoio.

A todos os acima mencionados e a todos os que de algum modo marcaram a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!!!!

Resumo

A Dirofilariose é uma doença zoonótica de dispersão mundial que infeta animais e humanos por todo o Mundo e que tem vindo a aumentar os seus locais de dispersão. É causada principalmente pelas espécies *Dirofilaria immitis* e *D. repens*. Para o desenvolvimento e reprodução, estes parasitas necessitam de uma bactéria Gram-negativa endossimbionte *Wolbachia* spp., encontrada na maioria das espécies de filárias conhecidas. Sabe-se que a presença da bactéria no organismo do animal está associada a uma resposta imunoinflamatória com ativação de citocinas pró-inflamatórias e aumento de imunoglobulinas específicas direcionando a resposta inflamatória para Th1 e consequentemente aumentando a patologia.

O tratamento da dirofilariose canina, causada por *D. immitis*, consiste no uso de fármacos antiparasitários que, em animais com elevada carga parasitária, podem causar reações adversas graves e fatais. A deteção atempada da presença da bactéria no animal e o uso de antibacterianos pode prevenir estas reações, aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo a taxa de mortalidade.

O nosso estudo teve como principal objetivo caracterizar o perfil de resposta imunoinflamatória durante a coinfeção *Dirofilaria-Wolbachia* spp. e identificar potenciais biomarcadores preditivos da presença de *Wolbachia* spp. Para tal, 245 amostras de sangue de canídeos (originários de canis e associações de animais) foram analisadas para a deteção de anticorpos do tipo IgG e subclasses (IgG₁ e IgG₂) e da Proteína C-reativa (CRP) através da técnica de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

A nível da resposta humoral, anticorpos do tipo IgG e IgG₁, os animais coinfectados (*D. immitis-Wolbachia* spp.) apresentavam níveis séricos mais elevados dos que os com infeção simples (apenas *D. immitis*) mas sem diferenças significativas. Perfil semelhante foi observado para os anticorpos do tipo IgG₂. No entanto, em relação à concentração da CRP, a coinfeção *Wolbachia* spp. induzia um aumento significativo (Mann-Whitney, $P < 0,05$) em comparação com a dos animais infetados apenas por *D. immitis* o que reforça a potencial aplicação da CRP como biomarcador de *Wolbachia* spp. em animais infetados por *D. immitis*. A sua deteção pelo método enzimático ELISA, técnica de elevada sensibilidade e de fácil execução, é uma vantagem adicional, uma vez que poderá fornecer um resultado fiável e rápido, informação relevante para o médico Veterinário para a abordagem terapêutica nos animais com dirofilariose.

Palavras-Chave: Coinfeção, *Dirofilaria immitis*, *Wolbachia* spp., biomarcadores, cão.

Abstract

Heartworm disease is a zoonotic disease of worldwide dispersion that infects animals and humans throughout the world and has been increasing its area of incidence. It is mainly caused by *Dirofilaria immitis* and *D. repens*. For the development and reproduction, these parasites require a Gram-negative bacteria endosymbiont *Wolbachia* spp., found in most known species of filaria. It is known that the presence of this bacteria on the animal's body is associated with an immunoinflammatory response that activates pro-inflammatory cytokines and increases specific immunoglobulins polarizing the inflammatory response in the Th1 subset and consequently increasing the pathology.

The treatment of canine heartworm disease, caused by *D. immitis* is based on antiparasitic drugs, however in dogs with high levels of parasitemia can cause the appearance of severe adverse reactions and even death. The prompt detection of the presence of bacteria in infected animals and the use of antibacterial drugs can prevent these reactions, increasing the treatment efficacy and reducing the mortality rate.

Our study aimed to characterize the immunoinflammatory response profile that occurs during co-infection *Dirofilaria-Wolbachia* spp. and identifying potential predictive biomarkers for the presence of *Wolbachia* spp. For this purpose, 245 canine blood samples (collected in kennels and animal associations) were analysed for the detection of IgG antibodies and subclasses (IgG₁ and IgG₂) and C-reactive protein (CRP) through the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The analysis of humoral response, IgG and IgG₁ antibodies, demonstrate that the co-infected animals (*D. immitis-Wolbachia* spp.) had higher IgGs antibody levels than those with single infection (only *D. immitis*) but without significant differences. A similar profile was observed for IgG₂ antibodies. However, in relation to the concentration of CRP, *Wolbachia* co-infection induces a significant increase (Mann-Whitney test, $P < 0,05$) in comparison with animals infected only by *D. immitis* subjecting the potential application of CRP as a biomarker of *Wolbachia* spp. in animals infected by *D. immitis*. It's detection by the enzymatic ELISA method, a highly sensitive test and easy to perform, has an additional advantage as it can provide reliable and fast result, which are relevant to the Veterinarians for selecting the therapeutic approach in animals with heartworm disease.

Keywords: Co-infection, *Dirofilaria immitis*, *Wolbachia* spp., biomarkers, dog.

Índice Geral

Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract.....	IV
Índice Geral.....	V
Índice de Figura	VII
Índice de Tabelas	IX
Lista de abreviaturas	X
1.Introdução	1
1.1. Agentes etiológicos da dirofilariose.....	2
1.1.1. Taxonomia de <i>Dirofilaria</i> spp.....	3
1.1.2. Características morfológicas de <i>Dirofilaria</i> spp.	3
1.1.3. Ciclo biológico de <i>Dirofilaria</i> spp.	5
1.1.4. Distribuição geográfica da dirofilariose	9
1.1.5. Patologia da dirofilariose.....	13
1.1.6. Métodos de diagnóstico da dirofilariose	16
1.1.6.1. Métodos parasitológicos	17
1.1.6.2. Métodos serológicos	19
1.1.6.3. Métodos moleculares	21
1.1.6.4. Métodos complementares	21
1.2. <i>Wolbachia</i> spp.	23
1.3. Interação <i>Dirofilaria</i> spp.- <i>Wolbachia</i> spp.	25
1.4. Profilaxia e Tratamento da dirofilariose	28
2. Objetivos.....	31
3. Material e Métodos	33
3.1. Caracterização demográfica das amostras	34
3.2. Pesquisa de infecção por <i>Dirofilaria</i> spp. e <i>Wolbachia</i> spp.....	35
3.2.1. Extração de ADN	35
3.2.2. Detecção de <i>Dirofilaria</i> spp.	36

3.2.3. Detecção de <i>Wolbachia</i> spp.	37
3.3. Análise da resposta imunoinflamatória	38
3.3.1. Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Dirofilaria immitis</i> por ELISA	38
3.3.2. Detecção de anticorpos IgG ₁ e IgG ₂ anti- <i>Dirofilaria immitis</i> por ELISA	40
3.3.3. Detecção da Proteína C-Reativa por ELISA.....	40
3.4. Considerações Éticas e Legais.....	40
3.5. Análise Estatística.....	41
4. Resultados.....	42
4.1. População canina analisada	43
4.1.1. Infecção por <i>Dirofilaria immitis</i>	43
4.1.2. Presença de <i>Wolbachia</i> spp. em amostras positivas para <i>Dirofilaria immitis</i>	44
4.2. Caracterização da análise imunoinflamatória.....	45
4.2.1. Resposta imune humoral – anticorpos IgG anti- <i>Dirofilaria immitis</i>	45
4.2.2. Resposta imune – anticorpos IgG ₁ e IgG ₂ anti- <i>Dirofilaria immitis</i>	48
4.2.2. Análise da Proteína C-Reativa nos soros dos canídeos.....	54
5. Discussão e Conclusões	57
6. Referências bibliográficas.....	63

Índice de Figura

Figura 1: Parasitas adultos de <i>Dirofilaria immitis</i>	4
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Dirofilaria immitis</i>	7
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Dirofilaria repens</i>	9
Figura 4: Distribuição mundial da dirofilariose canina.....	10
Figura 5: Distribuição de dirofilariose por <i>Dirofilaria immitis</i> em cães em zonas endémicas até 2001 e entre 2001 e 2011.....	11
Figura 6: Distribuição de dirofilariose por <i>Dirofilaria repens</i> em cães em zonas endémicas até 2001 e entre 2001 e 2011.....	12
Figura 7: Prevalência de <i>Dirofilaria immitis</i> em cães assintomáticos e sintomáticos nas várias regiões de Portugal Continental.....	13
Figura 8A: Parasitas adultos de <i>Dirofilaria immitis</i> no coração de um cão com dirofilariose....	15
Figura 8B: Necropsia de um cão vítima de tromboembolismo numa artéria pulmonar por <i>Dirofilaria immitis</i>	15
Figura 9A: Tecido subcutâneo de um cão com infeção massiva por <i>Dirofilaria repens</i>	16
Figura 9B: Nódulo no tecido subcutâneo de um cão contendo parasitas adultos <i>Dirofilaria repens</i>	16
Figura 10: Microfilaria de <i>Dirofilaria immitis</i> visualizada pela técnica de gota espessa.....	18
Figura 11: Extremidades posteriores de microfíliarias de <i>Dirofilaria immitis</i> e de <i>Dirofilaria repens</i> (visualizadas pela técnica de concentração de Knott modificada).....	19
Figura 12: Microfíliarias de <i>Dirofilaria immitis</i> e <i>Dirofilaria repens</i> (visualizadas pela técnica da Fosfatase Ácida).....	19
Figura 13: Amplificação da região ITS2 das espécies <i>Dirofilaria immitis</i> e <i>Dirofilaria repens</i>	21
Figura 14: Radiografia com infeção moderada e infeção grave por <i>Dirofilaria immitis</i>	22
Figura 15: Ecocardiografia de um cão com presença de vermes adultos na artéria pulmonar....	22
Figura 16: Cordas laterais de uma fêmea <i>Dirofilaria immitis</i> com presença de <i>Wolbachia</i> spp. pelo método de imunohistoquímica.....	24
Figura 17: Ilustração da resposta imunitária ativada na presença de <i>Dirofilaria</i> spp.....	26
Figura 18: Ilustração da resposta imunitária ativada na presença de <i>Wolbachia</i> spp.....	27
Figura 19: Mapa de Portugal Continental com os distritos amostrados durante o projeto e prevalências dos cães positivos para <i>Dirofilaria immitis</i>	34
Figura 20: Coinfeção de <i>D. immitis</i> - <i>Wolbachia</i> spp. em relação à idade.....	44

Figura 21: Níveis séricos de anticorpos IgG na ausência e presença de infecção por <i>Dirofilaria immitis</i>	45
Figura 22: Níveis séricos de anticorpos IgG anti- <i>Dirofilaria immitis</i> em relação à microfilarémia.....	46
Figura 23: Níveis séricos de anticorpos IgG em relação ao número de microfilárias circulantes na presença e na ausência de coinfeção com a bactéria <i>Wolbachia</i> spp.....	47
Figura 24: Níveis séricos de anticorpos IgG na ausência e presença de coinfeção em relação ao género dos canídeos analisados.....	47
Figura 25: Níveis séricos de anticorpos IgG na ausência e presença de coinfeção com a bactéria <i>Wolbachia</i> spp. em relação à idade dos canídeos analisados.....	48
Figura 26: Níveis séricos de anticorpos IgG ₁ e IgG ₂ na presença e ausência de <i>D. immitis</i>	49
Figura 27: Níveis séricos de anticorpos IgG ₁ e IgG ₂ em relação ao número de microfilárias circulantes na presença e na ausência de <i>Wolbachia</i> spp.....	49
Figura 28: Concentração de anticorpos IgG ₁ em relação à microfilarémia na presença e na ausência de coinfeção com <i>Wolbachia</i> spp.....	50
Figura 29: Níveis séricos de anticorpos IgG ₂ em relação ao número de microfilárias circulantes na presença e na ausência de coinfeção com <i>Wolbachia</i> spp.....	51
Figura 30: Níveis séricos de anticorpos IgG ₁ na ausência e presença de coinfeção em relação ao género dos canídeos analisados.....	51
Figura 31: Níveis séricos de anticorpos IgG ₂ na ausência e presença de coinfeção em relação ao género dos canídeos analisados.....	52
Figura 32: Concentração da IgG ₁ na ausência e presença de coinfeção com a bactéria <i>Wolbachia</i> spp. em relação à idade dos canídeos analisados.....	52
Figura 33: Níveis séricos da IgG ₂ na ausência e presença de coinfeção com a bactéria <i>Wolbachia</i> spp. comparativamente à idade dos canídeos analisados.....	53
Figura 34: Concentração da CRP (µg/ml) na presença de infecção simples por <i>D. immitis</i> e na com coinfeção <i>D. immitis</i> - <i>Wolbachia</i> spp.	54
Figura 35: Concentração da CRP (µg/ml) em relação à microfilarémia na presença e ausência da bactéria <i>Wolbachia</i> spp.	55
Figura 36: Concentração da CRP (µg/ml) na ausência e presença de coinfeção em relação ao género dos canídeos analisados.....	55
Figura 37: Concentração da CRP (µg/ml) na ausência e presença de coinfeção com a bactéria <i>Wolbachia</i> spp. em relação à idade dos canídeos analisados.....	56

Índice de Tabelas

Tabela 1: Número total de amostras analisadas para a deteção de <i>Dirofilaria immitis</i> pelos métodos de <i>WITNESS</i> [®] <i>Dirofilaria</i> , Knott modificado e PCR em 10 distritos de Portugal Continental.....	43
Tabela 2: Grau de microfilarémia nos sangues de cães infetados com <i>Dirofilaria immitis</i>	44
Tabela 3: Valores medianos da concentração dos anticorpos IgG anti- <i>Dirofilaria immitis</i> na ausência e presença de coinfeção com a bactéria <i>Wolbachia</i> spp.....	46
Tabela 4: Valores medianos da concentração dos anticorpos IgG ₁ e IgG ₂ anti- <i>Dirofilaria immitis</i> na ausência e presença de coinfeção com a bactéria <i>Wolbachia</i> spp.	50
Tabela 5: Valores medianos da concentração da <i>CRP</i> na ausência e presença de coinfeção com a bactéria <i>Wolbachia</i> spp.	54

Lista de abreviaturas

- 16S rRNA:** região 16 da pequena subunidade ribossomal
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico (em inglês *DNA*)
- AHS:** *American Heartworm Society*
- AgDi:** Antígeno completo de verme adulto de *Dirofilaria immitis*
- APPs:** Proteínas de fase aguda (*acute phase proteins*)
- CI:** Incompatibilidade citoplasmática
- CTAB:** *Cetyltrimethylammonium bromide*
- CRP:** Proteína C-reativa (em inglês *C reactive protein*)
- D.O.:** Densidade óptica
- d’NTP:** Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ftsZ:** Gene *Filamenting temperatute-sensitive mutant Z*
- H₂O dd:** Água destilada desionizada
- HMM:** Helmintologia e Malacologia Médicas
- HRP:** Horseradish Peroxidase
- IgG:** Imunoglobulina G
- IL:** Interleucina
- INF- γ :** Interferão gama
- ITS2:** *Internal transcribed spacer 2*
- L1-5:** Larva de primeiro ao quinto estágio
- mf:** Microfilárias
- mRNA:** Ácido ribonucleico mensageiro
- PAMPs:** *Pathogen-associated molecular patterns*
- PCR:** Reação de polimerização em cadeia (em inglês *Polymerase chain reaction*)
- p.b.:** Pares de bases
- SI:** Sistema imunitário
- TAE:** Tris-Acetato-EDTA
- T.A.:** Temperatura ambiente

TE: Tris-EDTA

Th1: Resposta imunitária de tipo 1

Th2: Resposta imunitária de tipo 2

TNF- α : Factor de necrose tumoral alfa

WSP: Proteína de superfície de *Wolbachia*

1.Introdução

1.1. Agentes etiológicos da Dirofilariose

O aumento dos cuidados e preocupação com o bem-estar dos animais de companhia (especialmente cães e gatos) tem sido crescente nos países desenvolvidos, observando-se uma grande expansão no crescimento destas populações. A proximidade com o Homem cria novos problemas ligados à saúde pública, uma vez que os cães e os gatos são reservatórios naturais de várias zoonoses. As filarioses provocadas por nemátodes da Família Onchocercidae são exemplo dessas parasitoses cujos agentes etiológicos conseguem infetar e sobreviver no cão e no gato durante longos anos ocorrendo, por vezes coinfeção com outras espécies de nemátodes parasitas (Otranto et al., 2009).

Dos vários agentes parasitários que infetam estes animais, os parasitas do género *Dirofilaria* são dos que apresentam maior relevância e com maior dispersão mundial. *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) é um dos agentes etiológicos da dirofilariose no cão, sendo classificada como a filariose mais importante encontrada nos carnívoros domésticos e selvagens, causando doença grave ou levando à morte quando não tratada (Otranto et al., 2013). Apresenta uma distribuição mundial com as áreas endémicas localizadas em climas temperados e tropicais (Montoya et al., 1998). A primeira observação deste parasita num cão data de 1626 por Birago no norte de Itália (citado por Lee et al., 2010). A dirofilariose cutânea causada pela espécie *Dirofilaria repens* (Raiilliet e Henry, 1911) infeta principalmente cães, apesar de ser reportada noutros canídeos, felinos e em humanos. Apresenta, na maioria dos casos, uma menor patogenicidade que *D. immitis* e pode ser encontrada no velho mundo, particularmente no sudoeste e este da Europa, em África e na Ásia (Venco, 2007), correspondendo a uma das mais dispersas filarioses transmitidas por vetores (Otranto et al., 2013).

Estas duas espécies são zoonóticas e a sua importância em Saúde Pública tem sido crescente devido ao aumento de infeções em humanos, principalmente as causadas por *D. repens* na Europa (Muro et al., 1999; Otranto et al., 2013; Baptista-Fernandes et al., 2015).

Os humanos são hospedeiros acidentais, não ocorrendo, em geral, o desenvolvimento completo do parasita; a infecção por *D. immitis* provoca, usualmente, a formação de granulomas pulmonares e no caso de *D. repens* lesões subcutâneas (Vezzani e Carbajo, 2006; Joseph et al., 2011).

1.1.1. Taxonomia de *Dirofilaria* spp.

De acordo com Anderson (2000) os agentes etiológicos da dirofilariose canina pertencem:

Reino Animalia

Filo Nematoda

Classe Secernetea

Ordem Spirurida

Superfamília Filarioidea

Família Onchocercidae (Leiper, 1911)

Subfamília Dirofilariinae (Sandground, 1921)

Gênero *Dirofilaria* (Railliet e Henry, 1911)

O gênero *Dirofilaria* divide-se em dois subgêneros, o subgênero *Dirofilaria* onde se encontra a espécie *D. immitis* (Leidy, 1856) e o subgênero *Nochtiella* que agrupa aproximadamente 20 espécies como, *D. (Nochtiella) repens* (Railliet e Henry, 1911), *D. (Nochtiella) roemeri*, *D. (Nochtiella) tenuis*, *D. (Nochtiella) ursi*, *D. (Nochtiella) striata*, *D. (Nochtiella) subdermata*, *D. (Nochtiella) magnilarvatum* e *D. (Nochtiella) corynodes* (Torgerson e Macpherson, 2011; Baptista-Fernandes et al., 2015). As espécies *D. immitis* e *D. repens* apresentam como hospedeiro principal e mais competente o cão (McCall et al., 2008).

1.1.2. Características morfológicas de *Dirofilaria* spp.

Os nemátodes de *Dirofilaria* spp. apresentam o corpo delgado, coloração esbranquiçada e dimorfismo sexual acentuado (Leite et al., 2006). As fêmeas são

ovovivíparas e depositam microfílarias na corrente sanguínea. As microfílarias desenvolvem-se no útero da fêmea e têm a capacidade de responder a estímulos fisiológicos do hospedeiro, podendo alterar a sua circulação na corrente sanguínea periférica consoante a hora do dia/abundância dos seus vetores (Manfredi et al., 2007).

Morfologia dos parasitas *D. immitis*

As filárias da espécie *D. immitis* possuem corpo longo e filiforme com a extremidade cefálica arredondada. A abertura bucal não possui lábios e encontra-se rodeada por 6 pares de papilas. O esófago apresenta regiões musculares e glandulares sem diferenciação (Manfredi et al., 2007; Furtado et al., 2010). As fêmeas apresentam a extremidade posterior arredondada, ânus subterminal e vulva localizada posteriormente à junção entre o esófago e o intestino, podendo atingir entre 25 a 31 cm de comprimento e 1 a 1,3 mm de espessura. Os machos possuem uma cutícula lisa, com extremidade posterior espiralada com abas laterais e estrias presentes apenas na superfície ventral da última espiral e uma cloaca terminal com papilas. Apresentam dimensões inferiores às fêmeas podendo atingir entre 12 a 20 cm de comprimento e entre 700 a 900 μm de espessura (Manfredi et al., 2007).

A fêmea liberta microfílarias sem bainha para a corrente sanguínea. As microfílarias possuem extremidade cefálica afilada e extremidade posterior distendida, apresentando entre 290 a 330 μm de comprimento, 5 a 7 μm de espessura e podem sobreviver até 18 meses na corrente sanguínea (Leite et al., 2006; Manfredi et al., 2007).

Os adultos possuem uma alimentação à base de plasma do hospedeiro (Manfredi et al., 2007) e podem sobreviver até 7 anos (Bowman e Atkins, 2009).

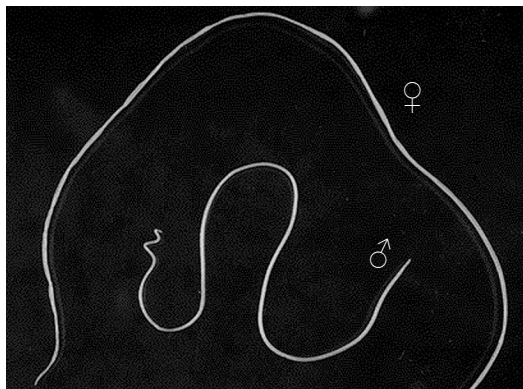


Figura 1: Parasitas adultos de *Dirofilaria immitis*. Fonte: <http://research.vet.upenn.edu/Hosts/Dirofilariaimmitis/tabid/7791/Default.aspx> (consultado dia 20/07/15)

Morfologia do parasita *D. repens*

Em comparação com *D. immitis*, as filárias da espécie *D. repens* apresentam cutícula com finas estrias longitudinais. Possuem menores dimensões que *D. immitis*, as fêmeas medem entre 10 a 17 cm de comprimento e 4,6 a 6,5 mm de espessura e os machos entre 5 a 7 cm de comprimento e 3,7 a 4,5 mm de espessura. Por outro lado, as microfíliarias podem medir entre 300 a 360 μm de comprimento e 6 a 8 μm de espessura. Os machos possuem a extremidade posterior arredondada, com duas abas laterais e esta é ligeiramente curvada para o lado ventral. As fêmeas apresentam a vulva próxima da região cefálica, circundada por pequenos lábios e, uma extremidade posterior arredondada e ligeiramente curvada para o lado ventral. Como observado em *D. immitis*, as microfíliarias são libertadas para a corrente sanguínea sem bainha e apresentam a extremidade anterior arredondada e a extremidade posterior pontiaguda e curvada (Manfredi et al., 2007).

1.1.3. Ciclo biológico de *Dirofilaria* spp.

As espécies de *Dirofilaria* apresentam ciclo de vida heteroxeno e indireto, necessitando da passagem por um hospedeiro intermediário (artrópode hematófago) para completar o seu ciclo de vida. Tanto *D. immitis* como *D. repens* apresentam uma baixa especificidade de hospedeiros definitivos, podendo ser encontrados em diversas espécies de mamíferos. O cão é o hospedeiro definitivo mais comum, sendo um hospedeiro e reservatório competente e que apresenta maior carga parasitária (Reifur et al., 2001; Genchi et al., 2005; Alho et al., 2012a). Os cães e os gatos são os principais reservatórios da infecção nas zonas urbanas, contudo os animais silváticos apresentam grande importância, já que as suas atividades peridomésticas perpetuam o ciclo de transmissão; por exemplo, a prevalência de *D. immitis* em raposas vermelhas varia entre 3 e 11,8% em Portugal (Lee et al., 2010; Alho et al., 2014).

A transmissão de dirofilariose depende de vários fatores, sendo um dos principais a temperatura ambiente na qual o parasita consegue completar o seu desenvolvimento no vetor para se tornar infetante para o vertebrado. Temperaturas abaixo de 14°C são descritas por vários autores como sendo limitantes para o

desenvolvimento do parasita em larva de terceiro estágio (L3), não ocorrendo (em teoria) transmissão do parasita nos meses de inverno. No entanto, a elevada prevalência da infecção nas áreas urbanas e a presença nestes locais de microambientes propícios aos criadouros de mosquitos pode permitir a ocorrência esporádica de transmissão durante todo o ano. No hemisfério norte os picos de transmissão ocorrem, geralmente, nos meses de julho e agosto. A Europa apresenta uma sazonalidade marcada, sendo a transmissão mais frequente durante os meses de junho a setembro (AHS, 2014; Ferreira et al., 2015). De acordo com Alho (2014), em Portugal existe um risco de transmissão da dirofilariose entre os meses de Maio e Novembro.

Ciclo de vida *Dirofilaria immitis*

O parasita *D. immitis* localiza-se na fase adulta nas artérias pulmonares e ventrículo direito, causando alterações cardiopulmonares significativas no cão. Para além do cão existe registo de mais de 30 espécies de mamíferos infetados com este parasita (Manfredi et al., 2007; McCall et al., 2008): *Canis aureus*, *C. lupus*, *Cuon alpius*, *Equus ferus*, *Felis concolor*, *F. silvestres*, *Gulo gulo*, *Leopardus pardalis*, *Lycaon pictus*, *Mustela putorius*, *Neofelis nebulosa*, *Nyctereutes procyonoides*, *Panthera leo*, *P. tigris*, *Uncia uncia* e *Vulpes vulpes* (Leite et al., 2006; Bowman e Atkins, 2009).

Mais de 60 espécies de mosquitos são reconhecidas mundialmente como vetores competentes de *Dirofilaria* spp. (Bowman e Atkins, 2009). Em Portugal o mosquito *Culex theileri* foi o primeiro vetor confirmado de *D. immitis* e estudos recentes confirmaram a presença de mais cinco espécies vectoriais - *Anopheles maculipennis* s.l., *An. atroparvus*, *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus* e *Aedes detritus* s.l., infetadas com o parasita e potencialmente vectoras (Ferreira et al., 2015).

O ciclo de desenvolvimento de *D. immitis* (Figura 2) ocorre pela ingestão de microfíliarias (larva de primeiro estágio-L1) pelo mosquito durante a refeição sanguínea. Dentro do mosquito ocorre o desenvolvimento de L1 para L3 nos tubos de Malpighi, sendo a duração do desenvolvimento no mosquito dependente da temperatura exterior (entre 10-14 dias com temperatura de 27°C). Após atingirem a fase L3, as larvas migram dos tubos de Malpighi para o aparelho bucal do mosquito e, durante nova

refeição sanguínea, as larvas infetantes são inoculadas na pele do hospedeiro definitivo perto do local de picada e entram no tecido subcutâneo. Aproximadamente dois dias após a entrada no tecido subcutâneo as larvas passam por novas mudas, desenvolvendo-se de L3 para L5 no tecido subcutâneo e tecido muscular respectivamente. Entre 70 a 120 dias depois, jovens parasitas entram nos vasos sanguíneos e migram para as artérias pulmonares e lado direito do coração, onde maturam (Manfredi et al., 2007; McCall et al., 2008). A fase pré-patente da doença apresenta uma duração entre seis a sete meses, na qual existe o desenvolvimento de L3 em parasitas sexualmente maduros, seguida de cópula dos parasitas adultos e liberação de microfírias na corrente sanguínea (Reifur et al., 2001; Manfredi et al., 2007).

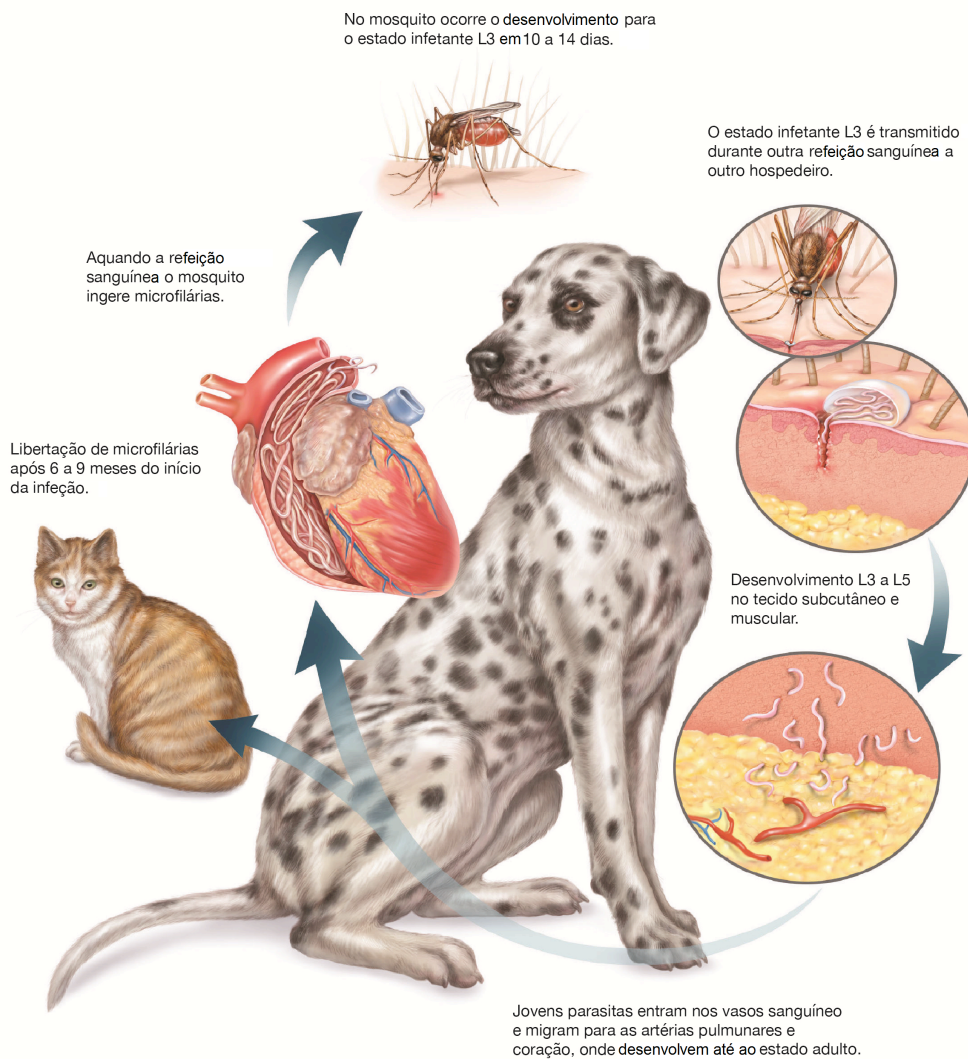


Figura 2: Ciclo de vida de *Dirofilaria immitis*. Fonte: Adaptado de Banfield (2011)

Em 10 a 67% dos casos de cães infetados com dirofilariose, pode ocorrer ausência de microfilarémia (infecções ocultas), tendo esta várias causas possíveis como a eliminação de microfílarías por tratamento microfilaricida ou pelo sistema imunitário do animal infetado, presença de apenas parasitas imaturos ou presença de parasitas adultos mas só de um sexo ou ainda a morte dos parasitas adultos (Reifur et al., 2001; Song et al., 2002; Leite et al., 2006).

Por vezes é possível encontrar o parasita em locais atípicos como na câmara anterior do olho, fígado, esófago, cavidade torácica e abdominal, traqueia e na forma de granulomas no tecido subcutâneo (Manfredi et al., 2007).

No gato, o desenvolvimento do parasita até ao seu estado adulto demora aproximadamente mais um mês do que no cão e também apresenta uma longevidade mais reduzida (entre 3 a 4 anos). A carga parasitária é muito menor, sendo estes animais possivelmente mais resistentes ao parasita e, na maioria das vezes, ocorrem infecções ocultas (Reifur et al., 2001; Leite et al., 2006; Bowman e Atkins, 2009). A falta de microfilarémia, na maioria das infecções torna o gato um reservatório pouco significativo para *D. immitis* (Genchi et al., 2009).

Ciclo de vida *Dirofilaria repens*

Como descrito no ciclo de vida de *D. immitis*, na dirofilariose cutânea por *D. repens* o cão é reportado como o hospedeiro mais comum mas existem registos de outros mamíferos infetados por este parasita (gatos, lobos, raposas e leões marinhos). Os géneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* apresentam-se como os vetores mais usuais para a transmissão, apesar de algumas espécies de pulgas, piolhos e carraças poderem, segundo alguns estudos, funcionar também como vetores. Em contraste com *D. immitis*, a espécie *D. repens* localiza-se no tecido subcutâneo do hospedeiro definitivo durante todo o seu ciclo de vida (Joseph et al., 2011).

O ciclo de vida de *D. repens* (Figura 3) é semelhante ao de *D. immitis* (Venco, 2007). No hospedeiro definitivo as larvas encontram-se no tecido subcutâneo, não sendo observada grande migração. É neste local onde ocorre a maturação e onde os parasitas adultos atingem a maturidade sexual após, aproximadamente, 150 dias. O período pré-patente apresenta uma duração semelhante à de *D. immitis*, cerca de sete a

oito meses. Após este período ocorre a libertação de microfilárias na corrente sanguínea. Os parasitas adultos são normalmente encontrados na parte superior do corpo, sendo pouco comuns nos membros inferiores (Venco, 2007).

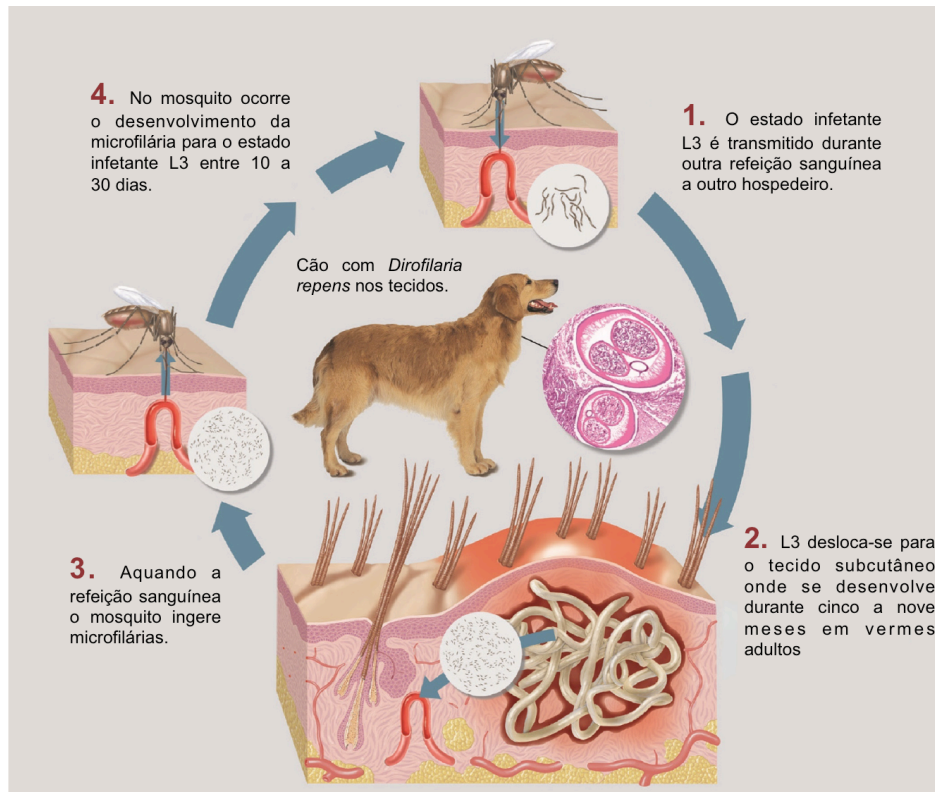


Figura 3: Ciclo de vida de *Dirofilaria repens*. Fonte: Adaptado de Genchi et al. 2013.

1.1.4. Distribuição geográfica da dirofilariose

A distribuição de dirofilariose está associada a locais favoráveis para o desenvolvimento de mosquitos, encontrando-se elevadas prevalências perto de rios e zonas húmidas (Muro et al., 1999). A temperatura é um fator importante para a ocorrência da doença, sendo as maiores prevalências de dirofilariose registada nos países com climas temperados, tropicais e subtropicais (Genchi et al., 2005). A dirofilariose está, também, associada a locais urbanos e rurais com grandes populações de canídeos (Reifur et al., 2001).

A infeção causada por *D. immitis* apresenta uma distribuição mundial afetando principalmente o Continente Americano, os países do Mediterrâneo, Polinésia, Austrália e Japão (Montoya et al., 1998). A dirofilariose cutânea (por *D. repens*) encontra-se localizada apenas no Velho mundo (Alho et al., 2012a).

Distribuição da dirofilariose no Mundo

No Continente Americano a prevalência de dirofilariose por *D. immitis* encontra-se amplamente distribuída. Nos Estados Unidos da América todos os estados apresentam transmissão de dirofilariose com prevalências variando de 1 a 12%. O Canadá apresenta uma prevalência muito inferior, até 0,24%. Na América Central e Sul as prevalências registadas em alguns países são muito elevadas, sendo descritas prevalências no México, Caraíbas, Brasil e Argentina superiores a 40% (McCall et al., 2008; Simón et al., 2012).

Na Ásia a dirofilariose encontra-se bem estabelecida, sendo registada em vários países prevalências que chegam a atingir 70% de infeções por *D. immitis* e *D. repens*. No entanto, ainda não foi feito um levantamento epidemiológico da parasitose em vários países deste Continente (McCall et al., 2008; Simón et al., 2012).

Na Austrália a dirofilariose por *D. immitis* é endémica, sendo registada uma prevalência alta na zona costeira e nas províncias ao sudoeste. Na Nova Zelândia é possível encontrar dirofilariose por *D. immitis* e *D. repens* sendo vários casos de infeção por *D. immitis* importados da Austrália (Simón et al., 2012).

No Continente Africano a dirofilariose não se encontra bem estudada, sendo desconhecida na maioria dos países a sua distribuição. A presença de infeções por *D. immitis* encontram-se registadas nalguns países junto à parte litoral nomeadamente em Marrocos, Egito, Moçambique, Senegal e, na África do Sul, os casos registados em caninos são todos de importação. No entanto, *D. repens* é descrita por vários autores como sendo autóctone no país (Simón et al., 2012).

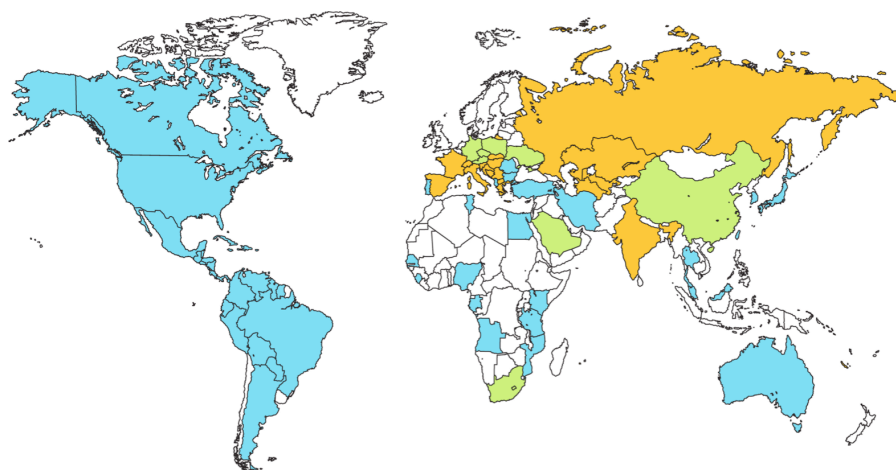


Figura 4: Distribuição mundial da dirofilariose canina. Em azul encontra-se a distribuição de *Dirofilaria immitis*, a verde de *Dirofilaria repens* e a laranja a distribuição das zonas de infecção pelos dois parasitas. Fonte: Simón et al. (2012).

Distribuição da dirofilariose na Europa

A dirofilariose encontra-se largamente distribuída na Europa; a espécie *D. repens* regista-se com maior frequência nos países a leste enquanto *D. immitis* apresenta maior prevalência no sudoeste (Espanha, Portugal, França, Grécia, Itália e Turquia). Estudos entre 2002 e 2011 mostraram que as zonas endémicas para as espécies, *D. immitis* e *D. repens*, aumentaram para países a este e centro da Europa, onde até à data só se registavam casos esporádicos (Figuras 5 e 6). Apesar disso vários autores reportaram uma diminuição da prevalência de dirofilariose canina em áreas hiperendémicas, possivelmente por tratamentos preventivos (referidos no ponto 1.4.) e o aumento dos cuidados pelos donos (Morchón et al., 2012; Otranto et al., 2013). Nos países do Norte da Europa o registo de infeções por *Dirofilaria* spp. resultam de casos importados de países endémicos para dirofilariose (Simón et al., 2012).

Em Espanha as áreas de maior prevalência situam-se nas províncias do sudeste com níveis de infeção entre 8 e os 37%; o local com maior nível de infeção por *D. immitis* registado é encontrado nas Ilhas Canárias onde a prevalência em canídeos chega aos 59%. As infeções por *D. repens* localizam-se na costa mediterrânea. Em França a dirofilariose por *D. immitis* é mais comum, com prevalências registadas entre 5 a 15%, situadas principalmente ao longo da costa mediterrânea. Em Itália, a planície do Pó apresenta a prevalência de infeções por *D. immitis* em canídeos mais elevada, entre 50-80%, já a prevalência de *D. repens* registada neste local é de 30% (Genchi et al., 2005; Ciocan et al., 2010; Alho et al., 2012a; Morchón et al., 2012; Simón et al., 2012).

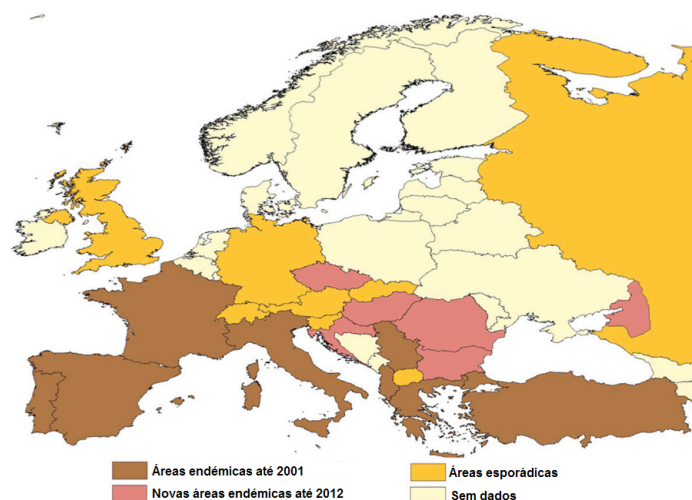


Figura 5: Distribuição de dirofilariose por *Dirofilaria immitis* em cães em zonas endémicas até 2001 e entre 2001 e 2011. Fonte: Otranto et al. (2013).

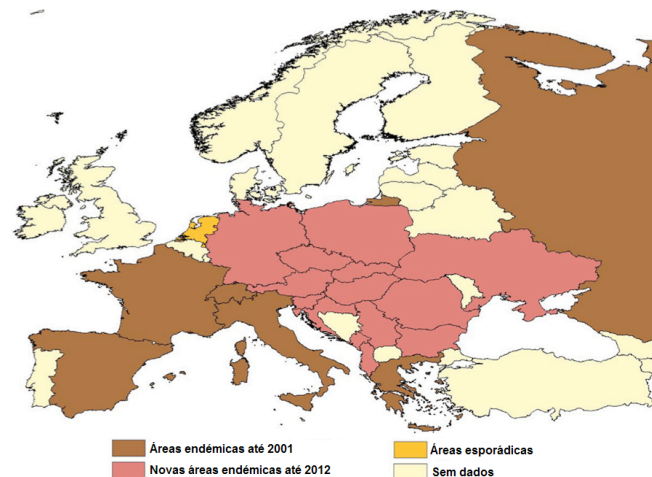


Figura 6: Distribuição de dirofilariose por *Dirofilaria repens* em cães em zonas endêmicas até 2001 e entre 2001 e 2011. Fonte: Otranto et al. (2013).

Distribuição da dirofilariose em Portugal

A dirofilariose canina em Portugal era atribuída até 2015 apenas a *D. immitis* (Alho et al., 2014, 2012a; Ferreira et al., 2015); no entanto, no início de 2016 foi reportado um caso de dirofilariose cutânea por *D. repens* autóctone num cão na região do Algarve (Maia et al., 2016). A dirofilariose por *D. immitis* é considerada uma das infeções parasitárias com maior relevância no cão e o país é considerado zona hiperendémica para a infeção, sendo as bacias hidrográficas do Tejo, Douro, Sado, Mondego e ilha da Madeira os principais focos de infeção (Alho et al., 2012a).

De acordo com Araújo (1996), a dirofilariose por *D. immitis* era endémica em todo o país, os níveis de infeção mais elevados registavam-se nas regiões do sul de Portugal, com prevalências entre 12 e 17%. A maior prevalência registada, com aproximadamente 30% da população canina infetada situava-se na Ilha da Madeira. Cardoso et al. (2012) observaram em Portugal prevalências de cães assintomáticos e sintomáticos no Norte de 2,9 e 3,4%, de 0,9% e 7,4% no Centro, no Alentejo uma variação de 4,7% e 14% e no Algarve de 5,1% e 17% (Figura 7). Nas ilhas uma prevalência de 40% na Madeira e de 0% nos Açores. Estudos recentes verificaram que a prevalência de dirofilariose está a aumentar no país, de 15,3% em 2011 para 17,1% em 2013 (Alho et al., 2012a).

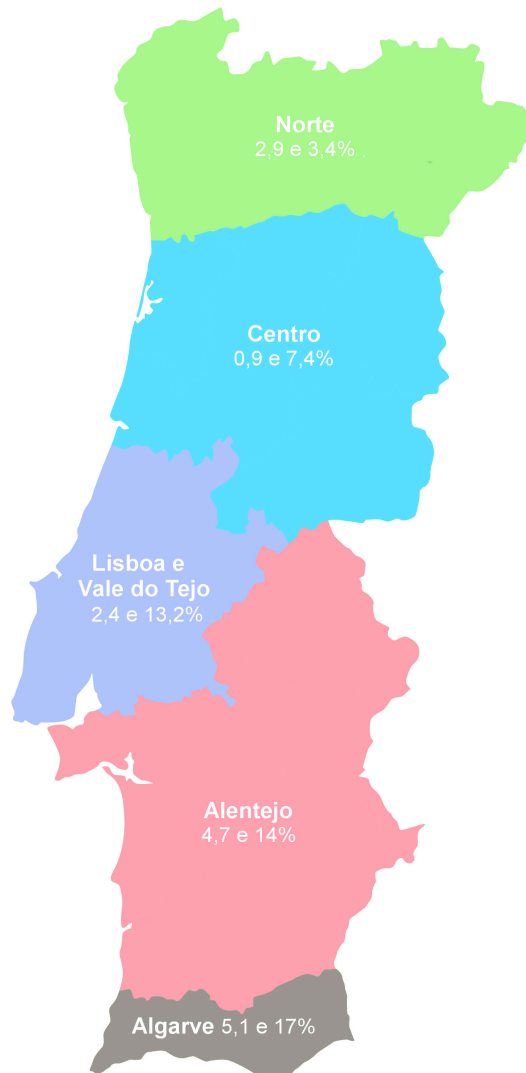


Figura 7: Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães assintomáticos e sintomáticos nas várias regiões de Portugal Continental, adaptado de Alho et al. (2012a). Ilustração: Carlos Pereira

1.1.5. Patologia da dirofilariose

Os agentes etiológicos da dirofilariose podem causar uma variedade de alterações no hospedeiro definitivo. A espécie *D. immitis* encontra-se classificada como a mais patogénica causando uma infeção crónica nos cães que, se não for tratada, poderá levar a insuficiência cardíaca e em última instância à morte do animal. Na literatura apresenta-se normalmente designada como doença do verme do coração ou *Heartworm disease*. A infeção provocada por *D. repens* apresenta menor patogenia causando usualmente nos cães e gatos pequenos nódulos indolores na pele (Grandi et al., 2007).

Patologia causado por *Dirofilaria immitis*

As infecções por *D. immitis* são causadas tanto pelos estádios adultos como pelas microfilárias. As principais lesões ocorrem nos pulmões e lado direito do coração devido à localização dos parasitas adultos. A presença de microfilárias na corrente sanguínea pode causar alguns problemas como hipersensibilidade às microfilárias circulantes, pneumonite ou glomerulopatias, no entanto, estas patologias não apresentam grandes problemas para o indivíduo infetado (Grandi et al., 2007).

A localização dos parasitas adultos nas artérias pulmonares e coração (Figura 8A) causa uma variedade de lesões patológicas no indivíduo infetado. As primeiras lesões após a infecção observam-se nas artérias pulmonares e parênquima pulmonar que com o tempo causam hipertensão pulmonar. Com o agravar destas lesões e na ausência de tratamento adequado, os sintomas evoluem para insuficiência cardíaca. A perturbação do fluxo sanguíneo devido à localização dos parasitas na átrio ventricular leva a alterações nos elementos estruturais do sangue, como as hemácias, levando a hemoglobinúria. Em situações mais graves pode desenvolver-se síndrome da veia cava¹ (Grandi et al., 2007). O principal quadro clínico associado ao parasita adulto *D. immitis* é a insuficiência cardíaca causada pelo agravamento das alterações pulmonares, como a hipertensão pulmonar. Esta patologia ocorre pelo deslocamento dos vermes adultos pelo parênquima pulmonar, levando a tromboembolismo (Figura 8B). As lesões ocorridas estão diretamente relacionadas com a carga parasitária e com o tamanho dos parasitas. Com o decorrer do tempo, a movimentação dos vermes adultos leva à deslocação das células endoteliais e à dilatação das artérias agravando a hipertensão pulmonar. O agravamento da doença ocorre devido ao estreitamento das artérias e, conseqüentemente, aumento da pressão sanguínea levando ao aumento da atividade cardíaca. Em conseqüência, as lesões nos pulmões e a dificuldade do coração bombear a quantidade de sangue necessária para os pulmões leva à morte do indivíduo quando este tenta aumentar a sua atividade cardíaca (Grandi et al., 2007; Silva e Langoni, 2009).

¹ Complicação causada pela fase crônica da dirofilariose por *D. immitis* provocada pela movimentação de grande número de vermes adultos das artérias pulmonares danificadas para o ventrículo e aurícula direita e/ou veia cava resultando em casos graves de insuficiência cardíaca (Leite et al., 2006).

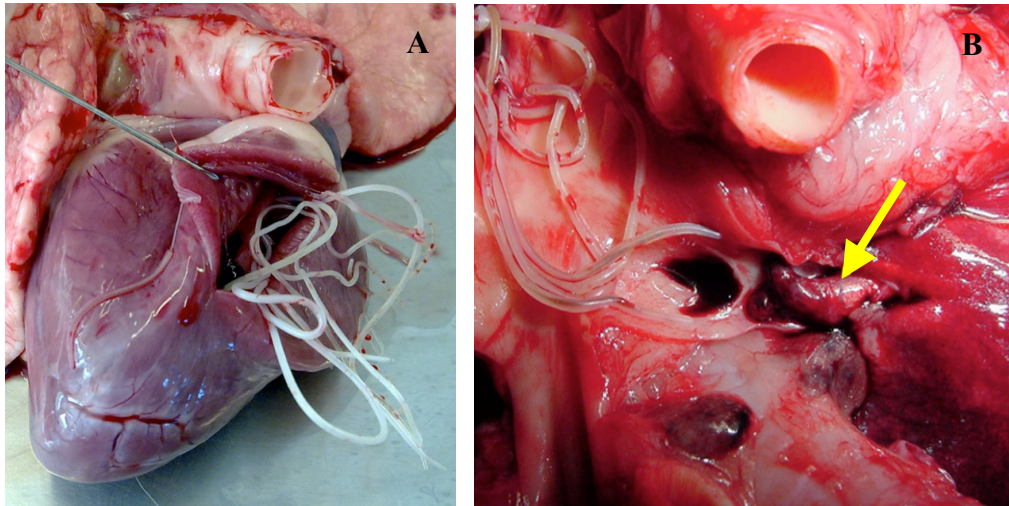


Figura 8A: Parasitas adultos de *Dirofilaria immitis* no coração de um cão com dirofilariose. Fonte: Simón et al. (2012). **B:** Necrópsia de um cão vítima de tromboembolismo numa artéria pulmonar por *Dirofilaria immitis* (seta amarela). Fonte: Simón et al. (2012).

No gato, a patologia causada por *D. immitis* é similar à observada no cão. As manifestações clínicas mais comuns de uma infecção no gato são caracterizadas por hipertrofia muscular nas pequenas artérias, com uma intensa resposta imunológica contra o parasita bem como uma resposta inflamatória elevada. Apenas um parasita adulto pode levar à morte súbita do animal, resultado de uma resposta inflamatória muito intensa nos pulmões com consequente paragem respiratória. Contrariamente ao cão, a insuficiência cardíaca é pouco comum nos gatos (Grandi et al., 2007).

Patologia causada pelo parasita *Dirofilaria repens*

A grande maioria das infeções por *D. repens* são assintomáticas, sendo a descoberta deste parasita acidental, quando ocorre a presença de outros sintomas não relacionados ou estando associados à presença de outros agentes infecciosos ou de *stress* por parte do animal. Em comparação com a patologia de *D. immitis*, muito pouco é conhecido sobre as manifestações clínicas deste parasita. A infeção é caracterizada, na maioria dos casos, por nódulos indolores no tecido subcutâneo (Figuras 9 A e B) onde se localizam os parasitas adultos. Raramente, a infeção pode manifestar-se com a presença de dermatite multifocal localizada principalmente na zona facial ou pápulas pruriginosas semelhantes às encontradas em caso de sarna (Grandi et al., 2007).

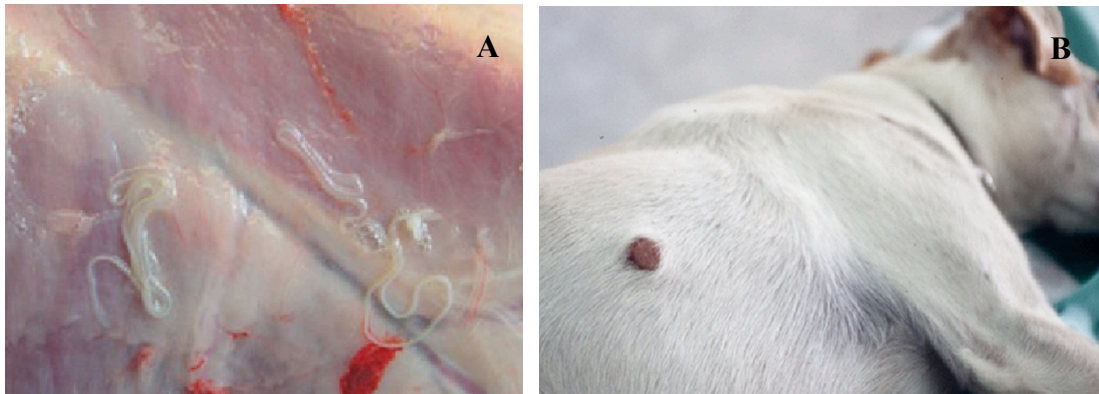


Figura 9A: Tecido subcutâneo de um cão com infecção massiva por *Dirofilaria repens*. Fonte: Hellmann et al. (2011). **B:** Nódulo no tecido subcutâneo de um cão contendo parasitas adultos *Dirofilaria repens*. Fonte: Tarello (2011).

Em alguns casos de infecção massiva, observam-se mudanças histopatológicas em vários órgãos como fígado, baço, pulmões, coração e cérebro, acompanhadas de elevada carga parasitária tanto de adultos como de microfilárias circulantes (Grandi et al., 2007).

No gato, a infecção encontra-se associada frequentemente à presença de nódulos subcutâneos e da conjuntiva, sendo este último menos frequente (Alho et al., 2012a).

1.1.6. Métodos de diagnóstico da dirofilariose

Os sinais clínicos no cão variam consoante a gravidade da infecção por *D. immitis*, podendo não existir qualquer sintoma; com o agravar da infecção ocorrem sintomas causados pelos parasitas nas artérias pulmonares, pulmões e em casos mais graves no coração. Em infecções ligeiras (pouca carga parasitária) os sinais clínicos podem estar ausentes ou ser acompanhados de tosse, quanto mais severa a infecção ocorre o agravamento dos sintomas podendo ser observada: tosse, intolerância ao exercício, sons cardíacos e pulmonares anormais, hepatomegália, síncope e, em casos extremos a morte do animal (Bowman e Atkins, 2009; AHS, 2014).

No gato, o diagnóstico de dirofilariose é mais complicado já que na grande maioria das vezes a infecção por *D. immitis* é assintomática e quando presente os sintomas podem não ser específicos. Por este facto os métodos para diagnóstico parasitológico não se aplicam (exceções), sendo os métodos serológicos, como pesquisa

de anticorpos e os exames complementares como, ecocardiografia e radiografia utilizados para o diagnóstico da doença (McCall et al., 2008).

Para a realização de um diagnóstico é necessário que a infecção apresente mais de 5 a 6 meses, pois a presença de antígenos e microfilarémia só é detetada após este tempo. Quando o animal se encontra em regime profilático é aconselhado um exame anual para assegurar o sucesso/fracasso da profilaxia (AHS, 2014).

No rastreio de dirofilariose através da avaliação dos sinais clínicos pelo Médico Veterinário podem ser utilizados vários métodos de diagnóstico de confirmação da suspeita ou para despiste de outras infecções por parasitas não patogénicos que parasitem o animal.

O diagnóstico da infecção por *D. repens* é normalmente accidental já que, na maioria dos casos não existe sintomatologia associada. Os métodos de diagnóstico utilizados dependem da deteção de microfilárias circulantes por métodos parasitológicos ou de técnicas moleculares (Venco, 2007).

Um diagnóstico específico é clinicamente importante devido à diferente patologia que estas espécies causam e à terapêutica utilizada (Rishniw et al., 2006).

1.1.6.1. Métodos parasitológicos

Para a pesquisa de microfilárias no sangue podem ser aplicadas técnicas de visualização ou de concentração de microfilárias. A taxa de sensibilidade varia sendo as técnicas de concentração mais sensíveis e usadas para diferenciar a espécie. A quantidade de microfilárias no sangue não possui relação direta com o número de parasitas adultos nem com a gravidade da doença (Leite et al., 2006).

Estes métodos detetam apenas infecções com presença de microfilarémia, em caso de infecções ocultas existe necessidade de utilizar outros métodos (McCall et al., 2008; AHS, 2014).

Técnica de visualização de microfilárias

- **Gota espessa** (Figura 10): Gota de sangue observada a microscópio entre lâmina e lamela permite a visualização de microfilárias devido ao movimento que causam nos eritrócitos. Apesar de ser uma técnica rápida e sem custos acrescidos, apresentam muito baixa sensibilidade não permitindo um diagnóstico específico (Genchi et al., 2007).

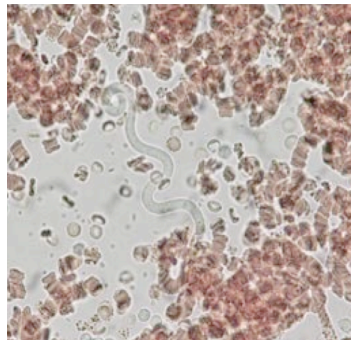


Figura 10: Microfilária de *Dirofilaria immitis* visualizada pela técnica de gota espessa. Fonte: Alho et al. (2012b).

Técnica de concentração de microfilárias

- **Filtração do sangue:** Permite concentrar as microfilárias através da filtração de sangue. A observação do filtro corado ao microscópio permite a detecção de microfilárias e a diferenciação morfológica dos parasitas. Apesar de ser uma técnica sensível, não é a técnica referência para a identificação das microfilárias (Genchi et al., 2007; Meireles et al., 2014).
- **Técnica de concentração de Knott modificado** (Figura 11): Permite diferenciar as espécies de microfilárias presentes no sangue através da avaliação morfológica. A técnica envolve a lise dos eritrócitos após adição de formol a 2% e centrifugação, permitindo uma melhor visualização das microfilárias. O facto de esta técnica permitir concentrar as microfilárias aumenta a sensibilidade e especificidade sendo a técnica normalmente escolhida para detetar a sua presença (Genchi et al., 2007; Meireles et al., 2014).

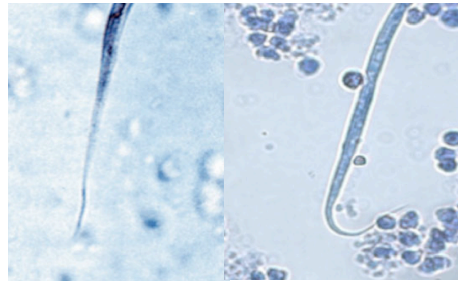


Figura 11: Extremidades posteriores de microfílaras de *Dirofilaria immitis* (esquerda) e de *Dirofilaria repens* (direita) visualizadas pela técnica de concentração de Knott modificada. Fonte: Giangaspero et al. (2013).

- **Coloração pela técnica da Fosfatase Ácida:** a diferente atividade da Fosfatase Ácida em diferentes locais do corpo das microfílaras consoante a espécie permite identificar a espécie. A técnica é realizada através de um esfregaço de sangue corado com um substrato de Fosfatase Ácida e analisado ao microscópio (Genchi et al., 2007; McCall et al., 2008). A microfilaria da espécie *D. immitis* apresenta dois locais de atividade da Fosfatase localizados no poro anal e poro excretor (Figura 12A) enquanto a microfilaria de *D. repens* apresenta apenas um local de atividade localizado no poro anal (Figura 12B)(Genchi et al., 2007).

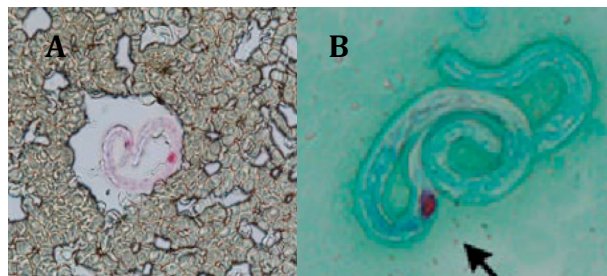


Figura 12: Microfílaras de *Dirofilaria immitis* (A) e *Dirofilaria repens* (B) visualizadas pela técnica da Fosfatase Ácida. Fonte: Alho et al. (2012b) e Hellmann et al. (2011).

1.1.6.2. Métodos serológicos

Os métodos serológicos para deteção de anticorpos e de antígenos apresentam maior sensibilidade e especificidade comparando com os outros métodos de diagnóstico, sendo capazes de detetar a presença de infeções ocultas. Estes métodos são normalmente os de referência para determinar a presença da infeção mas requerem outros métodos para complementar o diagnóstico (Genchi et al., 2007; AHS, 2014).

Deteção de anticorpos específicos

Os métodos de deteção de anticorpos específicos, normalmente realizados através da técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) detetam a presença de anticorpos anti-*Dirofilaria* produzidos pela exposição parasitária ao sistema imunitário do hospedeiro. No entanto não são métodos usados no diagnóstico em cães pois não detetam apenas infeções presentes mas também anticorpos de infeções que já poderão ter sido tratadas com sucesso mas onde ainda exista persistência de anticorpos (Goodwin, 1998).

Nos gatos é possível realizar testes de pesquisa de anticorpos com *kits* comerciais, detetando a presença de parasitas (adultos e/ou imaturos) no animal. Estes testes apresentam uma grande sensibilidade e podem detetar infeções 2 meses pós-infeção, no entanto, a sua interpretação é complicada podendo também ocorrer a presença de anticorpos anti-*Dirofilaria* em gatos já curados (Genchi et al., 2007). Apesar destas desvantagens este tipo de método é mais fiável para a deteção de infeção em gatos do que os métodos de deteção de antigénios (Nelson, 2008).

Deteção de antigénios

Os métodos de deteção de antigénios consistem em técnicas como ELISA e imunocromatografia e normalmente são utilizados como os métodos de referência para infeções ocultas causadas por *D. immitis* nos cães (AHS, 2014), não detetando infeções por *D. repens* (Luigi et al., 2011). Os testes disponíveis detetam apenas a presença de antigénios de fêmeas adultas, não existindo até agora testes que detetem a presença de infeções causadas apenas por parasitas machos (Venco, 2007). A maioria dos testes utilizados atualmente permitem a deteção de infeções ocultas apresentando uma especificidade de aproximadamente 100%. Algumas técnicas permitem ainda, através da intensidade da cor obtida na técnica de ELISA, estimar o número de fêmeas adultas que se encontram a parasitar o animal (AHS, 2014). É possível também utilizar este tipo de método para verificar a eficácia do tratamento adulticida já que o nível de antigénios circulantes diminui após a morte dos parasitas. No gato este método não é normalmente utilizado já que as infeções nestes animais apresentam carga parasitária baixa e, por vezes, apenas a presença de parasitas machos (Venco, 2007).

1.1.6.3. Métodos moleculares

A técnica molecular da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) apresenta uma alta sensibilidade e especificidade sendo possível diferenciar várias espécies de filárias que parasitam o cão e o gato, através de *primers* específicos para regiões do Ácido desoxirribonucleico (ADN) da microfilária (Figura 13), podendo ser um método utilizado quando ocorre anomalias nas microfilárias que não permitem a sua identificação morfológica. Apesar de ser uma técnica muito específica, apenas é útil quando existe a presença de microfilarémia não podendo ser utilizada em caso de infecções ocultas. No entanto, devido ao seu alto custo de execução, não é um método de diagnóstico geralmente utilizado (Casiraghi et al., 2006; Rishniw et al., 2006).

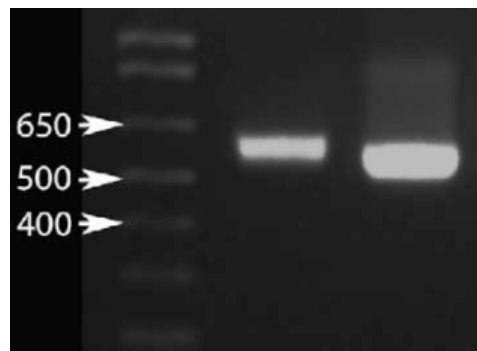


Figura 13: Amplificação da região ITS2 das espécies *Dirofilaria immitis* (poço2) e *Dirofilaria repens* (poço3); Marcador de pesos moleculares (poço1). Fonte: Rishniw et al. (2006).

1.1.6.4. Métodos complementares

Para além dos métodos acima descritos é necessário, por vezes, a utilização de métodos complementares de diagnóstico para confirmação do diagnóstico e para estabelecer um prognóstico, no caso da infecção por *D. immitis* (Alho et al., 2012b).

- **Radiografia:** Permite estimar a severidade das lesões pulmonares (Figura 14) através da visualização de alterações no formato dos ramos das artérias pulmonares (alargado, tortuoso e truncoso) e alterações no parênquima pulmonar. Em casos graves, em que o coração esteja comprometido, é possível observar a dilatação direta do coração (McCall et al., 2008; Alho et al., 2012b; AHS, 2014).

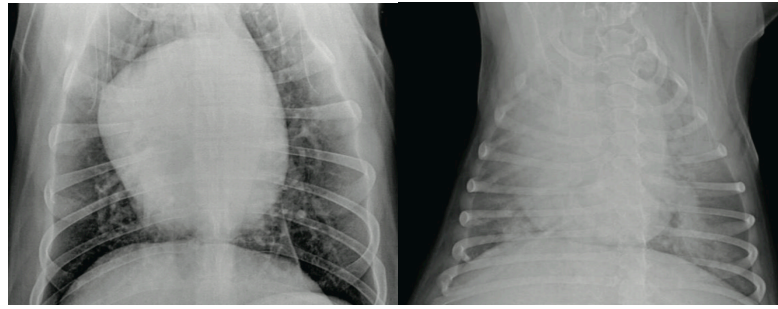


Figura 14: Radiografia com infecção moderada e infecção grave por *Dirofilaria immitis*. Fonte: AHS (2014).

- **Ecocardiografia:** Técnica usada para visualizar as alterações na anatomia e função cardíaca causadas quando a infecção já se encontra no coração do animal e para diagnóstico de casos de Síndrome da Veia Cava (Figura 15). Não é um método de primeira escolha para o diagnóstico pois apresenta baixa eficácia na detecção de infecções leves e com baixa carga parasitária sendo apenas utilizado quando outros métodos sugerem infecção severa (McCall et al., 2008; Bowman e Atkins, 2009; Alho et al., 2012b; AHS, 2014;).



Figura 15: Ecocardiografia de um cão com presença de vermes adultos na artéria pulmonar (setas). Fonte: Alho et al. (2012b).

- **Eletrocardiografia:** Técnica usada apenas em casos de infecção severa, com comprometimento do coração, permite a detecção de arritmias (McCall et al., 2008; Bowman e Atkins, 2009).

1.2. *Wolbachia* spp.

Em meados de 1970, estudos em microscopia realizados em nemátodes parasitas detetaram a presença de uma bactéria intracelular Gram-negativa, localizada no aparelho reprodutivo das fêmeas e cordas laterais de machos e fêmeas (Figura 16) (Bandi et al., 2001). Estudos posteriores identificaram esta bactéria como sendo pertencente ao género *Wolbachia* já descrita em 1924 por Hertig & Wolbach nos tecidos reprodutivos de um mosquito *Culex pipiens* (Werren, 1997; Bandi et al., 1998).

Taxonomicamente esta bactéria pertence à ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae. De acordo com O'Neill (1992) o género *Wolbachia* (Hertig, 1936) apresenta diferentes grupos/espécies: *W. pipientis* uma bactéria rickettsia-like pertencente à subclasse 2 α -proteobactérias; *W. persica* pertencente às γ -proteobactéria e, *W. melophagi* ainda pouco estudada, no entanto, não existe consenso entre as espécies que pertencem ao género (Bandi et al., 2001; Taylor et al., 2005).

A espécie *W. pipientis*, a única aceite atualmente como pertencente ao género, encontra-se em toda a literatura consultada, designada apenas pelo seu género (*Wolbachia*). Filogeneticamente os vários organismos infetados por *Wolbachia* podem ser agrupados em diferentes supergrupos de A-K, os supergrupos A, B, E, H, I e K compilam os artrópodes e C, D e J apresentam a totalidade dos nemátodes parasitas e o supergrupo F agrupa artrópodes e nemátodes parasitas como o género *Mansonella*. O supergrupo G não apresenta consenso entre a comunidade científica, podendo ter sido gerado como resultado de recombinação (Ferri et al., 2011). O género *Dirofilaria* spp. encontra-se organizado no supergrupo C (Bandi et al., 2001; Taylor et al., 2005). Esta organização baseia-se na comparação de genes com o gene do ciclo celular *Filamenting temperatute-sensitive mutant Z (fstZ)* e a região 16 da pequena subunidade ribossomal (16S rRNA) (Bandi et al., 1998, 2001).

A bactéria do género *Wolbachia* encontra-se dispersa por vários organismos, cerca de 75% das espécies de artrópodes apresentam esta bactéria e a quase totalidade de nemátodes parasitas da família Onchocercidae (Sironi et al., 1995; Bandi et al., 1998; Taylor e Hoerauf, 1999).

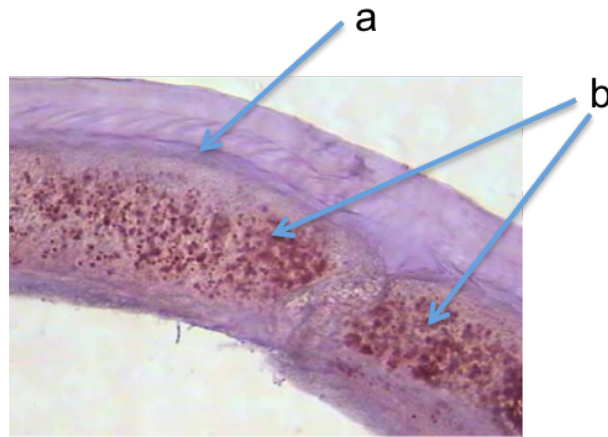


Figura 16: Cordas laterais de uma fêmea *Dirofilaria immitis* (a) com presença de *Wolbachia* spp. (b) pelo método de imunohistoquímica. Fonte: Kramer et al. (2005).

Nos artrópodes a presença de algumas estirpes de *Wolbachia* está associada a alterações a nível reprodutor, podendo os indivíduos infetados apresentar: partenogénese, feminização de machos, incompatibilidade citoplasmática (CI)² e perda de embriões masculinos. Pode ainda verificar-se a existência de estirpes da bactéria (ex. estirpe *popcorn*) que causam a morte, invadindo os tecidos do indivíduo infetado (Taylor et al., 2005; Genchi et al., 2012).

Nos nemátodes parasitas a evolução da simbiose com a bactéria é diferente, ocorrendo uma infeção estável e pressupõem-se de longa coevolução, contrariamente à de alguns artrópodes onde ocorre a perda de infeção. As espécies infetadas por *Wolbachia* apresentam uma prevalência de 100% (Bandi et al., 2001; Taylor et al., 2005), sendo esta uma das razões que classificam a relação de simbiose entre estes nemátodes infetados e a bactéria como uma relação mutualista obrigatória (Taylor et al., 2005) onde a bactéria poderá desempenhar um papel fundamental nas funções biológicas e reprodutivas destes nemátodes (Bandi et al., 1998; Casiraghi et al., 2004). A maioria dos agentes de filarioses de humanos e animais, como *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis* e *D. repens* apresentam a bactéria (Bandi et al., 1998), estando a presença desta descrita apenas nas subfamílias Onchocercinae e Dirofilarinae, uma vez que até ao presente não se encontrou a bactéria em todas as espécies destas subfamílias (Casiraghi et al., 2004; Taylor et al., 2005).

A bactéria pode ser encontrada em todos os estádios do nemátode ocorrendo variações na sua quantidade durante o ciclo de vida e de verme para verme. Em estudos

² Incompatibilidade reprodutiva entre o esperma e o óvulo. Pode ocorrer quando machos infetados por *Wolbachia* fertilizam óvulos não infetados (CI unidirecional) ou um macho e uma fêmea apresentam infeções por estirpes diferentes da bactéria (CI bidirecional) (Werren, 1997).

realizados em *Brugia malayi*, foi observado que a variação da população bacteriana apresentava um rácio baixo e estático na fase de desenvolvimento no vetor e na passagem para o mamífero ocorria um aumento rápido, encontrando-se a maior quantidade de bactérias na primeira fase de infecção no hospedeiro definitivo. A presença da bactéria apenas nos tecidos reprodutivos das fêmeas (ovários, oócitos e embriões) e a sua ausência nos machos permite assumir que a passagem da bactéria entre gerações ocorra verticalmente através do citoplasma do ovo (Taylor e Hoerauf, 1999).

Alguns estudos sugerem que o nemátode possa contribuir na relação mutualista com a bactéria fornecendo a esta aminoácidos para o crescimento bacteriano (Simón et al., 2012).

1.3. Interação *Dirofilaria* spp.-*Wolbachia*spp.

Através da aplicação da técnica molecular PCR, Sironi et al. (1995) identificaram a bactéria presente na filária *D. immitis* como sendo pertencente ao género *Wolbachia*. A relação simbiótica entre *D. immitis* e *Wolbachia* evidenciou pela primeira vez a presença destas bactérias fora do filo Arthropoda (Bandi et al., 1998). A relação simbiótica entre a bactéria e os nemátodes parasitas encontra-se descrita por vários autores, sendo aceite que as filárias necessitam das bactérias para o seu desenvolvimento, reprodução e sobrevivência (Bazzocchi et al., 2000). A presença de um número mais elevado de bactérias durante as fases de embriogénese e desenvolvimento larvar, principalmente em L4, realça o papel importante da relação de simbiose entre a bactéria e o nemátode, sugerindo que esta seja necessária para a invasão das células animais (McCall et al., 2008). O tratamento com antibiótico em animais coinfectados por estes nemátodes e *Wolbachia* causa modificações no nemátode, ocorrendo inibições reprodutivas e do desenvolvimento larvar (Taylor et al., 2005). Segundo alguns autores (Taylor e Hoerauf, 1999), as alterações observadas no verme após tratamento com o antibiótico confirmam a dependência do nemátode em relação à bactéria para a sua sobrevivência.

Resposta imunológica na presença de *Dirofilaria* spp.

Durante uma infecção por um nemátode parasita, como *Dirofilaria* spp., ocorre a ativação e polarização da resposta imune (Figura 17) sendo desencadeada uma resposta imune humoral de tipo Th2 com produção de anticorpos do tipo IgG₁ (Marcos-Atxutegi et al., 2003; Tezuka et al., 2003; Day, 2007). Este tipo de resposta é estimulado na presença de antígenos de *Dirofilaria* spp. e caracteriza-se pela produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL) 4 e IL-10 que inibem uma resposta imune celular (Th1) e estimulam uma resposta Th2 (Tezuka et al., 2003; Simón et al., 2012).

A presença de microfilárias circulantes está relacionada com o aumento das citocinas IL-4 e IL-10 que têm um papel imunossupressor no indivíduo infetado, permitindo que os vermes atinjam o estado adulto e apresentem uma elevada longevidade (Morchón et al., 2007; Simón et al., 2012). Esta longevidade pode, também, ser explicada pela capacidade destes nemátodes modular e suprimir a resposta imunitária do indivíduo infetado através dos seus produtos de excreção-secreção (Tezuka et al., 2003). Ativando mecanismos de sobrevivência estes parasitas conseguem “escapar” ao sistema imunológico (SI) do hospedeiro através, por exemplo, da captura de componentes da resposta imunitária pela cutícula do verme adulto (plaquetas, anticorpos do tipo IgG, moléculas do sistema complemento) que permitem diminuir/mascarar a reatividade dos seus antígenos.

A resposta mediada por anticorpos é eficaz na eliminação de microfilárias, ocorrendo a ligação de neutrófilos e a sua eliminação por mecanismos citotóxicos, mas sem consequência para os vermes adultos.

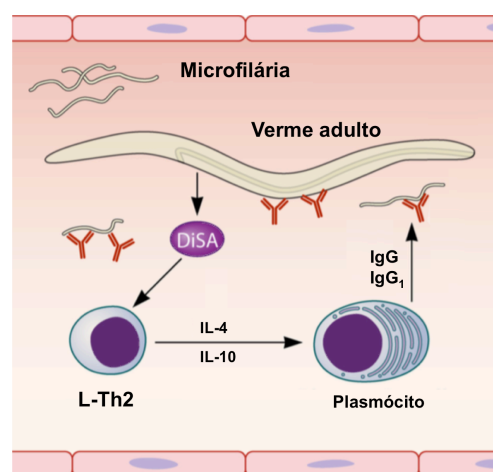


Figura 17: Ilustração da resposta imunitária ativada na presença de *Dirofilaria* spp. Fonte: adaptado de Simón et al (2012).

Resposta imunológica na presença de infecção com *Wolbachia* spp.

Após a libertação de bactérias *Wolbachia* spp. no decorrer das mudas durante o desenvolvimento do parasita ou após a sua morte, por ação do SI, tratamento antiparasitário ou morte natural (Bandi et al., 2001; Taylor et al., 2005), ocorre a polarização de uma resposta imune celular do tipo Th1 (Figura 18) (Bandi et al., 2001; Bazzocchi et al., 2003). O componente da bactéria que induz uma maior resposta no indivíduo infetado é a proteína de superfície da *Wolbachia* (WSP) (Kramer et al., 2005), sendo a resposta caracterizada pela libertação de interferão-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), IL-1, óxido nítrico (NO) e anticorpos do tipo IgG₂. Os componentes da bactéria estimulam ainda a resposta imune inata com a participação de macrófagos, neutrófilos e o recrutamento de moléculas de adesão e migração leucocitária que contribuem para o aumento da resposta inflamatória (Marcos-Atxutegi et al., 2003; McCall et al., 2008; Simón et al., 2012). A bactéria *Wolbachia* spp. está associada a uma resposta inflamatória e imunomoduladora durante as infeções por *D. immitis*.

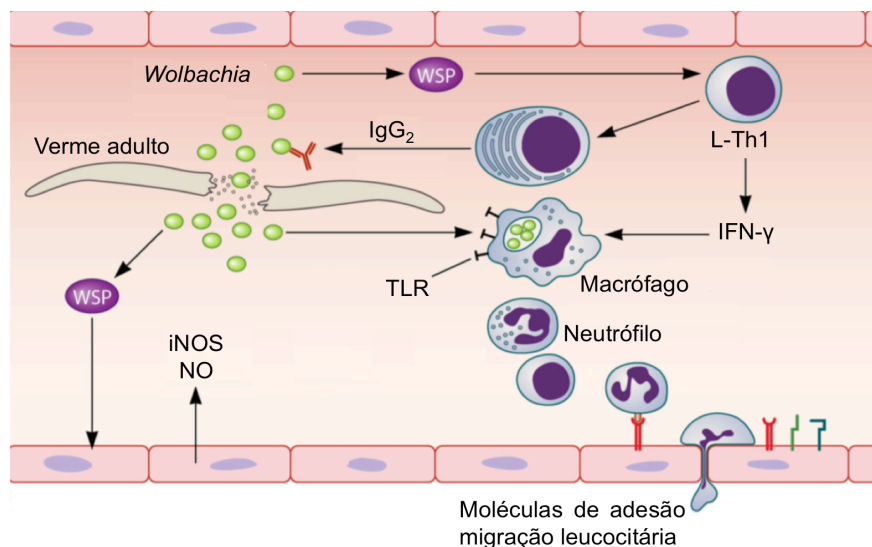


Figura 18: Ilustração da resposta imunitária ativada na presença de *Wolbachia* spp. Fonte: adaptado de Simón et al (2012).

Resposta imunológica na infecção *Dirofilaria* spp.-*Wolbachia* spp.

O tipo de resposta imunológica polarizada pelos antígenos na infecção *Dirofilaria* spp.-*Wolbachia* spp. está relacionado com a sobrevivência ou a morte dos parasitas presentes. As manifestações patológicas associadas a estas infecções estão relacionadas com o tipo de resposta imunológica, sendo descrito por alguns autores (Simón et al., 2001) que a intensidade da resposta imunológica contra a infecção por *D. immitis* está relacionada com a progressão e severidade da doença (Simón et al., 2007).

Alguns estudos (Nakagaki et al., 1993) mostram a presença de WSP em vários tecidos de cães que morreram da infecção por *D. immitis*, como nos pulmões, no fígado e nos rins. Neste estudo foi observada a presença destes componentes da bactéria em glomerulopatias, sendo associada a presença WSP à patologia renal.

Apesar dos antígenos da bactéria estimularem uma resposta inflamatória, a presença de antígenos de *Dirofilaria* spp. também podem estimular esta resposta (Simón et al., 2012).

A resposta estimulada na infecção *Dirofilaria* spp.-*Wolbachia* spp. não se encontra ainda bem esclarecida devido à sua alta complexidade (Kramer et al., 2005). O conhecimento da patogenia causada pela bactéria pode levar a um melhor conhecimento da patologia associada à dirofilariose possibilitando novas estratégias de tratamento para o controlo das filaríases (Taylor, 2002).

1.4. Profilaxia e Tratamento da dirofilariose

A quimioprofilaxia realiza-se com recurso Lactonas Macroclínicas, por via oral (ivermectina e milbemicina oxima) ou cutânea (moxidectina e selamectina). O regime de profilaxia deve ser efetuado com intervalos de 30 dias de 6 em 6 meses ou todo o ano, sendo este último o mais aconselhado em zonas endémicas (caso de Portugal). O uso de profilaxia permite a redução da prevalência da doença, diminuindo os reservatórios e consequentemente tem um efeito de controlo para cães e gatos que não estejam neste regime, além de prevenir contra outros parasitas intestinais e ectoparasitas. (McCall et al., 2008; AHS, 2014).

O tratamento da dirofilariose por *D. immitis* tem como principal objetivo a remoção de todos os estádios do parasita (microfilarias, larvas L3, L4, L5 e vermes adultos) evitando ao máximo lesões e complicações associadas. Inicialmente é feito um tratamento microfilaricida, com recurso a Lactonas Macroclínicas que apresentam ação contra microfíliarias, larvas L3 e L4 e em uso prolongado a vermes adultos. Após 2 meses é iniciado um tratamento adulticida, utilizado Melarsomina (*Melarsomine Dihydrochloride*) centrado na eliminação de vermes adultos. Cada tratamento tem os seus riscos associados sendo necessária a administração de outros fármacos para minimizar as complicações associadas à morte dos parasitas (AHS, 2014).

Um tratamento centrado na eliminação da bactéria *Wolbachia* spp. permite reduzir as reações adversas nos animais em tratamento contra a dirofilariose já que um antibiótico (como a doxiciclina) reage contra as vias metabólicas da bactéria e não contra as vias metabólicas do nemátode (Taylor et al., 2005). A utilização de um antibiótico permite reduzir a quantidade de bactérias *Wolbachia* spp. em todos os estádios do parasita. O uso combinado deste com o tratamento microfilaricida permite suprimir as microfíliarias libertadas pelos vermes adultos e aumenta a eficácia do tratamento, sendo mais eficaz na eliminação da bactéria e tendo um efeito de supressão da embriogénese e diminuindo a viabilidade dos vermes adultos. O uso deste antibiótico reduz o risco de lesões pulmonares associadas à morte dos parasitas quando ocorre o tratamento com adulticida, diminuindo a taxa de mortalidade associada ao tratamento de dirofilariose e, reduzindo o risco de choque anafilático após a libertação massiva de bactérias no organismo do indivíduo infetado pela morte das microfíliarias e de adultos (Bandi et al., 2001; Dingman et al., 2010; AHS, 2014). A quantidade de bactérias após o tratamento mantêm-se baixa até 12 meses. O antibiótico deve ser administrado durante 4 semanas após a deteção da infeção parasitária em conjunto com o tratamento microfilaricida (AHS, 2014).

Por vezes em infeções graves (no caso de Síndrome de Veia Cava) ocorre a remoção dos vermes adultos cirurgicamente da veia cava e/ou câmara direita do coração, sendo posteriormente o cão sujeito ao tratamento adulticida mas com menos probabilidade de complicações pulmonares (McCall et al., 2008; Bowman e Atkins, 2009).

No gato o tratamento contra dirofilariose só deve ocorrer na presença de sintomatologia, não estando bem definidas as contraindicações aos fármacos antiparasitários utilizados (Bowman e Atkins, 2009; Alho et al., 2012b). O tratamento microfilaricida e adulticida estão contraindicados devido ao risco de choque anafilático e à alta toxicidade dos fármacos (no caso da melarsomina), sendo também, a remoção cirúrgica desaconselhada devido ao tamanho diminuto da veia cava do gato. O tratamento mais indicado no caso do gato é o uso de corticoesteróides para controlo dos sintomas (Alho et al., 2012b).

O tratamento de dirofilariose causado por *D. repens* apresenta um regime de fármacos semelhante ao usado para *D. immitis* no cão, sendo possível remoção cirúrgica dos vermes tanto no cão como no gato (Alho et al., 2012b). No entanto este tratamento não se encontra bem descrito (Giannelli et al., 2013).

2. Objetivos

O lugar que os animais de companhia ocupam na sociedade atual, obriga a que os seus cuidadores lhes dediquem um maior cuidado e preocupação, pelo que o diagnóstico precoce de determinadas doenças, a pesquisa de novos fármacos e o desenvolvimento/adaptação de tratamentos que possibilitem o seu bem-estar e longevidade tem sido crescente. Como referido, a dirofilariose tem aumentado a sua incidência nestas populações e a presença das bactérias *Wolbachia* spp. nestes parasitas agravam a patologia. Atendendo a que a sua deteção é feita por técnicas moleculares exigindo recursos materiais com alguma complexidade, a identificação de potenciais biomarcadores da presença de *Wolbachia* spp. em animais infetados ou suspeitos de dirofilariose, por técnicas mais simples, pode ser uma ajuda importante na prática veterinária para uma abordagem terapêutica de menor risco, com efeitos secundários menos graves, principalmente nos casos de cargas parasitárias mais elevadas.

O presente trabalho tem como objetivo principal contribuir para o melhor conhecimento sobre a interação *Dirofilaria* spp.-*Wolbachia* spp., a nível imunológico pelo que foram definidos os seguintes objetivos específicos:

1. Caracterizar o perfil da resposta imune em cães infetados com *Dirofilaria* spp.-*Wolbachia* spp.;
2. Identificar biomarcadores preditivos de infeção por *Wolbachia* spp.

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização demográfica das amostras

O presente estudo integra-se no projeto ‘‘Ecoepidemiologia da *Dirofilaria* spp.’’. A população analisada foi constituída por indivíduos da espécie *Canis lupus familiaris* presentes em canis e associações de proteção de animais, com idade superior a 6 meses e a cada indivíduo amostrado foi realizado um exame do estado clínico geral (como a procura de alterações cardíacas através da auscultação) e uma colheita de sangue periférico pelos médicos veterinários (Alho et al., 2014).

Foram analisadas 245 amostras de sangue total com EDTA (conservadas a -20°C) das quais 123 positivas³ para *D. immitis* e 122 negativas, selecionadas aleatoriamente com base no programa SPSS correspondentes a cães examinados em 9 distritos de Portugal Continental (Figura 19). As amostragens foram realizadas de Outubro de 2011 a Agosto de 2014.

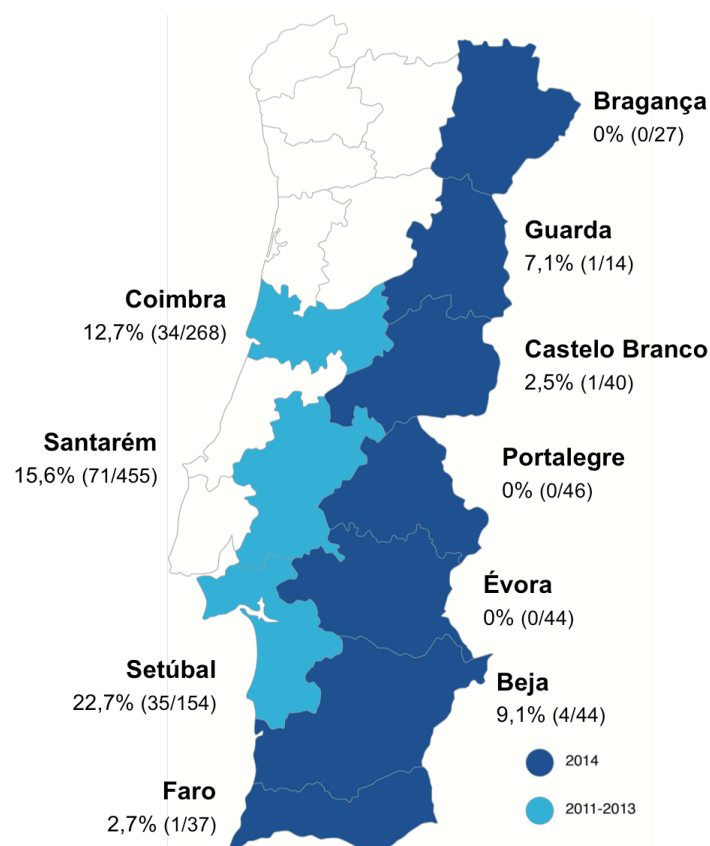


Figura 19: Mapa de Portugal Continental com os distritos amostrados durante o projeto e prevalências dos cães positivos para *Dirofilaria immitis*. Ilustração: Carlos Pereira.

³ *Dirofilaria immitis* foi detetada em 146 (13,2%) soros, no entanto só foi possível utilizar 123 soros.

3.2. Pesquisa de infecção por *Dirofilaria* spp. e *Wolbachia* spp.

As amostras de sangue utilizadas foram previamente examinadas para detecção de *Dirofilaria* spp. por métodos imunológicos, parasitológicos e moleculares, utilizando as seguintes técnicas: teste serológico comercial WITNESS[®] *Dirofilaria*, Técnica de Knott modificado, Técnica das Fosfatases Ácidas (Genchi et al., 2007) e técnica de PCR. No presente estudo foi realizada a técnica PCR em amostras referentes ao ano de 2014 (não analisadas anteriormente) para detecção de *D. immitis* e *Wolbachia* spp.

3.2.1. Extração de ADN

Para a detecção molecular de *Dirofilaria* spp. e *Wolbachia* spp. procedeu-se à extração de ADN genómico, segundo o método adaptado do protocolo de Stothard e colaboradores (1996), o qual apresenta uma comprovada eficácia, baixo custo e fácil execução, sendo regularmente utilizado no laboratório molecular de Helminologia e Malacologia Médicas (HMM).

Primeiramente o Tampão CTAB (100 mM Tris-HCl – Amresco[®], pH 8.0, 1,4M NaCl – Panreac[®], 20 mM EDTA – Amresco[®], 2% *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) – Amresco[®], 0,2% 2-mercaptoetanol - Amresco[®]) foi aquecido na estufa durante 10 minutos a 56°C. Em tubos *ependorf* de 1,5 ml colocou-se 100 µl da amostra de sangue, 600 µl de tampão CTAB e 10µl de Proteinase K (20 mg/ ml – Bioline[®]). Homogeneizou-se cada amostra, com o auxílio de setas estéreis e em seguida incubou-se durante 1 hora e 30 min a 55°C e agitando de 15 em 15 min. Após a incubação adicionou-se 600 µl de Clorofórmio: Álcool Isoamil (24:1) agitando logo de seguida por inversão durante 2 min e efetuando seguidamente uma centrifugação rápida. Posteriormente, adicionou-se 800 µl de etanol gelado em tubos de *ependorf* novos e retirou-se o sobrenadante obtido na centrifugação para esses tubos, centrifugando posteriormente a 13 000 rpm durante 20 min. Seguidamente descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* formado com 500 µl de etanol a 70%, realizando de seguida uma nova centrifugação de 15 min a 13 000 rpm. Por fim retirou-se o sobrenadante total, deixou-se secar o *pellet* na estufa (no máximo 15 min) e adicionou-se, depois de seco, 50 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

AppliChem[®]) para reidratar o *pellet*. Para assegurar que a extração foi bem sucedida, realizou-se a quantificação do ADN de cada amostra, utilizando o aparelho *Nanodrop-1000 V3.7.1*.

3.2.2. Detecção de *Dirofilaria* spp.

Para deteção de *D. immitis* foi realizada a técnica PCR, descrita por Rishniw *et al.*, (2006), utilizando-se *primers* específicos para a amplificação da região do gene ITS2 do ADN ribossomal (5.8S – ITS2 – 28S). O produto de amplificação esperado, encontra-se na ordem dos 542 pares de bases (pb), utilizando – se para esta amplificação o *primer forward* (DIDR – F1) 5' AGT GCG AAT TGC AGA CGC ATT GAG 3' e o seu complementar, *primer reverse* (DIDR – R1) 5' AGC GGG TAA TCA CGA CTG AGT TGA 3'. As reações de PCR foram realizadas num volume final de 25 µl, usando – se as seguintes concentrações finais dos reagentes: 1x *Green GoTaq Flexi Buffer* (5x – Promega[®]); 6 mM MgCl₂ (Promega[®]); 1,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP's); 0,1 U *GoTaq* (5U/µl – Promega[®]); 0,4 pM dos *primers* DIDR – F1 e DIDR – R1 e 2 µl de ADN, exceto o controlo negativo onde foi usada água. Para controlo positivo utilizou-se ADN de uma amostra confirmada para a presença de *D. immitis*.

O programa de amplificação realizou – se no termociclador (AVISO[®] GmbH – *Mechanic Systems*) com as seguintes condições: um passo de ativação da Taq durante 2 minutos a 94 °C, seguido de 32 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos e um passo final de extensão durante 7 minutos a 72°C. Para confirmar se a amplificação tinha sido bem sucedida realizou-se uma electroforese em gel de agarose (SeaKem[®] LE Agarose – Lonza[®]) a 130 V, sendo para isso preparado um gel de agarose a 1% utilizando tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA- AppliChem[®]), usado também como tampão de electroforese e corado com brometo de etídio (Bio-Rad[®]). Em cada poço colocou-se 6 µl de cada produto de PCR, exceto no primeiro poço onde foi colocado 5 µl de marcador de pesos moleculares (*HyperLadder II* – Bioline[®]). O resultado final foi visualizado no transiluminador *AlphaImager HP System*.

3.2.3. Detecção de *Wolbachia* spp.

Em todas as amostras positivas para *D. immitis*, considerando-se positiva qualquer amostra que apresentasse pelo menos um teste positivo (serológico, parasitológico ou molecular), realizou-se a deteção de *Wolbachia* spp. pela técnica de PCR descrita por Rossi e colaboradores (2010).

Para o PCR utilizou-se os *primers* específicos (16Wolb), *forward* 5'-GAA GAT AAT GAC GGT ACT CAC-3' e *Reverse* 5'-GTC ACT GAT CCC ACT TTA AAT AAC-3' para uma região do gene 16SrRNA e com um produto de amplificação encontrado na ordem dos 1018 pb. As reações de PCR foram realizadas em Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare®) num volume final de 25 µl, adicionando-se uma concentração de 0,8 pM de *primers* e 5 µl de ADN, com exceção do controlo negativo onde se adicionou água. Para controlo positivo utilizou-se ADN de uma amostra de sangue positiva para *Wolbachia*.

O programa de amplificação utilizado foi adaptado de Foster et al. (2008) por Landum et al. (2014) e apresentava as seguintes condições: um passo de ativação da Taq durante 4 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 segundos, hibridação a 58°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 2 minutos e um passo final de extensão durante 10 minutos a 72°C. Para confirmar se a amplificação tinha sido bem sucedida, realizou-se uma electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose – Lonza®) a 130 V, sendo para isso preparado um gel de agarose a 1% utilizando tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA- AppliChem®), usado também como tampão de electroforese e corado com brometo de etídio (Bio-Rad). Em cada poço colocou-se 6 µl de cada produto de PCR, exceto no primeiro poço onde foi colocado 5 µl de marcador de pesos moleculares (*HyperLadder II* – Bioline®). O resultado final foi visualizado no transiluminador *AlphaImager HP System*.

3.3. Análise da resposta imunoinflamatória

Obtenção de plasma a partir de sangue total com EDTA

De modo a obter plasma para a realização da técnica de ELISA, diluiu-se cada amostra de sangue total em CaCl₂ a 20%, na proporção de 1:50 e colocou-se a 4°C *overnight*. Após 24h centrifugou-se 956g durante 5-10 minutos e retirou-se o sobrenadante, correspondendo este ao plasma (Bioactiva diagnostica).

Antigénio de *Dirofilaria immitis*

Para a análise da resposta humoral utilizou-se o antigénio completo liofilizado de verme adulto de *Dirofilaria immitis* (AgDi) preparado *in house* (HMM) reconstituído em 1 ml de água destilada desionizada (H₂O dd).

Quantificação do extrato proteico total de *D. immitis*

Para a determinação da concentração proteica do AgDi utilizou-se o *kit* de quantificação de proteínas *Bicinchronic Acid Kit for Protein*–Sigma-Aldrich® de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio foi efetuado numa placa com 96 poços (BRANDplates®), os reagentes utilizados encontravam-se no *kit* de quantificação. A placa foi incubada durante 30 minutos a 37°C na estufa em agitação leve, medindo-se a absorvância a 562 nm no final da incubação. A concentração do AgDi, 462,8 µg/ml, determinada a através da equação da reta, $y=mx+b$.

3.3.1. Detecção de anticorpos IgG anti-*Dirofilaria immitis* por ELISA

A técnica de ELISA indireta foi realizada em 245 amostras, 123 positivas e 122 negativos. O protocolo utilizado para a técnica descrita por Berg, Tymoczko e Stryer (2002) e Harlow e Lane (1988) regularmente utilizado na Unidade de Clínica Tropical (IHMT).

Resumidamente, após determinação da concentração adequada, por titulação, de *AgDi*, soros e conjugados; as placas de ELISA com 96 poços (EIA/RIA Plate-Costar[®]) foram sensibilizadas com *AgDi* (1 ng/μl, 100 μl/poço) diluído em Tampão Bicarbonato pH 8,5 (NaHCO₃ 0,1 M) e colocada a 4°C em câmara húmida *overnight*. Após 24h efetuou-se a lavagem dos poços, três vezes, com 200 μl/poço com Tampão PBS (Na₂HPO₄ 0,0075M+Na₂H₂PO₄ 0,025M+NaCl 0,14M, pH 7,2)/*Tween*20 0,05% (PBST) e bloqueou-se com 200 μl/poço de Tampão de Bloqueio (PBS-Leite5%), incubando-se durante 60 minutos à temperatura ambiente (T.A.) sob agitação. Após nova lavagem com PBST aplicaram-se as amostras de soro, na diluição de 1:20 (bioactiva diagnostica) e na diluição 1:200 (soros obtidos após a colheita) diluídos em Tampão PBST-leite (PBS/*Tween*20 0,05%-leite 0,5%), nos poços selecionados, à exceção do poço branco onde foi colocado apenas Tampão PBST-leite e do poço *Horseradish Peroxidase*⁴ (HRP) que ficou vazio. A placa de ELISA incubou durante 60 minutos à T.A. sob agitação. Posteriormente foram realizadas três lavagens e incubou-se a placa com 100 μl/poço de solução de anticorpo secundário, composta por IgG anti-canino (Sigma-Aldrich[®]) numa diluição de 1:10 000 diluída em Tampão PBST-leite, durante 1 hora à T.A e sob agitação. Seguidamente, foram realizadas cinco lavagens com PBST e dispensados 100 μl/poço de solução de substrato para HRP (10 mg de ortofenilenodiamina (OPD)-Sigma-Aldrich[®] diluídos em 10 ml de Tampão citrato pH 5 (Ácido cítrico 0,1 M + Fosfato dissódico-Na₂HPO₄.12H₂O 0,1 M) e 10 μl H₂O₂-Sigma-Aldrich[®]), incubando-se durante 30 minutos ao abrigo da luz. No final da incubação adicionaram-se 50μl/poço de solução STOP (H₂NO₄.4N) e mediu-se a densidade óptica (D.O.) a 490 nm num leitor de placas (*Microplate reader model 680* - Bio-Rad). A leitura foi efetuada num intervalo de 30 minutos após a adição da solução STOP.

Em cada placa de ELISA testada reservou-se um poço para o “branco”, outro para o controlo de HRP, dois poços para os controlos positivos e quatro poços para os controlos negativos. Todas as amostras foram efetuadas em duplicado. O *cut-off* foi calculado com base na média das absorvâncias dos controlos negativos adicionada de dois desvios padrão (X+2SD). Todas as amostras abaixo do *cut-off* foram consideradas negativas e acima deste valor positivas.

⁴ Controlo para observar a existência de uma ligação inespecífica entre o extrato e o anticorpo secundário.

3.3.2. Detecção de anticorpos IgG₁ e IgG₂ anti-*Dirofilaria immitis* por ELISA

Para a deteção das subclasses de anticorpos do tipo IgG₁ e IgG₂ utilizou-se o protocolo e procedimentos acima mencionado com a variação nas diluições, 1: 10 000 e 1: 25 000, respetivamente e a diluição dos soros a 1:100. Testaram-se 164 amostras, correspondentes a todas as amostras positivas para *D. immitis* e as amostras negativas que apresentavam valor positivo para anticorpos do tipo IgG e valores próximo do *cut-off*.

3.3.3. Detecção da Proteína C-Reativa por ELISA

A deteção e quantificação da Proteína C-Reativa (*CRP*) através da técnica de ELISA foi realizada de acordo com o protocolo do *Kit Canine C-Reactive Protein (CRP) ELISA kit*-BD BiosciencesTM. Um total de 88 amostras foram analisadas, 80 amostras positivas para *D. immitis* (infecção simples e coinfeção com *Wolbachia*) e por qualquer um dos testes descritos acima e oito amostras negativas escolhidas aleatoriamente.

Através da equação da reta $y=mx+b$, foi traçada uma curva padrão de modo a obter a concentração da *CRP* ($\mu\text{g/ml}$) em cada amostra testada.

3.4. Considerações Ética e Legais

O projeto “Ecoepidemiologia de *Dirofilaria* spp: caracterização molecular, vetores potenciais e dinâmica de transmissão” (PTDC/SAUSAP/113523/2009), foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) a 15 de Fevereiro de 2013. As entidades municipais e privadas das regiões alvo do estudo emitiram parecer positivo para a realização e elaboração de todas as fases do referido projeto. Todas as pessoas e instituições envolvidas na realização deste projeto, foram previamente esclarecidas sobre o propósito e finalidade do mesmo. Os dados recolhidos durante a realização do projeto acima mencionado, estão sujeitos a sigilo e confidencialidade. Após a devida análise da informação obtida, será facultada aos respetivos responsáveis das instituições envolvidas.

3.5. Análise Estatística

Para a organização e análise estatística dos dados obtidos no presente estudo foram utilizados os programas *Microsoft Office Excel 2011* e *IBM SPSS* para Windows 8, respectivamente.

Para a análise das variáveis qualitativas e quantitativas utilizou-se o teste de Qui-Quadrado e os testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney). Sempre que necessário utilizou-se o teste de correlação de Spearman para análise de associação entre os parâmetros parasitológicos (microfilarémia) e imunoinflamatórios (anticorpos do tipo IgG, IgG₁ e IgG₂ e *CRP*). O nível de significância foi de 5%.

4. Resultados

4.1. População canina analisada

4.1.1. Infecção por *Dirofilaria immitis*

Das técnicas utilizadas para o diagnóstico de *D. immitis* no total de amostras de sangue (n=1117) dos caninos – teste serológico comercial *WITNESS*[®] *Dirofilaria*, Técnica de Knott modificado e técnica de PCR, a técnica de PCR foi a mais sensível na deteção do parasita (Tabela 1). A técnica de Knott foi a que apresentou o grau de concordância mais elevado com a técnica de PCR (K=0,905; $P<0,05$) em comparação com a técnica serológica (*WITNESS*[®] *Dirofilaria*) em que o grau de concordância foi de K=0,591 ($P<0,05$).

Tabela 1: Número total de amostras analisadas para a deteção de *Dirofilaria immitis* pelos métodos de *WITNESS*[®] *Dirofilaria*, Knott modificado e PCR em 10 distritos de Portugal Continental.

Deteção de <i>D. immitis</i> em relação aos métodos de diagnóstico			
Técnicas	Positiva	Negativa	Prevalência %
<i>WITNESS</i> [®] <i>Dirofilaria</i>	81	1036	7,25
Técnica de Knott modificado	119	998	10,65
Técnica de PCR	128	989	11,46
Total (WT+Kn+PCR)	146	971	13,01

A amostra de soros selecionados (n=245) para a análise da resposta imunoinflamatória dos quais 123 positivos para *D. immitis* (parasitológica e/ou serologicamente) e 122 negativos selecionados aleatoriamente com base no programa SPSS, correspondia a nove dos dez distritos amostrados durante o projeto, sendo o número de cães do sexo feminino (128/245) ligeiramente superiores às do sexo masculino (117/245). A média de idades da população canina estudada era de 6 anos com um erro padrão de 3,2 anos, variando de 6 meses a 16 anos.

As 123 amostras positivas para *D. immitis* corresponderam a animais de sete distritos sendo Santarém o distrito com mais cães infetados (60/123) e Castelo Branco, Faro e Guarda os menos infetados (1/123). A infecção foi superior nos machos com 52,8% (65/123) de positivos, enquanto as fêmeas apresentaram uma prevalência de 47,2% (58/123). Do total de positivos, 79,7% (98/123) apresentavam microfíliarias

circulantes e 9,8% (12/123) tinham infecção oculta. Os valores de microfilarémia foram categorizados em leve (1-4 microfílarias (mf) por 20 µl de sangue), moderada (5-20 mf/20 µl de sangue) e elevada (mais de 20 mf/20 µl de sangue - Tabela 2) sendo predominante a presença de animais com microfilarémia leve (1-4 mf/20 µl de sangue) correspondendo a 57,7% (71/123).

Tabela 2: Grau de microfilarémia nos sangues de cães infetados com *D. immitis*.

Microfilarémia (em 20 µl de sangue)	Prevalência de cães infetados
Negativo	10,6% (13/123)
1-4 mf	57,7% (71/123)
5-20 mf	9,8% (12/123)
>20 mf	12,2% (15/123)

4.1.2. Presença de *Wolbachia* spp. em amostras positivas para *D. immitis*

Em todas as amostras positivas para *D. immitis* foi realizada a técnica de PCR para a detecção da bactéria *Wolbachia* spp. Foram encontradas 23 amostras positivas para *Wolbachia* spp. correspondendo a uma prevalência de 18,7% (23/123) e onde 60,9% (14/23) correspondiam a animais do sexo masculino e 39,1% (9/23) ao sexo feminino. A coinfeção foi predominante nos animais com idade superior a 2,5 anos (Figura 20).

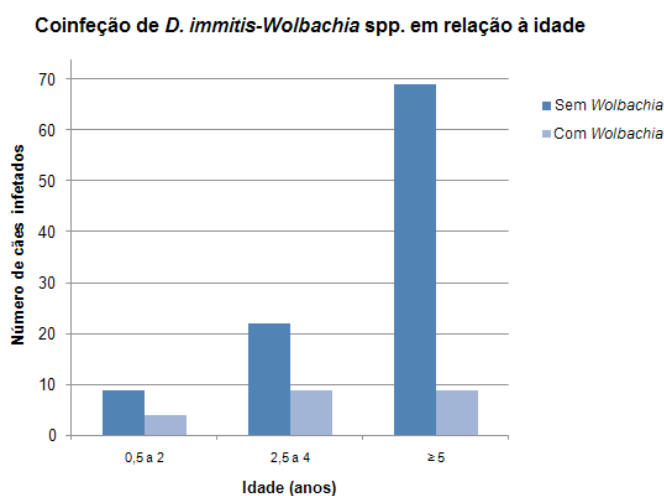


Figura 20: Coinfeção de *D. immitis*-*Wolbachia* spp. em relação à idade.

4.2. Caracterização da análise imunoinflamatória

4.2.1. Resposta imune humoral – anticorpos IgG anti-*D. immitis*

Das 245 amostras de soro testadas pela técnica de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Dirofilaria immitis*, 33,5% (82/245) apresentaram níveis séricos superiores ao *cutoff* (D.O. $\geq 0,347$) e 66,5% (163/245) valores inferiores. Os animais parasitados apresentavam níveis de anticorpos IgG superiores (sem diferenças significativas) em comparação com os negativos para *D. immitis* (Figura 21). Em relação à microfilarémia verificou-se uma correlação positiva mas não significativa (coeficiente de Spearman $r_s=0,048$, $P>0,05$) com o nível de anticorpos do tipo IgG; com efeito, quanto maior o número de microfílarias sanguíneas mais elevados eram os níveis de anticorpos IgG anti-*D. immitis* (Figura 22).

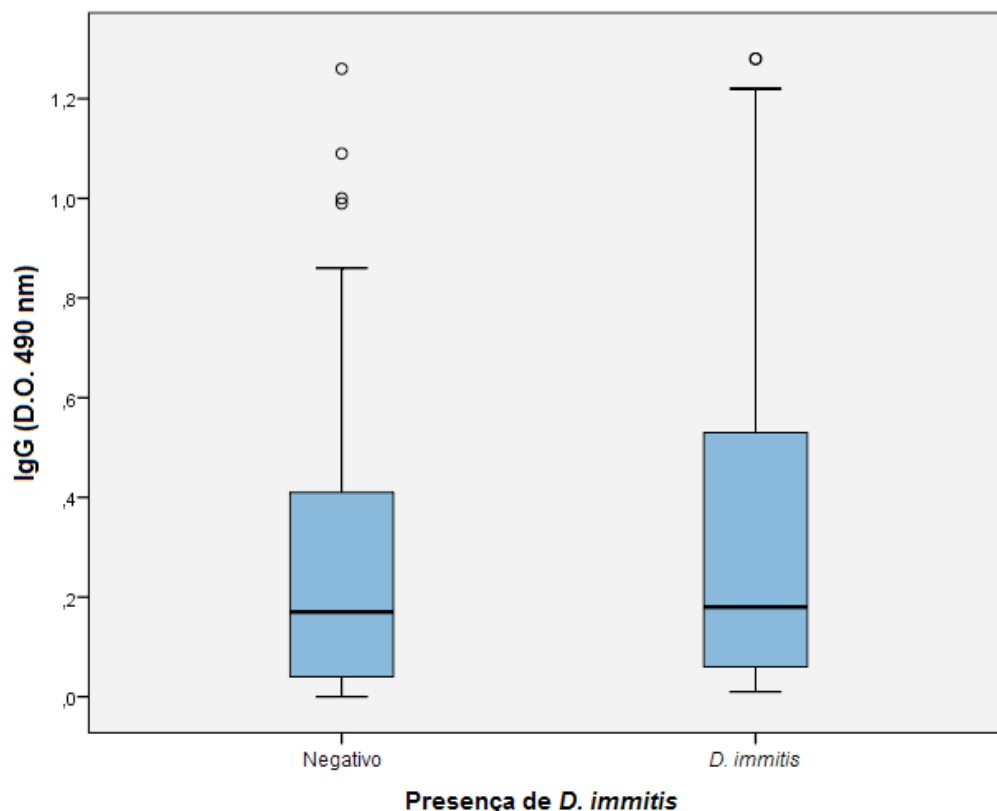


Figura 21: Níveis séricos de anticorpos IgG na ausência e presença de infecção por *Dirofilaria immitis*.

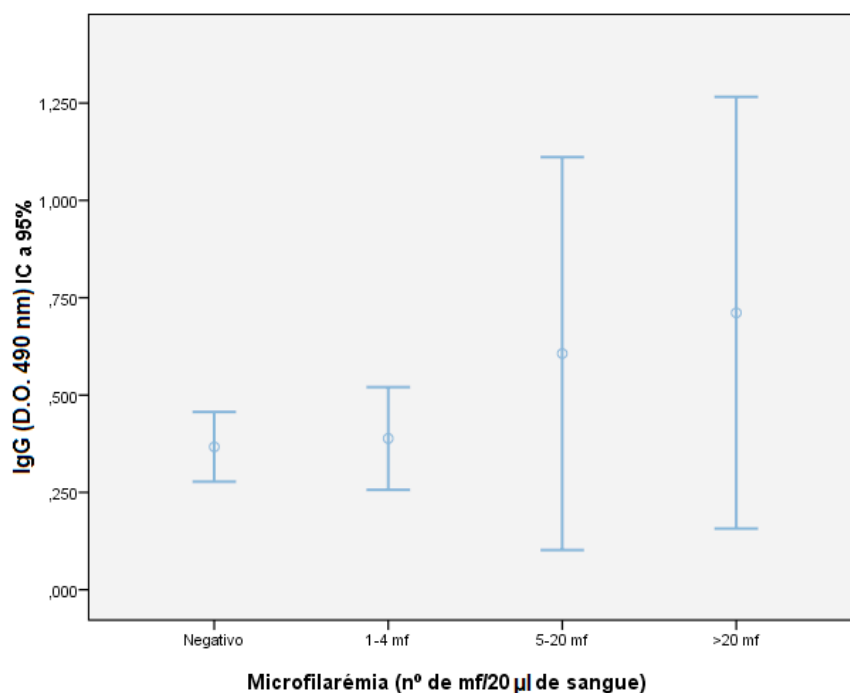


Figura 22: Níveis séricos de anticorpos IgG anti-*Dirofilaria immitis* em relação à microfilarémia.

Contudo, a presença de *Wolbachia* spp. parece alterar a resposta humoral dos anticorpos tipo IgG (sem diferenças significativas) nomeadamente nos animais com maior microfilarémia notando-se o decréscimo dos níveis de anticorpos IgG inversamente proporcional à microfilarémia (Tabela 3 e Figura 23).

Tabela 3: Valores medianos da concentração de anticorpos IgG anti-*Dirofilaria immitis* na ausência e presença de coinfeção com a bactéria *Wolbachia* spp.

Concentração dos anticorpos de IgG (\pm S.E.) na ausência e presença de *Wolbachia* spp.

Microfilarémia (em 20 µl de sangue)	Sem <i>Wolbachia</i> spp.	Com <i>Wolbachia</i> spp.
1-4 mf	0,160 (\pm 0,51)	0,220 (\pm 0,22)
5-20 mf	0,060 (\pm 0,29)	0,880 (\pm 0,34)
> 20 mf	0,305 (\pm 0,30)	0,130 (\pm 0,61)

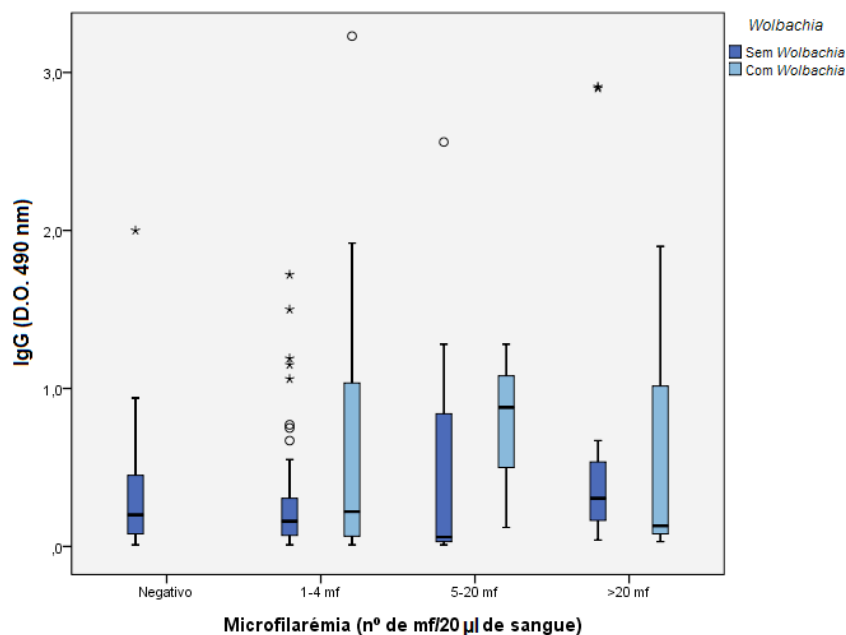


Figura 23: Níveis séricos de anticorpos IgG em relação ao número de microfilárias circulantes na presença e na ausência de coinfeção com a bactéria *Wolbachia* spp.

Quanto à comparação dos níveis de anticorpos do tipo IgG na coinfeção *D. immitis*-*Wolbachia* spp. em relação ao gênero apesar da sua ocorrência ser superior nos machos, a concentração de IgG era mais elevada nas fêmeas o que poderá estar associada à maior número de animais deste grupo com microfilarémia moderada (Figura 24).

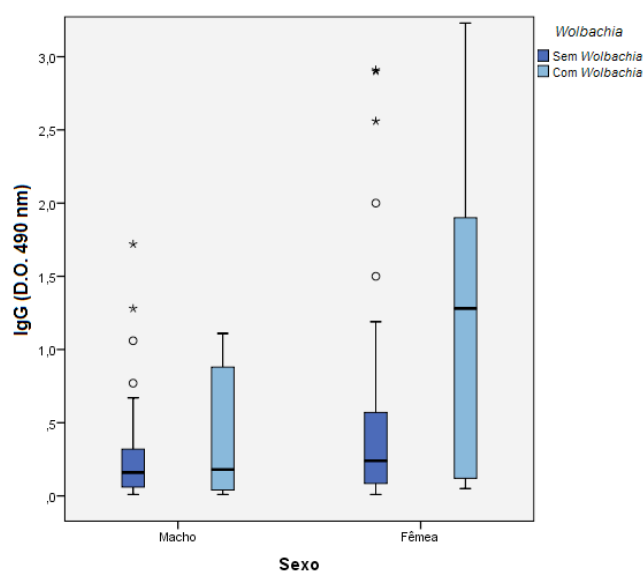


Figura 24: Níveis séricos de anticorpos IgG na ausência e presença de coinfeção em relação ao gênero dos cães analisados.

Quanto à idade, os níveis séricos de IgG na presença de coinfeção foram mais elevados no grupo etário intermédio (2,5-4 anos) apesar da prevalência da coinfeção ser idêntica nos grupos etários mais velhos (> 2 anos-Figura 25).

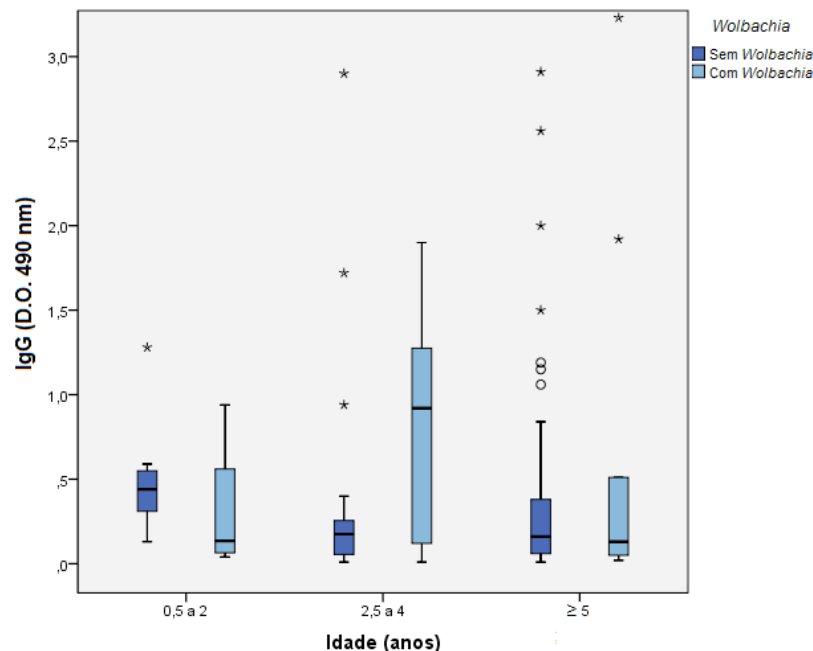


Figura 25: Níveis séricos de anticorpos IgG na ausência e presença de coinfeção com a bactéria *Wolbachia* spp. em relação à idade dos cães analisados.

4.2.2. Resposta imune – anticorpos IgG₁ e IgG₂ anti-*D. immitis*

Um total de 164 amostras, 123 positivas para *D. immitis* e 41 negativas, foram analisadas para a deteção de anticorpos do tipo IgG₁ e IgG₂ pela técnica de ELISA. Em 64% (105/164) e 43,9% (72/164) das amostras foi detetada uma concentração de anticorpos IgG₁ e IgG₂, respetivamente, superior ao *cutoff* (D.O. ≥ 0,101). Ao contrário do observado para os anticorpos do tipo IgG os cães com resultado parasitológico negativo apresentaram níveis séricos de IgG₁ e IgG₂ superiores aos positivos para *D. immitis*, com diferenças significativas (Mann-Whitney, $P < 0,05$ -Figura 26).

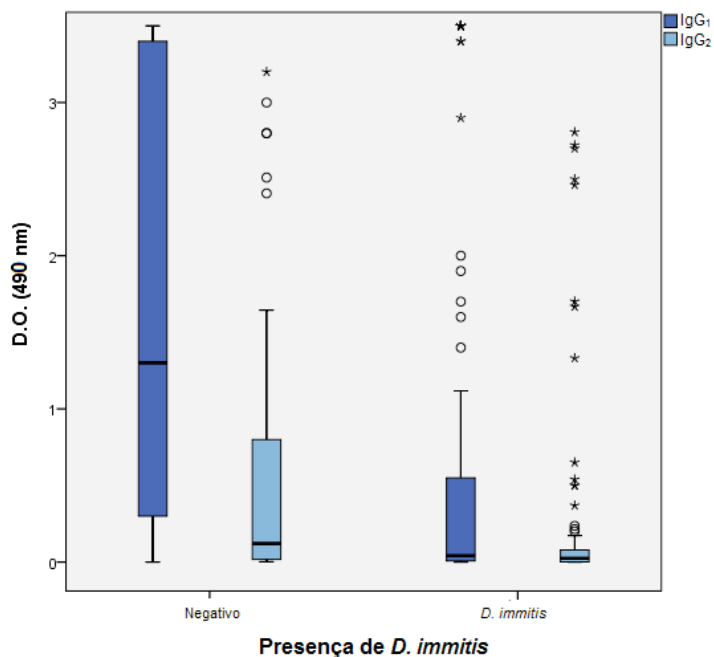


Figura 26: Níveis séricos de anticorpos IgG₁ e IgG₂ na presença e ausência de *D. immitis*.

Analisado a relação com a microfilarémia verificou-se uma correlação negativa significativa com os isotipos; com efeito quanto maior a microfilarémia menores eram os níveis séricos de IgG₁ ($r_s = -0,289$, $P < 0,01$) e de IgG₂ ($r_s = -0,307$, $P < 0,01$ -Figura 27).

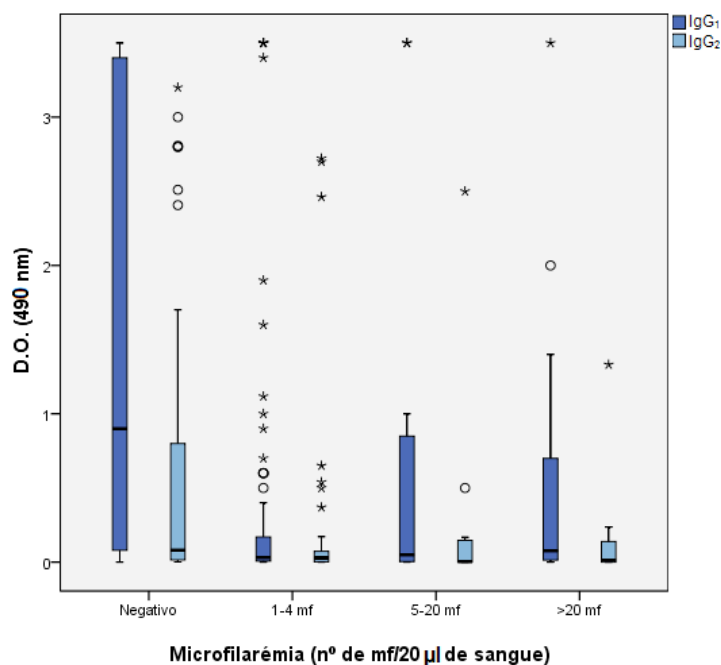


Figura 27: Níveis séricos de anticorpos IgG₁ e IgG₂ em relação ao número de microfílaras circulantes na presença e na ausência de *Wolbachia* spp.

No entanto, a presença de *Wolbachia* spp. parece ter uma influência na concentração destas subclasses de anticorpos; nos casos de microfilarémia moderada a concentração dos anticorpos IgG₁ e IgG₂ aumentava (sem diferenças significativas – Mann-Whitney, $P>0,05$) diminuindo nos cães com microfilarémia mais elevada (Tabela 4, Figura 28 e Figura 29).

Tabela 4: Valores medianos da concentração de anticorpos IgG₁ e IgG₂ anti-*D. immitis* na ausência e presença de coinfeção com a bactéria *Wolbachia* spp.

Concentração dos anticorpos de IgG₁ (± S.E.) na ausência e presença de *Wolbachia* spp.

Microfilarémia (em 20 µl de sangue)	Sem <i>Wolbachia</i> spp.	Com <i>Wolbachia</i> spp.
1-4 mf	0,018 (± 0,13)	0,074 (± 0,23)
5-20 mf	0,033 (± 0,38)	0,071 (± 1,15)
> 20 mf	0,138 (± 0,32)	0,067 (± 0,25)

Concentração dos anticorpos de IgG₂ (± S.E.) na ausência e presença de *Wolbachia* spp.

Microfilarémia (em 20 µl de sangue)	Sem <i>Wolbachia</i> spp.	Com <i>Wolbachia</i> spp.
1-4 mf	0,012 (± 0,08)	0,059 (± 0,035)
5-20 mf	0 (± 0,06)	0,061 (± 0,82)
> 20 mf	0,024 (± 0,11)	0 (± 0,08)

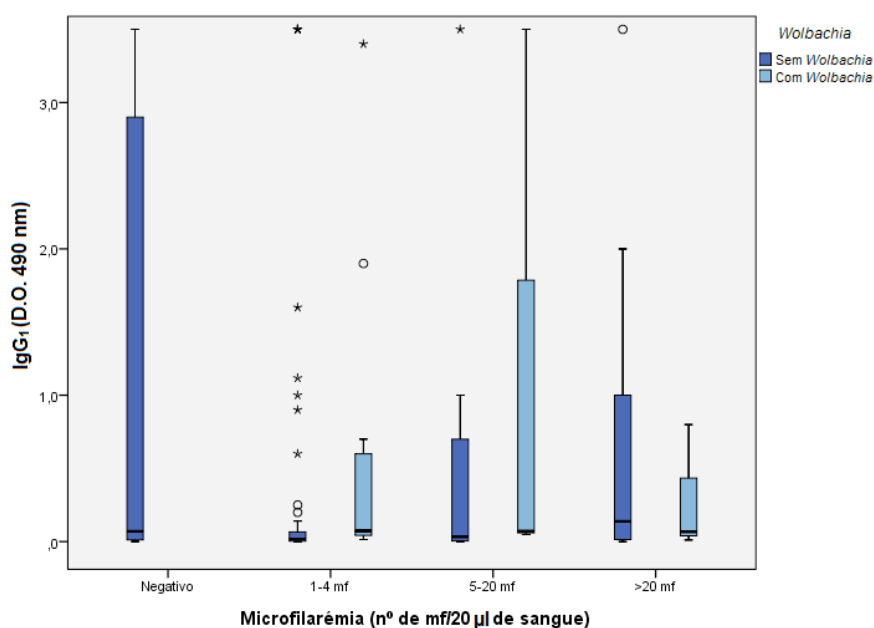


Figura 28: Concentração de anticorpos IgG₁ em relação à microfilarémia na presença e na ausência de coinfeção com *Wolbachia* spp.

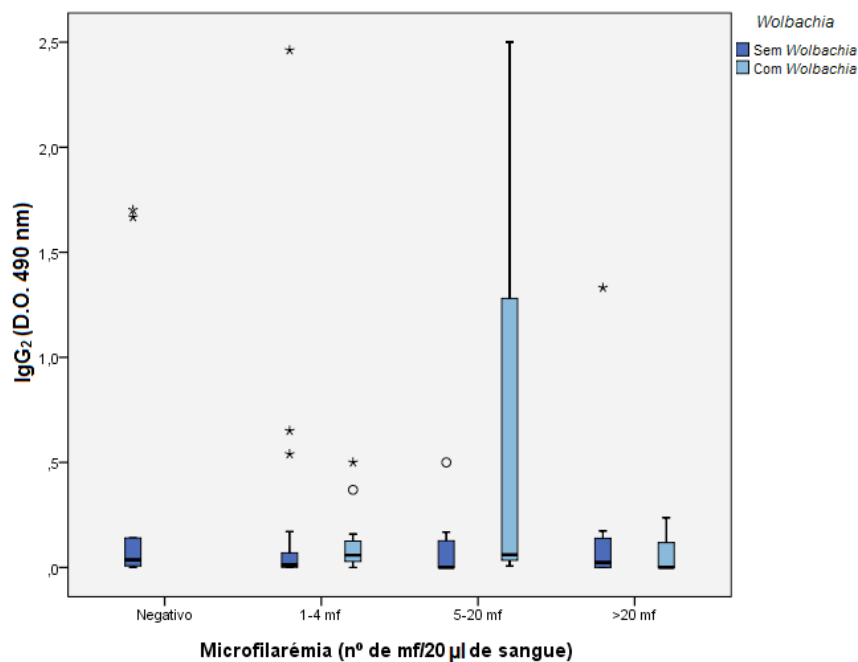


Figura 29: Níveis séricos de anticorpos IgG₂ em relação ao número de microfílaras circulantes na presença e na ausência de coinfeção com *Wolbachia* spp.

Como observado nos níveis de anticorpos IgG anti-*D. immitis*, nos casos de coinfeção (*Wolbachia* spp.) as fêmeas apresentaram concentrações de IgG₁ e IgG₂ mais elevadas, apesar de não haver diferenças significativas (Mann-Whitney, $P > 0,05$ -Figuras 30 e 31).

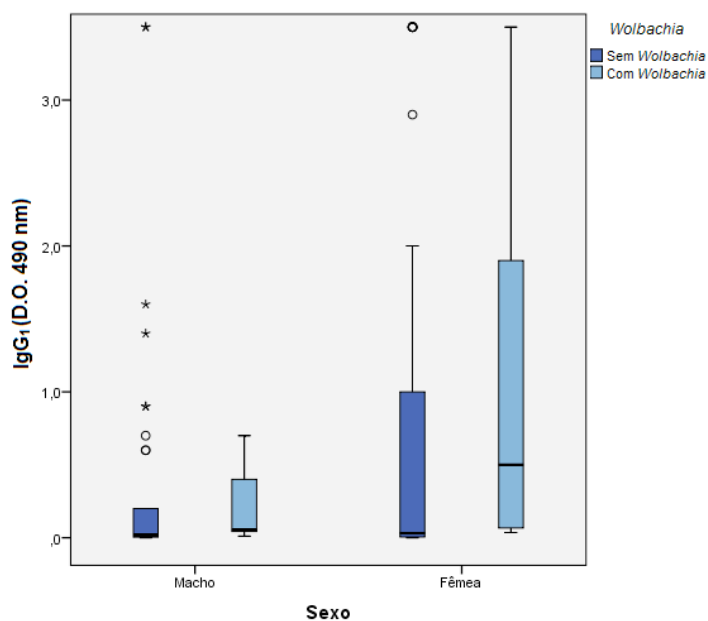


Figura 30: Níveis séricos de anticorpos IgG₁ na ausência e presença de coinfeção em relação ao gênero dos canídeos analisados.

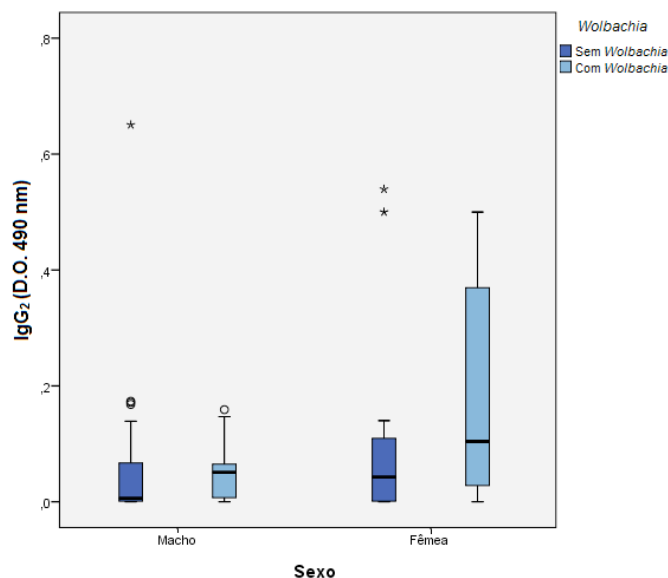


Figura 31: Níveis séricos de anticorpos IgG₂ na ausência e presença de coinfeção em relação ao género dos canídeos analisados.

Relativamente à idade verificou-se que na presença de coinfeção os níveis de IgG₁ mais elevados situavam-se no grupo etário intermédio (2,5-4 anos), tal como o observado para a concentração dos anticorpos do tipo IgG (Figura 32). No caso dos anticorpos do tipo IgG₂ não foram verificadas diferenças entre os níveis de anticorpos IgG₂ e a presença de coinfeção em cada grupo etário (Figura 33).



Figura 32: Concentração da IgG₁ na ausência e presença de coinfeção com a bactéria *Wolbachia* spp. em relação à idade dos canídeos analisados.

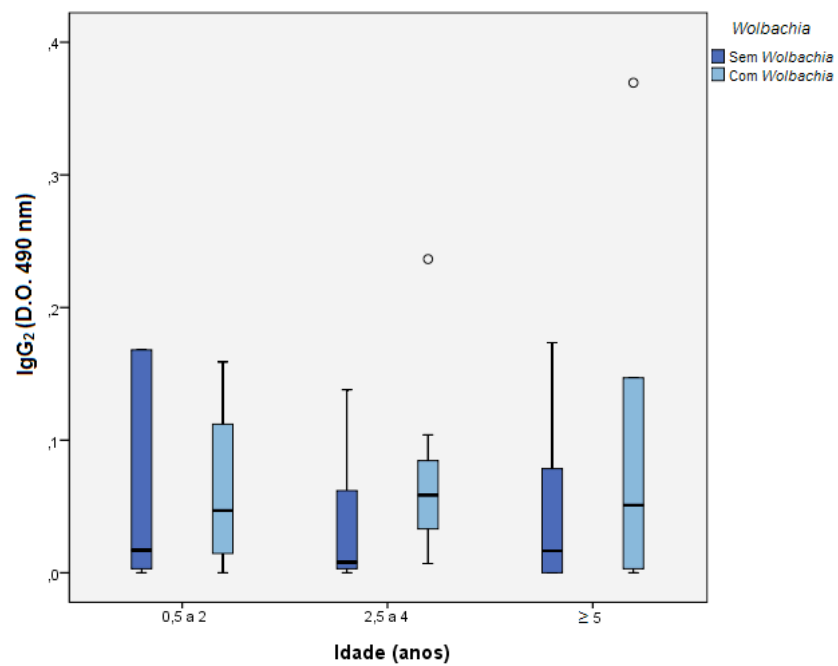


Figura 33: Níveis séricos da IgG₂ na ausência e presença de coinfeção com a bactéria *Wolbachia* spp. comparativamente à idade dos canídeos analisados.

4.2.2. Análise da Proteína C-Reativa nos soros dos canídeos

A detecção da proteína C-Reativa (*CRP*) pela técnica de ELISA foi feita nos seguintes soros: *D. immitis* positivo-*Wolbachia* spp. negativo (n=58); *D. immitis*-*Wolbachia* spp. positivo (n=23) e nove soros sem qualquer infecção (negativos). O aumento dos níveis de *CRP* verificou-se nos casos de coinfeção, com diferenças significativas (Mann-Whitney, $P < 0,05$) (Figura 34).

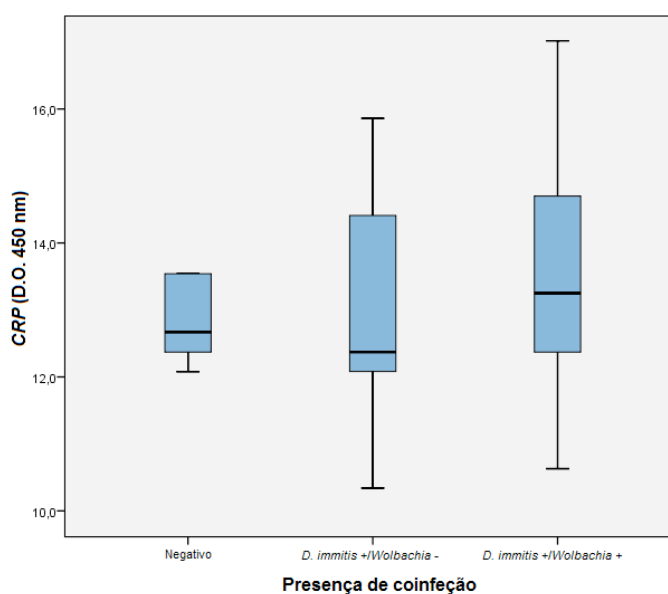


Figura 34: Concentração da *CRP* ($\mu\text{g/ml}$) na presença de infecção simples por *D. immitis* e na com coinfeção *D. immitis*-*Wolbachia* spp.

Para além disso, observou-se que a concentração da *CRP* estava correlacionada positivamente (não significativa - coeficiente de Spearman $r_s = 0,032$ $P > 0,05$) com o grau de microfilarémia (Tabela 5 e Figura 35).

Tabela 5: Valores medianos da concentração da *CRP* ($\mu\text{g/ml}$) na ausência e presença de coinfeção com a bactéria *Wolbachia* spp.

Concentração da <i>CRP</i> (\pm S.E.) no sangue dos canídeos na ausência e presença de <i>Wolbachia</i> spp.		
Microfilarémia (em 20 μl de sangue)	Sem <i>Wolbachia</i> spp. ($\mu\text{g/ml}$)	Com <i>Wolbachia</i> spp. ($\mu\text{g/ml}$)
1-4 mf	12,37 (\pm 4,08)	13,40 (\pm 0,64)
5-20 mf	12,37 (\pm 0,42)	14,12 (\pm 4,39)
> 20 mf	12,67 (\pm 0,42)	15,57 (\pm 1,28)

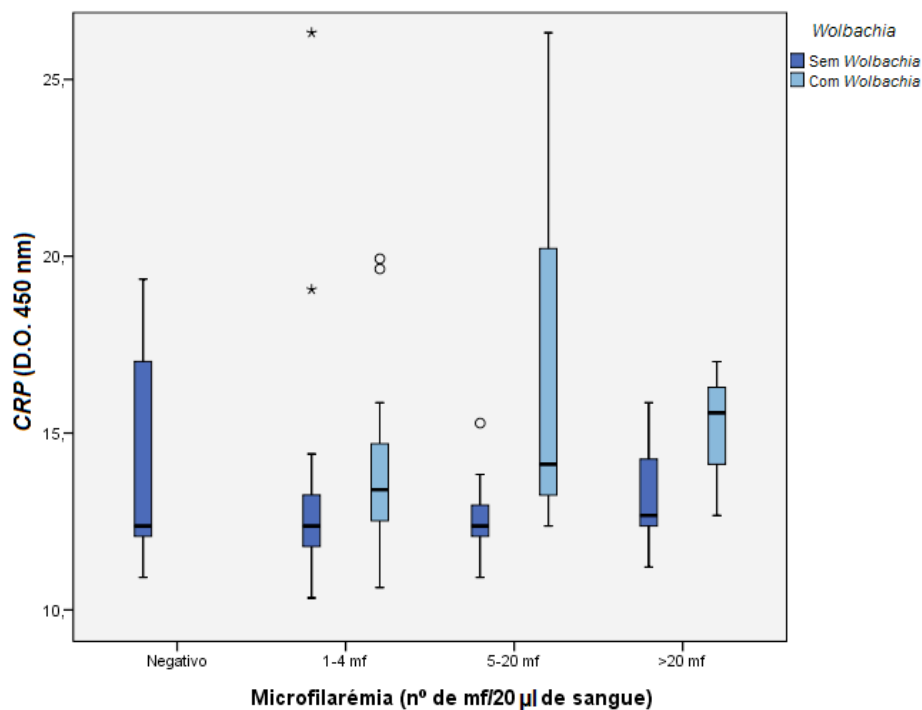


Figura 35: Concentração da *CRP* ($\mu\text{g/ml}$) em relação à microfilarémia na presença e ausência da bactéria *Wolbachia* spp.

À semelhança do observado para a resposta humoral (IgGs) a concentração da *CRP* foi superior nas fêmeas e na coinfeção com *Wolbachia* (Figura 36).

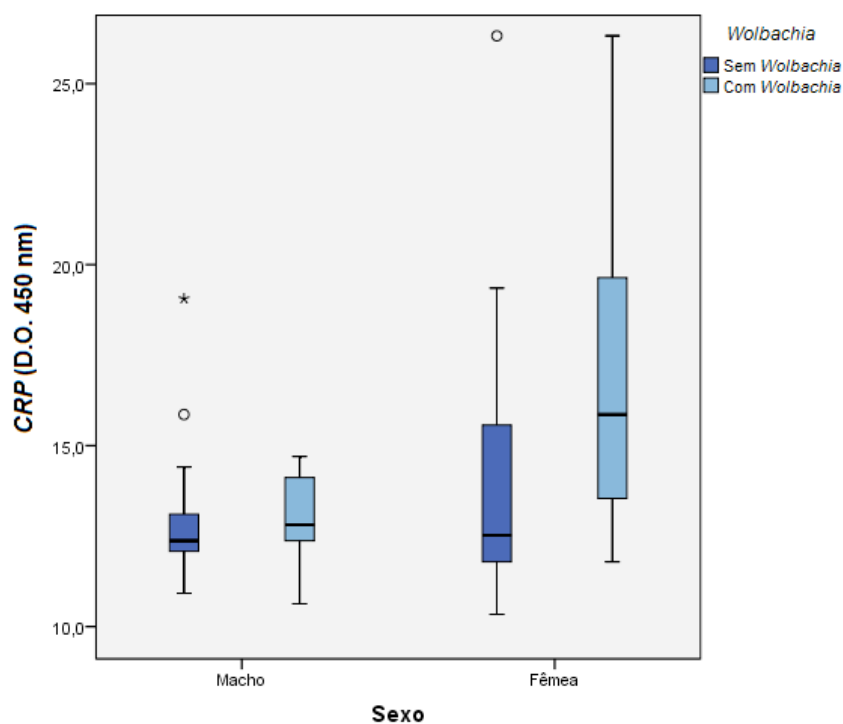


Figura 36: Concentração da *CRP* ($\mu\text{g/ml}$) na ausência e presença de coinfeção em relação ao gênero dos canídeos analisados.

Um padrão idêntico verificou-se, também, em relação à idade; os cães do grupo etário intermédio (2,5 a 4 anos) eram os que apresentavam concentração superior de *CRP* tal como o observado para as IgGs (Figura 37).

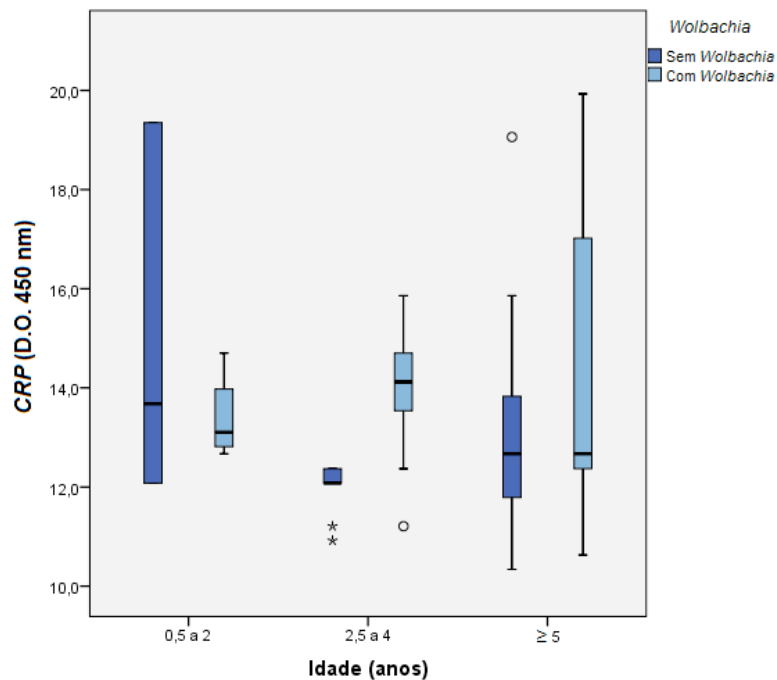


Figura 37: Concentração da *CRP* ($\mu\text{g/ml}$) na ausência e presença de coinfeção com a bactéria *Wolbachia* spp. em relação à idade dos canídeos analisados.

5. Discussão e Conclusões

A patologia associada às filariose está relacionada com o tipo de resposta imunológica induzida pelo parasita. Os antígenos de *D. immitis* desencadeiam uma resposta humoral do tipo Th2 com produção de anticorpos da classe IgG e subclasses (IgG₁). A presença do endossimbionte *Wolbachia* spp. nos vermes de *Dirofilaria* spp. induz uma resposta celular do tipo Th1, particularmente durante as fases de desenvolvimento do parasita, com produção de anticorpos do tipo IgG₂ (Bandi et al., 2001; Taylor et al., 2005) e consequente agravamento da patogenia (Bazzocchi et al., 2003; Marcos-Atxutegi et al., 2003; Morchón et al., 2004). Aquando a morte dos vermes, após terapêutica antiparasitária, grandes quantidades de bactérias *Wolbachia* spp. são libertadas no organismo, levando a reações anafiláticas que podem causar a morte do animal parasitado.

A detecção atempada de *Wolbachia* spp. antes de se iniciar o tratamento pode diminuir a taxa de mortalidade e aumentar a eficácia do tratamento adulticida através da administração de um antibiótico de largo espectro (Bandi et al., 2001; Dingman et al., 2010; AHS, 2014). Contudo, é fundamental a sua detecção por métodos simples e sensíveis, em alternativa à técnica de PCR; esta é descrita como a principal metodologia para detecção da bactéria, no entanto, apresenta altos custos de execução. Com efeito, no presente estudo, os métodos moleculares (técnica de PCR) apresentaram maior especificidade e sensibilidade na detecção de *Dirofilaria immitis* e *Wolbachia* spp. em comparação com métodos serológicos e parasitológicos (Tabela 1; Página 43).

Na análise da resposta imune, observou-se um aumento dos níveis de anticorpos IgG anti-*D. immitis* na infeção por *D. immitis*, sendo este aumento diretamente proporcional ao grau de microfilarémia (Figura 22; Página 46). Estes resultados estão em concordância com outros estudos (Simón et al., 2007) onde os autores descrevem um aumento da produção de anticorpos do tipo IgG na presença de microfilarémia comparativamente a animais negativos. Pelo contrário, verificou-se que os níveis séricos das subclasses de anticorpos (IgG₁ e IgG₂) eram superiores na ausência de infeção (Figura 26; Página 49), o que se encontra em discordância com outros trabalhos (Simón et al., 2007, 2012). Estes autores descrevem um aumento dos anticorpos do tipo IgG₁ na presença de microfilarémia, sendo a resposta Th2 direcionada para infeções ativas e apenas em animais microfilarémicos enquanto anticorpos do tipo IgG₂ foram detetados tanto em animais amicrofilarémicos e/ou com microfilarías circulantes e

apenas contra antígenos da bactéria. Os valores mais elevados nas subclasses poderão dever-se à presença de outros nemátodes parasitas que causem uma resposta não específica, já que os cães apresentam grande variedade de nemátodes parasitas. Outra razão poderá estar relacionada com os métodos serológicos que detetam tanto infecções ativas como passadas, existindo nestes animais a presença de anticorpos anti-*D. immitis* mas já não ser detetada microfilarémia. Neste estudo, observando os valores das subclasses de anticorpos em relação ao grau de microfilarémia foi possível constatar ainda que, estes aumentaram com o número de microfilárias circulantes, apesar dos níveis serem inferiores aos valores detetados em cães negativos (Tabela 4; Página 50).

Na presença de coinfeção *D. immitis-Wolbachia* spp. verificou-se um aumento dos níveis de anticorpos do tipo IgG₁ e IgG₂ comparativamente aos animais apenas infetados por *D. immitis* apesar de estes valores serem sempre inferiores aos dos animais negativos (Tabela 4; Página 50). Relativamente à idade observou-se que os animais com idade superior a 2 anos apresentavam maior número de infetados por *D. immitis* e de coinfeção *D. immitis-Wolbachia* spp. (Figura 20; Página 44), no entanto, os níveis séricos dos anticorpos IgGs (IgG, IgG₁) eram mais elevados (sem diferenças significativas) em cães no grupo etário mais novo e infetado apenas por *D. immitis* (Figura 25; Página 48, Figura 32; Página 52). Na presença de coinfeção *D. immitis-Wolbachia* spp. a resposta humoral era mais intensa nos cães com idades entre 2,5 e 4 anos. Comparando com outros trabalhos (Montoya et al., 1998; Weng, 2008; Zimmerman et al., 2013) ao nível parasitológico é descrito um aumento da prevalência de cães infetados por *D. immitis* com o aumento da idade do animal e em consequência da exposição à picada do vetor; no entanto, ao analisarem a resposta imunológica, estes autores relacionam o aumento da idade com a diminuição da resposta humoral o que é verificado nos nossos resultados. De acordo com os autores citados, este facto parece resultar do estabelecimento de uma resposta efetora mediada por anticorpos IgG e IgG₁. Quando à resposta na coinfeção com a bactéria não se encontraram trabalhos disponíveis para comparar com os nossos resultados.

Foram observadas, também, diferenças em relação ao género dos animais analisados tendo os machos apresentado maior prevalência de infeção por *D. immitis* e *D. immitis-Wolbachia* spp.; no entanto, analisando níveis séricos das IgGs verificou-se que estes eram superiores nas fêmeas quando na presença de coinfeção. Segundo

Montoya et al., 1998 a maior prevalência em machos é expectável pois estes são normalmente utilizados como cães de guarda, sendo esta avaliação apenas parasitológica e não existindo uma análise da resposta imunológica que corroborem os nossos resultados. A nível parasitológico os resultados do presente estudo encontram-se em concordância com os autores referidos. O aumento dos anticorpos IgGs na presença de coinfeção observado no nosso estudo pode ser devido ao maior número de fêmeas com microfilarémia moderada.

A proteína C-Reativa (*CRP*) é uma proteína presente no plasma e produzida no fígado. Encontra-se agrupada no grupo de proteínas de fase aguda (*APPs*) incluídas no sistema imunológico inato e que constituem uma das primeiras linhas de defesa do organismo contra infeções agudas ou crónicas, doenças inflamatórias, lesões nos tecidos, etc. A *CRP* é umas das *APPs* ‘positivas’ aumentando rapidamente a sua concentração no sangue em resposta a estímulos inflamatórios produzidos pelo aumento de algumas citocinas no plasma (ex. Interleucina-6 (*IL-6*) e factor de necrose tumoral alfa (*TNF- α*)) e diminuindo para níveis normais em média 1 a 2 semanas depois, contrariamente as *APPs* ‘negativas’ que diminuem a sua concentração no sangue após a presença de uma perturbação do equilíbrio homeostático do indivíduo (Paul et al., 2011; Méndez et al., 2014; Venco et al., 2014). O aumento rápido (4-6 horas) dos níveis de *CRP* após estímulo inflamatório e posterior diminuição dos níveis no sangue do indivíduo tornam esta proteína um biomarcador eficaz (com elevada sensibilidade e baixa especificidade) para a deteção de várias doenças (Paul et al., 2011; Venco et al., 2014).

Para um cão saudável a concentração média da *CRP* no sangue deve ser inferior a 5 $\mu\text{g/ml}$ (segundo alguns autores), não sendo este valor afetado pela idade ou sexo do animal (Paul et al., 2011). No nosso estudo o valor da concentração de *CRP* mínima obtida foi de 10,34 $\mu\text{g/ml}$, verificando-se que os níveis de *CRP* no sangue nos cães analisados encontravam-se aumentados independentemente da idade, sexo e existência de infeção. Foi observado um aumento da concentração de *CRP* nos animais do sexo feminino (Figura 35; Página 55), o que poderá ser explicado por possível gravidez de algumas das fêmeas analisadas (níveis de *CRP* no sangue aumentam durante a 1ª fase de gravidez em animais saudáveis, única altura em que existem diferenças entre a concentração de *CRP* no sangue e o sexo do animal) (Paul et al., 2011). Ainda foi

possível observar que na presença de coinfeção *D. immitis-Wolbachia* spp. os animais apresentavam uma concentração de *CRP* significativamente superior (Mann-Whitney, $P < 0,05$) à dos cães apenas infetados por *D. immitis* (Figura 35; Página 54). O aumento da concentração de *CRP* na presença da bactéria *Wolbachia* spp. pode ser explicado pela resposta inflamatória estimulada pela bactéria com o aumento de citocinas pró-inflamatórias características de uma resposta celular Th1 (Marcos-Atxutegi et al., 2003; Venco et al., 2014). Não foram encontrados estudos onde se possa estabelecer uma comparação com os nossos resultados sobre o comportamento da *CRP* na presença de coinfeção *D. immitis-Wolbachia* spp. não sendo possível corroborar ou excluir esta associação como fator causal.

Verificou-se ainda que a concentração de *CRP* acompanhava o grau de microfilarémia, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas (coeficiente de Spearman $r_s = 0,032$ $P > 0,05$). Os resultados do presente estudo estão em concordância com outros trabalhos publicados (Méndez et al., 2014; Venco et al., 2014) onde os autores descrevem existirem diferenças nos níveis de *CRP* entre animais microfilarémicos e amicrofilarémicos.

Considerando que a *CRP* é uma proteína de fase aguda de resposta inespecífica o aumento da sua concentração pode dever-se à presença de infeções ou inflamações concomitantes (Méndez et al., 2014) o que poderá justificar o aumento dos níveis de *CRP* em animais sem a infeção por *D. immitis* e/ou *Wolbachia* spp. Com efeito, as amostras utilizadas neste estudo provieram de animais presentes em canis e associações onde a história clínica do animal era desconhecida e em vários casos apresentavam outras infeções (ex. Leishmaniose). Em relação à patologia, o aumento da concentração de *CRP* no sangue está associado a hipertensão e lesões nas artérias, existindo uma marcada diferença na concentração da proteína (até 5 vezes o valor referência) entre animais com manifestações clínicas como hipertensão pulmonar e sem estas manifestações (Venco et al., 2014). No nosso estudo não foram utilizadas técnicas imagiológicas, no entanto, no momento da colheita os animais amostrados foram sujeitos a anamnese onde foi feita auscultação para deteção de sopro no coração. Apesar de poucos animais apresentarem alterações cardíacas, não foram encontradas diferenças

entre concentração de *CRP* e a existência de sopro independentemente do estado parasitológico dos animais.

Como referido anteriormente a metodologia molecular é a mais aplicada na detecção da bactéria *Wolbachia* spp., no entanto, estes métodos acarretam altos custos e necessitam de material específico para a sua execução. De acordo com os nossos resultados e outros estudos (Venco et al., 2014) a *CRP* pareceu ser um bom biomarcador para a detecção da bactéria e poderá ser usado no rastreio inicial para a detecção de *Wolbachia* spp. previamente à confirmação pela técnica de PCR. A sua aplicação em exames complementares pelo método enzimático poderá tornar a detecção da bactéria mais fácil de executar e de menor custo do que a técnica de PCR, permitindo uma resposta mais rápida o que será útil para o Médico Veterinário na abordagem terapêutica da dirofilariose.

Para complementar os resultados obtidos no nosso estudo deverá ser realizado um estudo semelhante com a utilização de antígenos de *Wolbachia* spp. (ex. *WSP*). Além disso, através de técnicas imunológicas, como o método de immunoblotting poderá efetuar-se uma melhor caracterização de polipéptidos reativos para uma avaliação mais completa do perfil da resposta imunoinflamatória.

6. Referências bibliográficas

- Alho, A.M., Belo, S., Meireles, J., Carvalho, M.M. De, 2012a. Dirofilariose Canina e Felina , uma Parasitose em Evolução (I) – Etiologia , Biologia e Epidemiologia. *Clínica Animal*. 25, 20–25.
- Alho, A.M., Belo, S., Meireles, J., Carvalho, M.M. De, 2012b. Dirofilariose Canina e Felina , uma Parasitose em Evolução (II) – Fisiopatologia , Diagnóstico e Terapêutica. *Clínica Animal*. 25, 26–32.
- Alho, A.M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Gonçalves, L., de Carvalho, L.M., Belo, S., 2014. Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Veterinary Parasitology*. 206, 99–105.
- American Heartworm Society (AHS), 2014. Current Canine Guidelines For the Prevention, Diagnosis , and Management Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs. [Online] Disponível em: <https://heartwormsociety.org/images/pdf/2014-AHS-Canine-Guidelines.pdf>
- Anderson, R. C., 2000. *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission. International Journal for Parasitology* (2nd ed., Vol. 30, pp. 1–655). Wallingford, Oxon (UK): CABI.
- Araújo, A. M., 1996. Canine and human *Dirofilaria immitis* infections in Portugal. A review. *Parassitologia*, 38(366)
- Bandi, C., Anderson, T.J.C., Genchi, C., Blaxter, M.L., 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society*. 265, 2407–2413.
- Bandi, C., Trees, A.J., Brattig, N.W., 2001. *Wolbachia* in filarial nematodes : evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary Parasitology*. 98, 215–238.
- Banfield. (2011). Heartworm Disease. *Banfield*, 7(2), 1-24.
- Baptista-Fernandes, T., Rodrigues, M., Domingues, D., Monteiro, L., Paixão, P., Pereira, P., Tavares, R., Rodrigues, P., Maurício, I., Belo, S., Toscano, C., 2015. Dirofilariasis by *Dirofilaria repens*: an imported case and a brief review. *Parasitology International*. 64, 261–263.
- Bazzocchi, C., Ceciliani, F., McCall, J.W., Ricci, I., Genchi, C., Bandi, C., 2000. Antigenic role of the endosymbionts of filarial nematodes: IgG response against the *Wolbachia* surface protein in cats infected with *Dirofilaria immitis*. *Proceedings of the Royal Society*. 267, 2511–2516.
- Bazzocchi, C., Genchi, C., Paltrinieri, S., Lecchi, C., Mortarino, M., Bandi, C., 2003. Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria immitis*: the *Wolbachia* surface protein activates canine neutrophils with production of IL-8. *Veterinary Parasitology*. 117, 73–83.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Biochemistry. In: Biochemistry. W. H. Freeman and Company.
- Bowman, D.D., Atkins, C.E., 2009. Heartworm biology, treatment, and control. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 39, 1127–1158.
- Cardoso, L., Mendão, C., Madeira de Carvalho, L., 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors*. 5(62), 1-9
- Casiraghi, M., Bain, O., Guerrero, R., Martin, C., Pocacqua, V., Gardner, S.L., Franceschi, A., Bandi, C., 2004. Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *International Journal for Parasitology*. 34, 191–203.
- Casiraghi, M., Bazzocchi, C., Mortarino, M., Ottina, E., Genchi, C., 2006. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Veterinary Parasitology*. 141, 368–372.
- Ciocan, R., Dărăbuș, G., Jacsó, O., Fok, É., 2010. Detection of *Dirofilaria* spp . in Dogs by PCR. *Veterinary Medicine*. 67(2), 2003–2007.
- Day, M.J., 2007. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Veterinary Parasitology*. 147, 2–8.
- Dingman, P., Levy, J.K., Kramer, L.H., Johnson, C.M., Lappin, M.R., Greiner, E.C., Courtney, C.H., Tucker, S.J., Morchon, R., 2010. Association of *Wolbachia* with heartworm disease in cats and dogs. *Veterinary Parasitology*. 170, 50–60.
- Ferreira, C.A.C., de Pinho Mixão, V., Novo, M.T.L.M., Calado, M.M.P., Gonçalves, L.A.P., Belo, S.M.D., de Almeida, A.P.G., 2015. First molecular identification of mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in continental Portugal. *Parasites & Vectors*. 8 (139), 1-11.
- Ferri, E., Bain, O., Barbuto, M., Martin, C., Lo, N., Uni, S., Landmann, F., Bacceti, S.G., Guerrero, R., de Souza Lima, S., Bandi, C., Wanji, S., Diagne, M., Casiraghi, M., 2011. New insights into the evolution of *Wolbachia* infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. *PLoS One*. 6(6), 1-17
- Foster, J. M., Kumar, S., Ford, L., Johnston, K. L., Ben, R., Graeff-Teixeira, C., & Taylor, M. J., 2008. Absence of *Wolbachia* endobacteria in the non-filariid nematodes *Angiostrongylus cantonensis* and *A. costaricensis*. *Parasites & Vectors*. 1(31), 1-5
- Furtado, A.P., Melo, F.T. V, Giese, E.G., dos Santos, J.N., 2010. Morphological redescription of *Dirofilaria immitis*. *Journal of Parasitology*. 96(3), 499–504.

- Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M., Cringoli, G., 2005. Is heartworm disease really spreading in Europe? *Veterinary Parasitology*. 133, 137–148.
- Genchi, C., Vesco, L., Genchi, M., 2007. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp. 137–144.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G., 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*. 163, 286–292.
- Genchi, C., Kramer, L.H., Sassera, D., Bandi, C., Animale, P., Publica, S., Animale, S., 2012. *Wolbachia* and Its Implications for the Immunopathology of Filariasis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. 12, 53–56.
- Genchi, C., Genchi, M., Petry, G., Kruedewagen, E. M., & Schaper, R., 2013. Evaluation of the Efficacy of Imidacloprid 10 % / Moxidectin 2.5 % (Advocate®, Advantage® Multi, Bayer) for the Prevention of *Dirofilaria repens* Infection in Dogs. *Parasitology Research*. 112, 81–89.
- Giangaspero, A., Marangi, M., Latrofa, M.S., Martinelli, D., Traversa, D., Otranto, D., Genchi, C., 2013. Evidences of increasing risk of dirofilarioses in southern Italy. *Parasitology Research*. 112, 1357–1361.
- Giannelli, A., Ramos, R.A.N., Traversa, D., Brianti, E., Annoscia, G., Bastelli, F., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2013. Treatment of *Dirofilaria repens* microfilariaemia with a combination of doxycycline hyclate and ivermectin. *Veterinary Parasitology*. 197, 702–704.
- Goodwin, J., 1998. The Serologic Diagnosis of Heartworm Infection in Dogs and Cats. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 13, 83–87.
- Grandi, G., Zivcinkjak, T., Beck, R., 2007. Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. infections. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp. 60–66.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies-a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hellmann, K., Heine, J., Braun, G., Paran-Dobesova, R., Svobodova, V., 2011. Evaluation of the therapeutic and preventive efficacy of 2.5 % moxidectin / 10 % imidacloprid (Advocate®), Bayer animal health) in dogs naturally infected or at risk of natural infection by *Dirofilaria repens*. *Parasitology Research*. 109, 77–86.
- Joseph, E., Matthai, A., Abraham, L.K., Thomas, S., 2011. Subcutaneous human dirofilariasis. *Journal of Parasitic Diseases*. 35(2), 140–143.

- Kramer, L.H., Tamarozzi, F., Morchón, R., López-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Martín-Pacho, R., Simón, F., 2005. Immune response to and tissue localization of the *Wolbachia* surface protein (WSP) in dogs with natural heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 106, 303–308.
- Landum, M., Ferreira, C. C., Calado, M., Alho, A. M., Maurício, I. L., Meireles, J. S., Carvalho, L. M., Cunha, C., Belo, S., 2014. Detection of *Wolbachia* in *Dirofilaria* infected dogs in Portugal. *Veterinary Parasitology*. 204(3-4), 407–410.
- Lee, A.C.Y., Montgomery, S.P., Theis, J.H., Blagburn, B.L., Eberhard, M.L., 2010. Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm disease. *Trends in Parasitology*. 26(4), 168–173.
- Leite, L.C., Cirio, S.M., Antonio, M., Luz, E., Leite, S.C., Lunelli, D., 2006. *Dirofilariose* canina: revisão de uma zoonose emergente Canine *Dirofilariosis*: a Revision about an Emerging Zoonosis. *Revisão Acadêmica, Curitiba*. 4(4), 49–56.
- Luigi, V., Valenti, V., Bertazzolo, W., Genchi, M., Grandi, G., 2011. A Mini-Invasive Procedure for Removal of Adult *Dirofilaria Repens* From Subcutaneous Nodules in Dogs. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 9(2), 217–223.
- Maia, C., Lorentz, S., Cardoso, L., Otranto, D., Naucke, T. J., 2016. Detection of *Dirofilaria repens* microfilariae in a dog from Portugal. *Parasitology Research*. 115, 441-443.
- Manfredi, M.T., Cerbo, A.D., Genchi, M., 2007. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp. 40–45.
- Marcos-Atxutegi, C., Kramer, L., Fernandez, I., Simoncini, L., Genchi, M., Prieto, G., Simón, F., 2003. Th1 response in BALB/c mice immunized with *Dirofilaria immitis* soluble antigens: a possible role for *Wolbachia*? *Veterinar Parasitology*. 112, 117–130.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Advances in Parasitology*. 66, 193–285.
- Meireles, J., Paulos, F., Serrão, I., 2014. Canine and feline dirofilariosis. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 109(591-592), 70–78.
- Méndez, J.C., Carretón, E., Martínez, S., Tvarijonaviciute, a, Cerón, J.J., Montoya-Alonso, J. a, 2014. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*. 204, 420–425.
- Montoya, J.A., Morales, M., Ferrer, O., Molina, J.M., Corbera, J.A., 1998. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria , Canary Islands , Spain (1994 – 1996). *Veterinary Parasitology*. 75, 221–226.

- Morchón, R., Ferreira, a C., Martín-Pacho, J.R., Montoya, a, Mortarino, M., Genchi, C., Simón, F., 2004. Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Veterinary Parasitology*. 125, 313–321.
- Morchón, R., López-Belmonte, J., Bazzocchi, C., Grandi, G., Kramer, L., Simón, F., 2007. 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*. 115, 184–188.
- Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J., Mellado-Hernández, I., 2012. Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe - New Distribution Trends. *Frontiers in Physiology*. 3(196), 1-11.
- Muro, A., Genchi, C., Cordero, M., Simón, F., 1999. Human Dirofilariasis in the European Union. *Parasitology Today*. 15(9), 386–389
- Nakagaki, K., Nogami, S., Hayashi, Y., Hammerberg, B., Tanaka, H., Ohishi, I., 1993. *Dirofilaria immitis*: detection os parasite-specific antigen by monoclonal antibodies in glomerulonephritis in infected dogs. *Parasitology Research*. 79, 49–54.
- Nelson, C.T., 2008. *Dirofilaria immitis* in Cats : Diagnosis and Management. *Animal Medical Centers of Northeast Alabama*. 393–400.
- O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M. E., Karr, T. L., Robertson, H. M., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbiont associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89, 2699-2702.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Breitschwerdt, E.B., 2009. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology*. 25, 157–163.
- Otranto, D., Dantas-torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petri, D., Genchi, C., Capelli, G., 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*. 6(16), 1–14.
- Paul, C., Hansson, L.-O., Seierstad, S.L., Kriz, K., 2011. *Canine C-Reactive Protein - A Clinical Guide*. Lund, Suécia.
- Reifur, L., Thomaz-Soccol, V., Montiani-Ferreira, F., 2001. Aspectos Biológicos que influênciam na existência e na propagação de dirofilarioses. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR*. 4(1), 65–70.
- Rishniw, M., Barr, S.C., Simpson, K.W., Frongillo, M.F., Franz, M., Dominguez Alpizar, J.L., 2006. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*. 135, 303–314.

- Rossi, M. I. D., Aguiar-Alves, F., Santos, S., Paiva, J., Bendas, A., Fernandes, O., & Labarthe, N., 2010. Detection of *Wolbachia* DNA in blood from dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *Experimental Parasitology*. 126(2), 270–272.
- Silva, R.C. Da, Langoni, H., 2009. *Dirofilariose: zoonose emergente negligenciada*. *Ciência Rural*. 39, 1615–1624.
- Simón, F., Genchi, C., Prieto, G., Allende E., 2001. Immunity in the vertebrate hosts. In: Simón, F., Genchi, C. (Eds.), *Heartworm Infection in Humans and Animals*. Universidad de Salamanca, Spain, pp. 81–101.
- Simón, F., Kramer, L.H., Román, a., Blasini, W., Morchón, R., Marcos-Atxutegi, C., Grandi, G., Genchi, C., 2007. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary Research Communications*. 31, 161–171.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*. 25(3), 507–544.
- Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Saccoa, B. Di, Damianid, G., Genchi, C., 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 74, 223–227.
- Song, K., Hayasaki, M., Choliq, C., Cho, K., Han, H., Jeong, B., Jeon, M.-H., Park, Ba.-K., Kim, D.-H., 2002. Immunological Responses of Dogs Experimentally Infected with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Science*. 3(2), 109–114.
- Tarello, W., 2011. Clinical Aspects of Dermatitis Associated with *Dirofilaria repens* in Pets: A Review of 100 Canine and 31 Feline Cases (1990-2010) and a Report of a New Clinic Case Imported from Italy to Dubai. *Journal of Parasitology Research*. 2011, 1–8.
- Taylor, M.J., Hoerauf, A., 1999. *Wolbachia* Bacteria of Filarial Nematodes. *Parasitology Today*. 15(11), 437–442.
- Taylor, M.J., 2002. *Wolbachia* Endosymbiotic Bacteria of Filarial Nematodes. A New Insight into Disease Pathogenesis and Control. *Archives of Medical Research*. 33, 422–424.
- Taylor, M.J., Bandi, C., Hoerauf, A., 2005. *Wolbachia* Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. *Advances in parasitology*. 60, 245–284.
- Tezuka, H., Imai, S., Hidano, S., Tsukidate, S., Fujita, K., 2003. Various Types of *Dirofilaria immitis* Polyproteins Selectively Induce a Th2-Type Immune Response. *Infection and Immunity*. 71(7), 3802–3811.
- Torgerson, P.R., Macpherson, C.N.L., 2011. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Veterinary Parasitology*. 182, 79–95.

- Venco, L., 2007. *Dirofilaria (Nochiella) repens* infection in dog and cats. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore.pp. 133–136.
- Venco, L., Bertazzolo, W., Giordano, G., Paltrinieri, S., 2014. Evaluation of C-reactive protein as a clinical biomarker in naturally heartworm-infected dogs: a field study. *Veterinary Parasitology*. 206, 48–54.
- Vezzani, D., Carbajo, A.E., 2006. Spatial and temporal transmission risk of *Dirofilaria immitis* in Argentina. *International Journal of Parasitology*. 36, 1463–1472.
- Weng, N., 2008. Aging of the Immune System: How Much Can the Adaptive Immunity. 24(5), 495–499.
- Werren, J.H., 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*. 42, 587–609.
- Zimmerman, L.M., Clairardin, S.G., Paitz, R.T., Hicke, J.W., LaMagdeleine, K. a, Vogel, L. a, Bowden, R.M., 2013. Humoral immune responses are maintained with age in a long-lived ectotherm, the red-eared slider turtle. *The Journal of Experimental Biology*. 216(4), 633–640.