

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CLÍNICA
E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA

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

TESIS DOCTORAL
Doctorado Europeo

ESTUDIO DE BIOMARCADORES
DE DAÑO CARDIOPULMONAR
EN LA DIROFILARIOSIS CANINA
POR *DIROFILARIA IMMITIS*

Doctoranda

Elena Carretón Gómez

Arucas, 1 de Abril de 2013



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

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

INFORMA:

Que D^a. **Elena Carretón Gómez**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado, bajo mi dirección y asesoramiento, el presente trabajo de tesis doctoral titulado: “**Estudio de biomarcadores de daño cardiopulmonar en la dirofilariosis canina por *Dirofilaria immitis***” que considero reúne las condiciones y calidad científica necesarias, para su presentación y defensa, para optar al título de Doctora Europea por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Lo que firmo, a los efectos oportunos, en Arucas (Las Palmas) a dieciocho de marzo de dos mil y trece

J. Alberto Montoya Alonso
Catedrático de Medicina y Cirugía Animal

Fernando Simón Martín, Doctor en Biología y Catedrático de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca,

INFORMA:

Que D^a. **Elena Carretón Gómez**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado, bajo mi codirección y asesoramiento, la presente Tesis Doctoral titulada: “**Estudio de biomarcadores de daño cardiopulmonar en la dirofilariosis canina por *Dirofilaria immitis***”, que a mi juicio reúne las condiciones y calidad científica necesarias para su presentación y defensa, para optar al título de Doctora Europea por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Lo que firmo, para que surta los efectos a que haya lugar, en Salamanca a dieciocho de marzo de dos mil y trece,



Fdo.: Prof. Fernando Simón Martín
Universidad de Salamanca



Oggetto: Doctoranda Elena Carretón Gómez

Tesis Doctoral “Estudio de biomarcadores de daño cardiopulmonar en la dirofilariosis canina por *Dirofilaria immitis*”

Programa de Doctorado en Clínica e Investigación Terapéutica

Dichiaro di avere preso visione della tesi in oggetto in tutte le sue parti e di avere steso il seguente giudizio sulla base del lavoro di ricerca svolto dalla dottoranda e sulle mie conoscenze dell'argomento in qualità di esperto della filariosi cardipolmonare del cane.

Milano 11 aprile 2013

Claudio Genchi, DMV, Dipl. EVPC

Ordinario di Malattie Parassitarie

Presidente del Comitato di Direzione della Facoltà di Medicina Veterinaria

Università degli Studi di Milano



La tesi ha una parte di introduzione sulla tassonomia, biologia e ruolo dell'endosimbionte *Wolbachia*, epidemiologia, patogenesi, clinica e diagnosi della filariosi cardiopolmonare del cane. Inoltre due capitoli sono dedicati alla profilassi e alla terapia della infezione.

L'analisi è completa e ben fatta, ricca di spunti critici che dimostrano la profonda conoscenza da parte della dottoranda dell'argomento trattato non solo dal punto di vista bibliografico, ma anche scaturita dall'esperienza diretta che la candidata ha avuto modo di formarsi sui vari aspetti clinico-patologici della malattia nel corso della sua attività di ricerca presso il Departamento de Patología animal, Producción animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos della Facoltà di Medicina Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria.

La seconda parte della tesi riguarda nello specifico l'attività di ricerca della dottoranda relativa allo studio di biomarcatori del danno cardiaco in corso di filariosi cardiopolmonare del cane. Anche in questo caso, una parte introduttiva è dedicata alla storia dei biomarcatori cardiaci e la loro applicazione a fine diagnostico sia in ambito di medicina umana, sia di medicina veterinaria.

Il lavoro di ricerca della dottoranda riguarda in particolare tre marcatori: le troponine cardiache (T e I), la mioglobina e il dimero-D.

Anche in questo caso il significato di questi marcatori è ben illustrato, denota una completa conoscenza dell'argomento da parte della dottoranda che ne espone con chiarezza il significato prognostico e diagnostico, i limiti e i vantaggi.

I risultati riguardanti i marcatori cardiaci sono illustrati in quattro lavori scientifici su *Veterinary Parasitology*, pubblicazione ad elevato IF e di riferimento per i ricercatori che si interessino dei vari aspetti che riguardano, tra l'altro, la patogenesi e la diagnosi delle malattie parassitarie, e una in corso di stampa sullo stesso



giornale [Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs].

La candidata, dopo avere dimostrato la possibilità di impiegare la troponina I e la mioglobina quali marcatori del danno cardiaco e il dimero-D quale indicatore per la diagnosi di tromboembolismo in corso di filariosi cardiopolmonare del cane [Vet Parasitol, 2011 176: 313-316], conferma i suoi dati in uno studio immunoistochimico che conferma che l'aumento dei livelli di mioglobina e troponina I quali indicatori del danno cardiaco [Vet Parasitol 2012 189: 390-393]. Nel prosieguo della sua attività di ricerca la candidata prende in esame il dimero-D dimostrandone la presenza, sempre su base istochimica, in cani infestati sperimentalmente e con infestazioni naturali da *D. immitis*. I risultati dimostrano che i depositi del dimero risultano associati con il tromboembolismo e la presenza di microfilarie nel circolo ematico, oltre all'aumento del dimero a livello plasmatico. Se ne conclude che il monitoraggio del dimero possa essere un utile indicatore di tromboembolismo polmonare e che le microfilarie siano causa di microtrombosi a livello renale, contribuendo al danno renale in corso di infestazione [Vet Parasitol 2013 191: 182-186]. Il dimero-D risulta inoltre un utile indicatore per la valutazione e il monitoraggio del tromboembolismo polmonare nel corso della terapia adulticida [Vet Parasitol, 2013, in stampa]. Una ultima pubblicazione riguarda la valutazione della troponina I, mioglobina, l'isoenzima MB della creatin chinasi e dell'aspartato amino transferasi in cani infestati da *D. immitis* e trattati con ivermectina, melarsomina sodica e doxyciclina. All'inizio dello studio, i cani con elevata carica parassitaria presentano un aumento di troponina e tali si mantengono nel corso dello studio. La candidata conclude che la valutazione dei biomarcatori cardiaci appare di aiuto nel corso della terapia adulticida.



Tutti gli studi sono condotti in modo corretto, i metodi ben illustrati e congrui a dimostrare l'ipotesi sperimentale, i risultati e le conclusioni chiari e convincenti e dimostrano uno sviluppo dell'iter scientifico della candidata congruente e ben delineato.

L'attività di ricerca della candidata è inoltre documentata da 13 pubblicazioni, tutte su riviste con *reviewers* e IF e numerose comunicazioni a congressi internazionali.

In conclusione, la tesi e il curriculum della candidata denotano ottima propensione alla ricerca, impegno, autonomia e coerenza nella attività scientifica, profonda conoscenza dell'argomento specifico trattato nella tesi oltre, più in generale, della patologie del cane e dei relativi metodi di indagine.

Il mio giudizio sulla candidata e sulla tesi, sulla sua organizzazione e presentazione non può che essere del tutto positivo.

Claudio Genchi

PARECER

Ana Cristina Silvestre Ferreira, Professor Auxiliar, do Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, no que respeita à tese de doutoramento intitulada “*Estudio de biomarcadores de daño cardiopulmunar en la dirofilariosis canina por *Dirofilaria immitis**” apresentada pela doutoranda **Elena Carretón Gomez** e após a sua leitura cuidada tenho a declarar para os devidos efeitos, que a considero apta para a sua defesa pública.

A tese está bem apresentada com uma organização correta e apoiada numa bibliografia vasta e atual. É constituída por cinco artigos publicados numa revista científica da especialidade com um bom índice de impacto, o que atesta a qualidade do trabalho científico desenvolvido pela candidata, bem como o seu reconhecimento pela comunidade científica.

O uso de biomarcadores para o reconhecimento do estado de doença é hoje em dia um campo de trabalho para médicos, veterinários e investigadores e a dirofilariose canina uma doença emergente pelo que, o tema desta tese, para além de bastante atual, abre a possibilidade de novas e interessantes linhas de investigação.

Vila Real, 8 de Abril de 2013

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Ana Cristina Silvestre Ferreira', is written over a circular blue stamp. The stamp contains the text 'DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS' and 'VILA REAL'.

Ana Cristina Silvestre Ferreira

A Alberto, quien me ha hecho descubrir la magia de la investigación, me ha inspirado y me ha motivado durante estos geniales cuatro años. ¡Gracias jefe!

Ilustraciones de la portada cedidas por Carlos Montoya Alonso

“Yeah, Mr. White! Yeah, science!”
(Jesse Pinkman, Breaking Bad)

“Back off, man. I am a scientist”.
(Dr. Peter Venkman, Ghostbusters)

Esta tesis ha sido parcialmente financiada por la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información a través del Programa de Formación de Personal Investigador, y por los proyectos de investigación C20080100093 y SA090/A09.

Agradecimientos

¿Con qué sueñan las filarias?

Cuando me preguntan cómo acabé haciendo una tesis, yo siempre cuento la misma historia. Cuando terminé la carrera dije “no pienso volver a pisar esta facultad en lo que me queda de vida”. Me había costado mucho esfuerzo terminar la carrera, estaba hasta las narices y lo decía en serio.

Por hablar, apenas un año después me surgió la oportunidad de pedir una beca. No estaba nada convencida, pero, total, NO ME LA IBAN A DAR. Pues me la dieron. Así que cuando empecé esta aventura yo no sabía dónde me estaba metiendo, ¿una tesis, yo? ¿de qué? ¿¿de *filarias*?? Ah, bueno, pero si es con Montoya, entonces sí... Y así empezó; y antes de darme cuenta de lo que ha pasado, ya han terminado estos cuatro años. ¡Así de rápido se me ha pasado el tiempo!

Es una gran verdad eso de que la felicidad consiste en querer lo que uno hace, y durante estos cuatro años he descubierto una profesión que me tiene enamorada, y ningún día me ha costado levantarme de la cama para venir a currar, ni jamás me ha importado trabajar los fines de semana. Esos gusanillos blanquecinos, alargados que protestan cuando los obligas a salir del perro, esos bichejos desconocidos me han ido fascinando y conquistando con el paso del tiempo; ¡qué cosa tan asombrosa!

Pero todo este panorama que pinto así, tan bonito y feliz, jamás hubiera sido real si no es gracias a la gente que me ha rodeado y acompañado durante todo este tiempo. Cuando vives lejos de tu casa y de tu familia, los amigos y la gente que te rodea se convierten en tu nueva familia, y yo no podría haber sido más afortunada.

Por eso, me ha costado mucho ponerme a escribir los agradecimientos de esta tesis: no sé si voy a ser capaz de expresar el profundo y sincero agradecimiento que siento hacia tantísima gente, pero vamos allá.

Primero, a El Jefe, así, en mayúsculas, porque gracias a él esta tesis es lo que es, y discúlpeme la poca modestia y la bilbainada: ¡una pedazo de tesis!. Por su fe en mí al

empezar este trabajo, cuando yo no sabía ni lo que estaba haciendo, su inmenso cariño, confianza y amistad, por luchar por mí. ¡¡Gracias boss!! A “la jefa”, a Cande, que ha sido más que una jefa; una amiga, una madre. Qué grandes momentos hemos pasado en las prácticas persiguiendo a las vacas, gracias por la perseverancia en intentar convertirme en una chica guapa; poco a poco lo vamos logrando. A ambos, gracias por cuidarme, por preocuparse por mí, ¡por todo! No hay palabras. Igualmente, muchas gracias a Fernando, co-director de esta tesis, por su cariño, su paciencia, sus palabras de ánimo, su disposición y por hacerme sentir como en casa cuando estuve en Salamanca.

Gracias a mis amigos y compañeros veterinarios, aquellos con quienes compartí tantas horas de clase y biblioteca. A Javier y Miriam, ellos no lo saben, pero son los primeros culpables de yo esté ahora aquí. Todo se remonta al examen de Cría y “*el mejor correo recibido del año*” (qué gran e-mail). Ambos son grandísimas personas, generosas hasta el infinito, increíblemente humildes y jamás podré agradecerles lo suficiente su gran amistad. A Giada, generosa hasta decir basta, siempre preocupada por los demás, y con aventuras locas que sólo le pueden pasar a ella. A María y Fede, los aventureros. Gracias Meri por aconsejarme y escucharme en los momentos difíciles. A Sonia y Gustavo, gracias por vuestro cariño; A Sonia la quiero con locura desde el día que una extraña se le acercó, con toda su jeta, a pedirle los apuntes de bioquímica y dijo que sí; a Gustavo, por esa risa tan contagiosa cuando se ríe de mis chistes malos (y mira que son malos!). A Delia, porque aunque nos veamos poco sigue siendo una inspiración en mi vida, una de mis mejores amigas y no veo el momento de que nos tomemos esas cervezas que tenemos pendientes. Igualmente a Elvira, Olivia, Natacha, Ana, May, Nuria, Alexis “cardiocompi”... seguro que me dejo a alguien y luego me daré de cabezazos cuando tenga el libro impreso (lo tendré que añadir en un post-it): muchas gracias por estar ahí, por las fiestas veterinarias, por recibirme con un abrazo cada vez que nos vemos. A Yeray, Aldara por todo lo que aprendí con vosotros, y a Ofelia, mi amatu canaria, por escucharme y aconsejarme en esos momentos tan puñeteros que atravesaba cuando trabajábamos juntas.

A todos ellos, ¡¡¡muchísimas gracias!!! por vuestra eterna paciencia conmigo, por aguantaros la risa cuando digo “esta semana os llamo”, o “la próxima semana os voy a visitar”. Gracias por perdonarme por el tiempo que no os dedico; no podía haber conocido mejores personas, no podría tener mejores amigos ni podría sentirme más afortunada.

La Facultad de Veterinaria se ha convertido en mi casa durante estos años; aquí he pasado más tiempo que en ningún otro sitio con largas e interminables jornadas de trabajo. Que disfrutara de ello, yo que juré por dios que jamás volvería a pasar por aquí, se lo debo a gran parte de la gente que aquí trabaja:

A los de la cafetería, que me ha cuidado como una madre: primero Moneiba y Maite, quienes me reñían cuando me alimentaba mal y me obligaban a comer sano (se comía lo que ellas decían, y atrévete a sugerir lo contrario); luego Loli, Nuhacet y Carlos, quienes cocinan de maravilla (sello “*amatxu approved*”) y da igual lo cansados que estén, que a diario te reciben con una sonrisa y un café cortado bien cargado.

A la gente de la conserjería, por su amabilidad y por todos (muchos) los favores que me han hecho; igualmente a Carmelo, que se le echa de menos. A Antonio Mejías, único en la facultad y quien, con sólo mirarte la cara, sabe tu nombre completo, DNI, fecha de nacimiento, teléfono, dirección, grupo sanguíneo y nombre de tus padres. A Mari Carmen y Guillermo, por ayudarme, por informarme, por los favores y por perdonarme los despistes. A Gloria, por su cariño, por recibirme siempre con tanta alegría y por la compañía a la hora de comer cuando casi es la hora de merendar. A Rosi, Fátima y Gloria, por tener siempre mi sitio limpito; Mauro, Araña, Nemesio... en especial las risotadas de Dulce, por acompañarme los fines de semana. Sonia, que mimaba el jardín de la facultad y siempre tenía un rato para preguntar qué tal estaba.

Del Departamento, a Nuria y Ricardo, por su infinita paciencia (yo y mis papeles; mis papeles y yo) y por recibirme siempre con una sonrisa; especialmente a Ricardo, por su gran cariño, por llamarme guapa y por preocuparse cuando mi trabajo estuvo en peligro. A los profesores, junto a los que jamás dejé de sentirme una estudiante pero siempre me trataron con todo el respeto y cariño: Eligia, Inma, Mayte, Oscar, Juan Alberto, Carlos, ¡¡muchas gracias!! Ahora voy chuleando de que me codeo con los profes.

Las chicas de parasitología (sí, ya sé que algún chico también hay por ahí) por su amistad y buen compañerismo, por echar una mano cuando hizo falta y estar siempre dispuestas a ceder cualquier tipo de material. Por el curro que se pegaron cuando quisieron echarnos. Cuando quiera armar una revolución, ya sé a quién llamar. Su laboratorio siempre me pareció el camarote de los hermanos Marx: nunca faltaba la comida, gente entrando y saliendo continuamente, y pasándoselo bien. A Adassa, Leire, Davinia, Julia, Irene ¡gracias!

En Anatomía, muchas gracias a Diego y a Alberto por echarme una mano y prestarme material e instalaciones cuando lo he necesitado.

A toda la gente del Hospital Clínico Veterinario, ¡gracias a todos ellos! A los becarios, a Juanmi y Oliver, a Luigi por esos recibimientos tan efusivos, a Pitti, a Manola, a Paco, a Antonio por ayudarme siempre que lo he necesitado, a Tere por su sonrisa y cariño (¡qué grande!), a Débora porque sólo ella puede contestar una llamada, abrir una ficha a un cliente, cobrar una consulta, todo a la vez y aún preguntarme “dime ¿qué necesitas?”.

Mis compañeros de despacho, la pandilla de becarios, sin ellos esto no hubiera sido lo mismo. Noé, cuya compañía echo mucho de menos, con esos altibajos que hemos pasado juntos, esos fines de semana hablando y trabajando. Ojalá le vaya bien en esa nueva aventura que le ha llevado tan lejos de su querida isla. A Luca y Jorgi, por aguantarme (porque hay que aguantarme) y por su paciencia y por los buenos ratos.

Aquí donde me ven, yo fui una becaria con becaria. Clarita, que fue alumna de colaboración durante un curso, era una superbecaria. Juntas hacíamos un equipo imparable; qué gran investigadora hubiera sido. Auténtica domadora de gatos, y protestona cuando tenía que trabajar en el laboratorio. Ella ya sabe, que siempre que la veo se lo digo: “¡¡Si yo lo hubiera llegado a saber..!!”. Ahora tenemos de becario a Cristian, un tío brillante, listo, despierto y siempre dispuesto a currar. ¡Y encima le gusta la investigación! Afortunado va a ser el equipo con el que acabe trabajando.

A Sara y Tara, Tara y Sara, el dúo inseparable. Juntas hacen sinergia y arrasan allá por donde pasan. Fueron ellas solas a un congreso en Murcia y no solo se trajeron un premio, sino que casi se traen el congreso entero. No dejan títere con cabeza y pasé con ellas muy buenos ratos en nuestros viajes a Santa Lucía. Siempre que han podido se han ofrecido a echar una mano y siempre de buen humor. Sea lo que sea que hagan cuando terminen la carrera, sé que van a triunfar.

Además, gracias a todos los estudiantes que se ofrecieron voluntarios para acompañarme en los viajes a las perreras y albergues. Liados con las clases, las prácticas, los trabajos, los exámenes, y aún sacaban tiempo e interés para venir conmigo. Y, en general, a todos esos estudiantes de veterinaria, siempre dispuestos a currar, a ayudar, siempre con ganas de aprender. Indulgentes con mis fallos, con ellos descubrí el placer de enseñar lo poquito que sé. ¡Me dicen que yo acabaría diciendo ésto hace unos años, y anda que no me hubiera reído!

A todos los voluntarios y la gente que trabaja en los albergues animales, perreras municipales y protectoras, así como compañeros veterinarios que han ayudado de una manera u otra durante el desarrollo de esta tesis: Sin ellos, esta tesis jamás hubiera sido posible.

Muchas gracias a Lydia (Adopta un amigo en Gran Canaria), eterna optimista y siempre riendo a carcajadas, incluso cuando la vida la ha estado machacando; nos debemos muchas cervezas mutuamente. A Andrea (Arycan), quién confió en mí para tratar sus animales y para dar una conferencia sin apenas conocerme. A Oliver, de la perrera de Mogán, currándoselo en su tiempo libre para convertir una perrera en la envidia de muchos albergues. A Iván, el “Cesar Millán” de Santa Lucía, un mago maximizando re-

cursos para que los perros estuvieran en las mejores condiciones con cuatro duros (iba a decir “con cuatro perras”, pero quedaba un poco raro). Especialmente quiero agradecer a Rubén y José Miguel, de Santa Brígida, toda su ayuda y amistad durante el tiempo que estuve yendo a la perrera municipal. Grandísimas personas que, sin pedir nada a cambio, y sin necesidad ninguna, siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en lo que hiciera falta. Y sobre todo, por el café después de acabar la tarea. Y el mejor regalo, “Cuarentaicinco”, una perrita con filarias de la que me enamoré (auténtico flechazo), que José Miguel me cuidó durante meses y que ahora corretea feliz y enamora a la gente allá por donde pasa. Así es ella, el perro nº 45 de mi tesis. ¡Muchísimas gracias a los dos!

A la gente del albergue insular; currantes incansables, en una perrera que parece un sumidero donde no paran de entrar perros y más perros abandonados. Muchas gracias por todos los favores, por hacerme un huequito de su tiempo cuando tienen tantísimas tareas, por recibirme con una sonrisa y por las cenas de Navidad. A Tere, Tito, Juani, Mario y, especialmente, a Natacha, por su amistad y su cariño.

Y no podía terminar sin dar las gracias a Gusi, esa veterinaria incansable, todoterreno, hiperactiva y tremendamente cariñosa. Sólo ella puede ser capaz de poner firmes a los cazadores de la isla para que cuiden a sus perros adecuadamente.

También quería agradecer a la gente del Colegio de Veterinarios de Las Palmas, por esos ratos tan buenos, por todo lo que he aprendido con ellos y por su paciencia conmigo. A Fran, Fátima, Tere, Estrella, Javi y Sole: ¡gracias! Sois la envidia de muchos colegios veterinarios.

Una de las mejores cosas de este trabajo ha sido conocer gente nueva, “colegas” de profesión lejos de las islas. Chiflados que también trabajan con esos parásitos espaguéticos y se nota que disfrutan de lo que hacen: en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca está el laboratorio de Parasitología; ahí trabajan Rodrigo, quien sólo abandonaría el laboratorio si fuera para irse de gira con los Celtas Cortos; una persona incansable e imparable, una máquina de investigar y un grandísimo amigo tanto para las risas como en los malos momentos ¡Feliz Navidad, Morchón!. Javi, tronchante con su humor corrosivo, el mejor gusto en Cultura Popular (Chiquito for president y por la beatificación de Estesó!), un tío inquieto que no le basta con ser investigador sino que también es músico, actor, y en breve socio co-fundador de la revista “*Parasitology Food*” (nos vamos a forrar, socio). Isabel “*winter is coming*”, quién con toda su paciencia me enseñó diferentes técnicas de laboratorio y diferentes bares de Salamanca; disfruté golpeando las placas de ELISA tanto como esas cervezas que nos tomamos juntas, y estoy deseando que volvamos a repetir (ambas actividades). Y finalmente y, de nuevo, a Fernando por su paciencia intentando mantener el orden en el laboratorio. Muchas

gracias a los cuatro por acogerme en Salamanca, por hacerme sentir como en casa, por las risas en el laboratorio, las cervezas y la fiesta. ¡Que me voy para allá!

De mis estancias en Italia, he aprendido mucho trabajando en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Parma. Muchísimas gracias a Laura, Chiara y Giulio (quien aguantó estoicamente la españolización de su nombre) por su paciencia, por su tiempo y por hacerme sentir como en casa durante los meses que estuve invadiendo su laboratorio, por los regalos tan cachondos de despedida (I miss my egg!). Especialmente a Laura, por su cariño, por la pasión que pone a todo lo que rodea su vida y la inspiración que ello despierta en los demás.

Mucho más lejos, hay gente extraordinaria trabajando e investigando las filarias; de todos ellos, quería dar las gracias al Dr Wieslaw Kozek, una persona de nombre impronunciable y con una vida apasionante que siempre me ha recibido con un cariño especial, y al Dr Jorgue Guerrero, por su afecto, y estar pendiente de mi cuando me fui sólo a Estados Unidos.

Un agradecimiento muy especial a Laín, del Hospital Molins de Barcelona, que desde el mismo día que nos conocimos me trató con todo su afecto, y descubrí una persona atenta, currante y humilde (como si ser una máquina de la cardiología fuera la cosa más normal del mundo), además de un gran amigo. Igualmente, de Portugal no me quiero olvidar de Ana Patricia y Ana Cristina, ambas divertidas, muy dulces y simpáticas.

Igualmente, gracias a la gente de Madrid que, por un motivo u otro, han pasado por la isla y he tenido la oportunidad de conocer: Lola, Alicia, Laura, Juan Carlos y Andrés. Por las risas que me echado, por los consejos, por haberme enseñado la palabra “farfaso”; ¡espero veros pronto de nuevo! El Four Sisters os espera.

¡Pero basta ya de tanto veterinario! La frikipanda es un grupo de amigos tan variopinto, heterogéneo y dispares entre sí, que sorprende lo bien que funciona. Un grupo de gente divertida e interesante, cuya compañía es un regalo tras largos días de duro trabajo. ¡Lo que nos hemos podido reír! A Diego, Dani, Dori, Juakín, Dan, Lencho, Sixto, Alexis, Esther, Fabián, Sebastián, y aquellos que ya no están. Como Científica Suprema de nuestra Sociedad Secreta del Mal, no podría estar más orgullosa de todos sus miembros, y no dudo que pronto dominaremos el mundo. Muchas gracias por vuestra amistad.

Igualmente, también quiero mencionar y agradecer a mis caseros, Pilar y Alberto, quienes me han tratado como si fuera de la familia desde que llegué a Santidad, ese pueblo tan raro donde todos me saludaban por la calle (hasta que descubrí que, en Santidad, todos se saludan por la calle). Gracias por la compañía porque nunca me he sentido sola,

por toda la ayuda, por la disposición siempre a echar una mano, por cuidarme la casa y el coche cuando yo no he estado, y por esas ensaladillas de escándalo.

Y finalmente, más para el norte, concretamente en la capital del mundo, muchas gracias a mis compañeros mascosanes, quienes me reciben con los brazos abiertos cada vez que voy a visitarles, como si nunca me hubiera marchado de la clínica. Especialmente, me emociona poder dar las gracias a mis amigos quienes, tras 15 años viviendo lejos, todavía comparten su vida conmigo, se preocupan por mí y me animan cuando voy cuesta arriba. Eskerrik asko!!!! Sois la leche.

Eva es mi amiga, mi mejor amiga, mi alma gemela, mi otro “yo”. Desde los 14 años, nuestra amistad ha superado el tiempo y el espacio. Lo que más echo de menos son nuestras tardes de zuritos, zuritos, zuritos y hablar, hablar y hablar. Tantas son las aventuras y las experiencias que hemos vivido juntas que casi podemos adivinar los pensamientos la una de la otra. Siempre me ha apoyado y aconsejado en todos los aspectos de la vida, y me ha consolado como nadie cuando lo he necesitado. Y al mismo tiempo que empecé esta beca, me hizo el mejor regalo del mundo que es Ekaitz. Muchas gracias por todo, AMIGA.

Y para acabar, gracias a mi familia, la mejor familia del mundo, quienes siempre me han apoyado en todas las decisiones que haya tomado, por descabelladas que les hayan llegado a parecer (¿Qué te quieres ir a dónde? ¿¿A Canarias??) y jamás me han juzgado cuando he metido la pata. A Dani, porque no podría haberme tocado un hermano mejor, más bueno ni más noble y máximo exponente del humor “Carretón”. El mundo sería un lugar mejor si hubiera muchos como él. A Edurne, cuñadaaaa, terremoto que es puro corazón y sobre todo por hacerme tía y regalarme ese sobrino tan lindo, Arkaitz, a quién voy a ir corriendo a conocer (bueno, si puedo elegir, volando y en avión, que soy de Bilbao pero de las afueras) y rigurosamente comer a besos en cuanto me libre de esta tesis. A Olga, mi hermanita pequeña, la Doctora Carretón I y el cerebro más privilegiado de la familia; gracias, porque estaba preocupada por la chapa que estoy soltando con los agradecimientos, hasta que miré los tuyos (jejeje, debe ser algo genético ésto); por ser tan buena persona y hermana, por los “ánimo!” cuando la cosa iba mal y los “qué guay!” cuando la cosa iba mejor; por compartir conmigo sus problemas cuando la vida era más difícil y por acogerme en su casa. A Amatxu, de quién heredé el espíritu peleón y tocapelotas; me consta que lo da todo por su familia hasta la extenuación. Y a Aita, por inspirarme con su espíritu trabajador, incansable, sereno y optimista.

Un último inciso: para C.W. Moeliker por su pato necrofilico y homosexual, quién demostró que la imaginación científica no tiene límites y cuyo artículo me inspira los días más pesimistas. Sí señor.

Muchísimas gracias a José que, aunque nuestros caminos ya no vayan juntos, gracias a su empeño empecé esta aventura y, de nuevo, al jefe porque gracias a él la he terminado. Cuatro años y muchas canas después, sin duda, volvería a empezar.

A aquellos que se vayan a leer este libro, espero que os guste porque he puesto en él todo mi cariño y mi tiempo. A aquellos que prefieran esperar a la película, estoy en negociaciones con Ridley Scott para hacer una trilogía a lo Alien.

¿Con qué sueñas las filarias? Está claro: sueñan con tener su propio corazón.

*“¿Perdedores?
Perdedor es el que no arriesga,
el que no ama,
el que no se equivoca,
el que no sueña...
Nosotros hemos ganado mucho”*

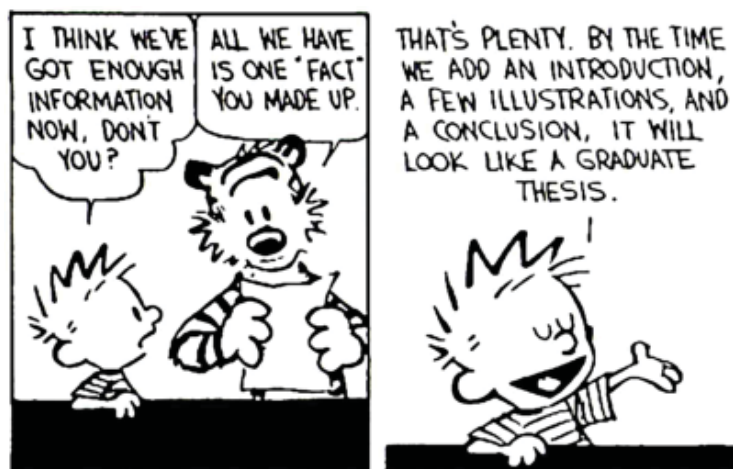
Arucas, 31 de Marzo de 2013

Índice

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
Dirofilariosis cardiopulmonar canina	11
1. Taxonomía	11
2. Ciclo biológico	11
3. <i>Wolbachia</i>	13
4. Epidemiología	14
5. Fisiopatología	15
6. Signos clínicos	20
7. Diagnóstico	20
8. Profilaxis	24
9. Tratamiento	26
Biomarcadores de daño cardiopulmonar	33
1. Historia de los biomarcadores	33
2. Troponinas cardíacas	35
2.1. Fisiología	36
2.2. Troponinas en medicina humana	38
2.3. Troponinas en pequeños animales	39
2.3.1. <i>Ensayos</i>	40
2.3.2. <i>Troponinas en diferentes patologías</i>	42
3. Mioglobina	51
3.1. Fisiología	51
3.2. Mioglobina en medicina humana	52
3.3. Mioglobina en pequeños animales	54
3.3.1. <i>Ensayos</i>	54
3.3.2. <i>Mioglobina en diferentes patologías</i>	54
4. Dímero-D	56
4.1. Fisiología	56
4.2. Dímero-D en medicina humana	57
4.3. Dímero-D en pequeños animales	59
4.3.1. <i>Ensayos</i>	60
4.3.2. <i>Dímero-D en alteraciones hemostáticas</i>	61

ARTÍCULOS	67
<i>Dirofilaria immitis</i> infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels	71
D-dimer deposits in lungs and kidneys suggest its use as a marker in the clinical workup of dogs with heartworm (<i>Dirofilaria immitis</i>) disease	75
Variation of d-dimer values as assessment of pulmonary thromboembolism during adulticide treatment of heartworm disease in dogs	81
Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (<i>Dirofilaria immitis</i>): immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs	87
Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of heartworm disease (<i>Dirofilaria immitis</i>) in dogs	91
CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS	107
RESUMEN/ SUMMARY	113
BIBLIOGRAFÍA	119
CURRICULUM VITAE	167

I INTRODUCCIÓN



Calvin and Hobbes, by Bill Watterson

*“Research is what I’m doing when I don’t
know what I’m doing.”*
(Wernher von Braun)

Introducción

La dirofilariosis cardiopulmonar es una enfermedad de carácter grave producida por el nematodo *Dirofilaria immitis* que, en su forma adulta, se localiza principalmente en las arterias pulmonares y en el ventrículo derecho de su hospedador, produciendo la dirofilariosis cardiopulmonar, un proceso también conocido como “enfermedad del gusano del corazón” o “heartworm disease”. La denominación de la enfermedad hace referencia a que, durante muchos años, los veterinarios observaban los parásitos en el corazón derecho durante el examen postmortem; sin embargo, los parásitos generalmente se encuentran en la arteria pulmonar y sólo pasan al ventrículo derecho en las fases más avanzadas de la enfermedad. Su curso es progresivo y potencialmente fatal, agravado por el hecho de que sus primeras fases son asintomáticas y cuando el animal infectado presenta sintomatología, esta suele ser característica de un cuadro avanzado de la enfermedad. En zonas endémicas, los veterinarios incluyen la dirofilariosis en el diagnóstico diferencial cuando se presenta un animal con sintomatología cardiorrespiratoria.

Esta parasitosis tiene distribución mundial, con amplia presencia en zonas templadas, subtropicales y tropicales, donde proliferan los mosquitos que actúan como vectores. Además, en los últimos años se ha constatado su expansión desde zonas endémicas a zonas previamente consideradas libres de la enfermedad. Esto probablemente se deba a una serie de factores, como son el cambio climático, la urbanización de nuevas áreas en las que se crea microclimas adecuados para el mantenimiento de los mosquitos transmisores, así como la formación de nuevas zonas de cultivo. Junto con el aumento del libre transporte y comercio de animales reservorios de la enfermedad y la introducción de nuevas especies de mosquitos potencialmente transmisores, la expansión de la enfermedad parece inevitable, por lo que el papel tanto del veterinario como del propietario en el control de esta enfermedad es sumamente importante.

El hombre también puede resultar infectado en las zonas donde la dirofilariosis es endémica en perros, desarrollando como signo característico un nódulo pulmonar, denominándose dirofilariosis pulmonar humana. Dichos nódulos son benignos y generalmente asintomáticos. No obstante, su descubrimiento provoca la sospecha de una causa maligna, induciendo al médico a intervenir quirúrgicamente.

El tratamiento de esta enfermedad consiste en eliminar todas las fases parasitarias del organismo del animal. Se trata de un procedimiento largo, agresivo y no exento de riesgo para la salud y la vida del animal, siendo un desafío para el veterinario en las formas más avanzadas de la enfermedad. Afortunadamente, el protocolo de tratamiento adulticida ha ido evolucionando desde hace años y el paso de la tiacetarsamida a la melarsomina ha mejorado exponencialmente el porcentaje de tratamientos llevado a cabo con éxito.

Debido a su gravedad y a la amenaza que supone para la vida de la mascota, su amplia distribución y su potencial zoonótico, resulta de gran interés profundizar en el estudio de la patología de esta enfermedad.

Los biomarcadores de daño cardiopulmonar llevan desarrollándose en la medicina humana desde los años 50, cuando se comenzó a emplear la determinación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) para diagnosticar infarto agudo de miocardio. A partir de entonces, se han conseguido grandes avances que han logrado, mediante el empleo de métodos no invasivos como la medición serológica de biomarcadores, diagnosticar con precisión y rapidez eventos cardiorrespiratorios, que permiten actuar con rapidez y mejorar, por lo tanto, la supervivencia y el pronóstico del paciente. La medicina veterinaria ha acogido con gran entusiasmo el estudio de estas determinaciones serológicas, y durante los últimos 15 años ha habido una avalancha de publicaciones valorando la utilidad de los diversos biomarcadores en diferentes patologías cardiopulmonares en pequeños animales con prometedores resultados, permitiendo confirmar el diagnóstico en casos dudosos, evaluar la gravedad de la enfermedad y monitorizar la evolución de la misma, entre otras posibilidades.

Por lo tanto, la determinación de estos biomarcadores nos ofrece la posibilidad de evaluar una patología que cursa con daño en el sistema cardiopulmonar, como es la dirofilariosis canina, de forma que permita valorar de forma más adecuada el estado del animal afectado. Así, podrían ofrecer información útil y complementaria al veterinario a la hora de emitir un pronóstico más preciso al propietario, así como a decidir el protocolo terapéutico adecuado a aplicar en cada caso. Además, podrían permitir valorar y monitorizar el curso del tratamiento, de forma que permitirían tomar medidas coadyuvantes si el veterinario lo considerara necesario.

Así, nació el objetivo de esta tesis doctoral, que es evaluar y valorar los biomarcadores de daño cardiopulmonar en la dirofilariosis canina.

II

OBJETIVOS



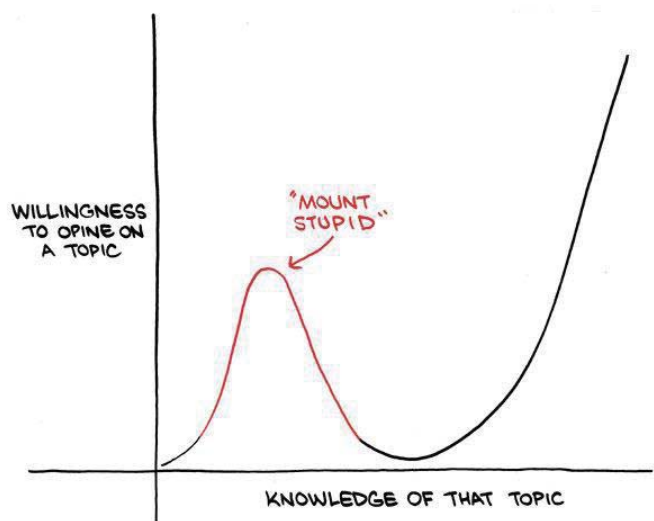
"As a scientist, you offer hope. Think about it"
(Thomas Zarek, Battlestar Galactica)

Objetivos

Atendiendo a las consideraciones expuestas en el apartado anterior, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Establecer los valores serológicos de los biomarcadores de daño cardiopulmonar, troponinas T e I cardíacas, mioglobina y dímero-D, y comprobar su utilidad en la evaluación del daño provocado por *Dirofilaria immitis* en el perro.
2. Determinar, mediante técnicas de inmunohistoquímica, la presencia de dímero-D en tejido pulmonar y renal de perros infectados por *D. immitis*, y correlacionarla con modificaciones serológicas de este biomarcador.
3. Estudiar las variaciones de dímero-D en perros infectados por *D. immitis*, durante el tratamiento adulticida con ivermectina, doxiciclina y melarsomina, siguiendo el protocolo terapéutico recomendado por la American Heartworm Society.
4. Evaluar, mediante técnicas de inmunohistoquímica, la pérdida intracelular de troponina I cardíaca y mioglobina en tejido miocárdico de perros infectados por *D. immitis*, correlacionando los cambios histológicos con las elevaciones serológicas de esos marcadores.
5. Valorar las variaciones de los biomarcadores troponina I cardíaca y mioglobina, en perros infectados por *D. immitis* durante el tratamiento adulticida con ivermectina, doxiciclina y melarsomina, siguiendo el protocolo terapéutico recomendado por la American Heartworm Society.

III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not ‘Eureka!’, but ‘That’s funny...’”
(Isaac Asimov)

Dirofilariosis cardiopulmonar canina

1. TAXONOMÍA

Dirofilaria immitis es un nematodo filarioideo de la familia Onchocercidae, y la subfamilia Dirofilarinae, que comprende los géneros *Dirofilaria* y *Loa* (Marquardt et al., 2000). Dentro del género *Dirofilaria*, se reconocen diversas especies entre las que destacan por su importancia clínica y su amplia distribución *D. immitis* y *D. repens*.

2. CICLO BIOLÓGICO

Dirofilaria immitis es un parásito filiforme, de color blanquecino y que presenta dimorfismo sexual. Los machos tienen un diámetro de 0.7-0.9 mm y una longitud de 12-20 cm; además, presentan el extremo posterior enrollado en forma de espiral. Las hembras poseen un diámetro de 1-1.3 mm y una longitud de 15-30 cm; son ovovivíparas; los huevos larvados eclosionan en el útero, eliminando en sangre periférica a las microfilarias o larvas de primer estadio (290-330 μ m de longitud y 7 μ m de diámetro) (McCall et al., 2008b).



Figura 1. Ciclo biológico de *Dirofilaria immitis*

Se trata de una enfermedad de ciclo indirecto por transmisión vectorial. Los hospedadores definitivos son cánidos y félidos, tanto domésticos como silvestres, quienes albergan las formas adultas del parásito. Los hospedadores intermedios son mosquitos que pertenecen a los géneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* y *Coquillettidia* (Cancrini y Kramer, 2001; Cancrini et al., 2006). El ser humano puede actuar como hospedador accidental del parásito por lo que esta enfermedad presenta un carácter zoonótico (Simón et al., 2001; 2005).

El mosquito se infecta cuando toma sangre de un perro con microfilarias circulantes. Una vez han sido ingeridas por el mosquito, las microfilarias migran desde el intestino a los tubos de Malpighi en 24-36 horas, donde se desarrollan hasta su estado infectivo (L3) (Taylor, 1960; Abraham, 1988; Cancrini y Kramer, 2001).

El tiempo necesario para que la larva se desarrolle en el mosquito depende de la temperatura ambiental. A 27°C y 80% de humedad relativa, el desarrollo de las L3 dura unos 10-14 días (Orihel, 1961; Slocombe et al., 1989). A temperaturas más bajas, el desarrollo es más lento y a temperaturas por debajo de 14°C detienen su desarrollo, pero se reanuda cuando los mosquitos se exponen a temperaturas más elevadas, incluso durante períodos cortos de tiempo (Cancrini et al., 1988; Wu et al., 1995).

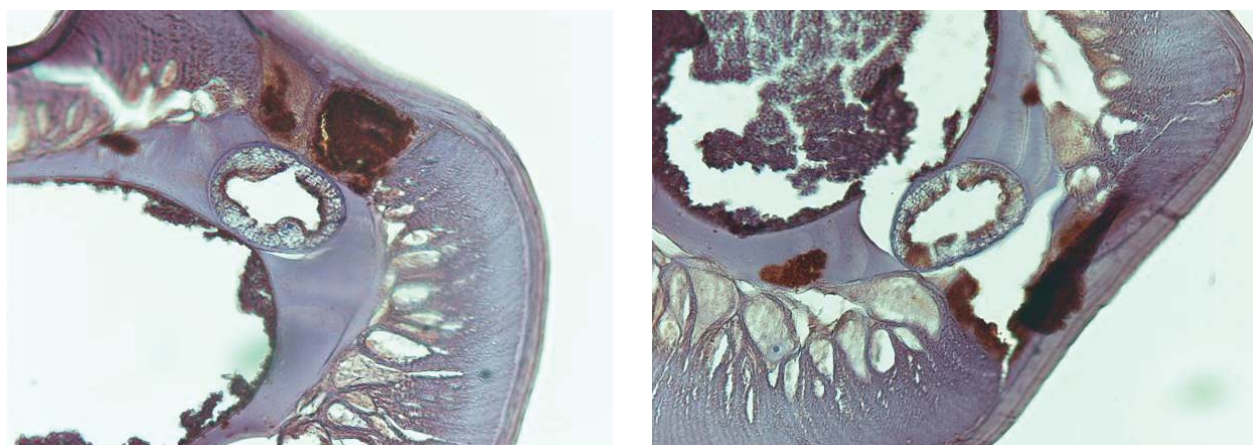
Las L3 infectantes migran hasta el espacio cefálico, llegando a las glándulas salivares y probóscide. Cuando el mosquito se alimenta, inocula las larvas infectantes en el hospedador definitivo (McGeevy et al., 1974). Éstas penetran en el tejido subcutáneo, donde mudan rápidamente a L4 (Kotani y Powers, 1982; Litchlenfels et al., 1985). En los tres días siguientes, las larvas L4 permanecen en el tejido subcutáneo, cerca del punto de penetración. Hacia el día 21, las larvas migran entre las fibras musculares y sobre el día 41 están presentes en el abdomen ó en el tórax. La muda de L4 a L5 (jóvenes

ESTADIO	DÍA	LOCALIZACIÓN
L3	Día 0 (Inoculación)	Subcutáneo
L4	Día 3-10	Musculatura
L4	Día 21	Musculatura (abdomen)
L4	Día 41	Musculatura (abdomen/tórax)
L5	Día 50-70	Penetración en yugular /otras venas
L5	Día 70-85	primeras larvas llegan a pulmón
Juvenil	Día 90-120	Todas en arterias pulmonares
Adulto	Día 120 (4º mes)	Art. pulmonares principales
Microfilaremia	Día 210-270 (7º-9º mes)	Sangre periférica

Tabla 1. Fases del desarrollo de *Dirofilaria immitis* en el perro.

pre-adultos, aun sexualmente inmaduros) ocurre entre los días 50 y 70. Las primeras L5 penetran en una vena sistémica y son transportadas por el torrente sanguíneo hasta las arterias pulmonares, en cuyas ramas terminales quedan fijadas ingresando, así, al sistema cardiopulmonar (Orihel, 1961; Kotani y Powers, 1982). La presión del flujo venoso las obliga a permanecer en las ramas terminales de las arterias pulmonares (Rawlings et al., 1978); en los pulmones maduran durante unos 3 meses más hasta alcanzar su estado de adultos (Kume e Itagaki, 1955; Hayasaki, 1996). Según crecen, van migrando hacia arterias mayores hasta que alcanzan la madurez completa, y se localizan en arterias pulmonares principales y arterias lobares. Los perros comienzan a presentar microfilaremia entre 6.5 y 9 meses post-infección (Orihel, 1961; Kotani y Powers 1982; Anderson, 2000). En el perro, las filarias adultas pueden vivir unos 5-7 años, y las microfilarias pueden sobrevivir hasta 2 años en el torrente circulatorio (Barriga, 1982; Quiroz-Romero, 1984; Abraham, 1988; McCall, 1998); el número de gusanos adultos albergados puede variar desde uno a más de 250.

Existe la transmisión transplacentaria, por lo que las microfilarias pueden pasar de la madre al feto y, por lo tanto, se pueden detectar microfilarias circulantes en los cachorros (Mantovani y Jackson, 1966; Atwell, 1981; Todd y Howland, 1983).



Figuras 2 y 3. Imagen tomada al microscopio (x40) de *Wolbachia* en un corte transversal de un parásito adulto de *D. immitis* donde se puede apreciar, mediante técnicas de inmunohistoquímica, su presencia en los cordones laterales.

3. WOLBACHIA

Dirofilaria immitis alberga una bacteria simbiote intracelular llamada *Wolbachia pipientis* (Sironi et al., 1995; Taylor et al., 2005a; Kozek et al., 2007). *Wolbachia* es una bacteria Gram negativa que pertenece al orden Rickettsiales. Estas bacterias se encuentran en todos los estadios del ciclo de vida del parásito. En filarias adultas, *Wolbachia* se encuentra predominantemente en las células de la hipodermis de las cuerdas laterales;

en las hembras, también está presente en los ovarios, oocitos y estados embrionarios en desarrollo dentro del útero (Bandi et al., 1999; Kramer et al., 2003; Kozek, 2005; Sacchi et al., 2002). Consecuentemente, la bacteria se transmite de forma vertical de generación en generación y está presente en todas las fases evolutivas del parásito.

La presencia de la bacteria es esencial para la supervivencia de las filarias y la eliminación de *Wolbachia* conduce a la esterilidad de las hembras, inhibición del desarrollo larvario y posteriormente a la muerte de los adultos por su intervención en la muda (Langworthy et al., 2000; Gilbert et al., 2005; Taylor et al., 2005b; Dingman et al., 2010).

Además, *Wolbachia* desempeña un importante papel en la patogénesis y respuesta inmune a la infección por dirofilariosis. Las bacterias son liberadas tras la muerte de los parásitos o durante las mudas de estados larvarios (Taylor et al., 2001); su liberación está asociada al incremento de citoquinas inflamatorias, aumento de neutrófilos y un incremento de inmunoglobulinas específicas (Kramer et al., 2008). La bacteria *Wolbachia* estimula, por tanto, una respuesta inflamatoria en el organismo del animal hospedador (Morchón et al., 2004; Simón et al., 2007) y es responsable en parte del cuadro clínico que presenta la enfermedad (McHaffie, 2012).

4. EPIDEMIOLOGÍA

La dirofilariosis es una enfermedad cosmopolita y de distribución mundial, que se localiza en zonas con elevada temperatura y humedad durante, al menos, una parte del año. Estas condiciones ambientales favorecen el desarrollo y mantenimiento de abundantes poblaciones de mosquitos vectores (Simón et al., 2012).

En Europa, las prevalencias más elevadas se sitúan principalmente en países de la cuenca mediterránea y del sur (Portugal, Francia, Italia, España), donde la enfermedad es endémica. Además, existen evidencias que demuestran que la dirofilariosis canina se está expandiendo a zonas previamente no endémicas del norte y noreste de Europa (Genchi et al., 2009; Morchón et al., 2012b).

España cuenta con unas condiciones óptimas para el desarrollo de *D.immitis*, y la mayor o menor prevalencia que presente cada zona depende principalmente de factores como las condiciones medioambientales y los hábitos de la población canina. En el territorio nacional, la dirofilariosis no ha sido estudiada en todas las provincias, pero se han hecho varios estudios epidemiológicos que han demostrado la presencia de dirofilariosis canina en varias regiones. Actualmente las prevalencias más elevadas se encuen-

tran en el sur de la Península Ibérica, y en zonas de regadío y cercanías de grandes ríos (como la ribera del Tormes en Salamanca o el delta del Ebro) (Montoya et al., 2007). No hay datos acerca de las prevalencias en el norte de la península ibérica, pero ya se ha demostrado la presencia de dirofilariosis canina en La Rioja (12%) y A Coruña (5%) (Simón et al., 2009; Morchón et al., 2010). En las islas Canarias, las prevalencias más elevadas se han observado en la isla de Gran Canaria, donde llegó a alcanzar el 67% en el año 1994, estando actualmente por debajo del 20%, gracias a la implementación de protocolos preventivos (Montoya et al., 1998; Montoya-Alonso et al., 2010; 2011).

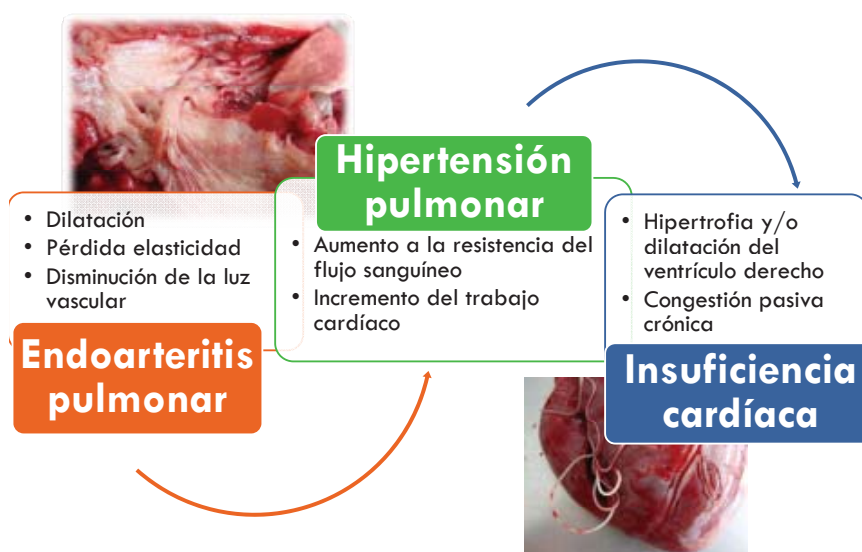


Figura 4. Mecanismos fisiopatológicos de la dirofilariosis canina.

5. FISIOPATOLOGÍA

5.1. Endoarteritis pulmonar proliferativa

La presencia de los parásitos adultos en contacto directo con los vasos provoca alteraciones en las arterias pulmonares, produciéndose un engrosamiento de la íntima vascular y un estrechamiento de la luz vascular, que se denominada endoarteritis pulmonar proliferativa (Furlanello et al., 1998). Esta proliferación es causada por una migración de células de músculo liso de la túnica media hacia la íntima (Munnell et al., 1980; Schaub et al., 1981), por lo que la pared de la arteria deja de ser lisa y blanca y desarrolla unas vellosidades, que dan a la superficie de la arteria pulmonar un aspecto rugoso y una tonalidad púrpura (Adcock, 1961; Rawlings, 1986).

Estos cambios comienzan a los pocos días de la llegada de las filarias a las arterias pulmonares y empiezan en las ramas periféricas de estas arterias, en las que se fijan inicialmente, y van avanzando hacia segmentos más proximales a medida que las filarias

van creciendo. Además, las arterias lesionadas pierden elasticidad, se vuelven tortuosas y sufren una dilatación, aumentando su diámetro. Sin embargo, la luz arterial disminuye debido al engrosamiento de la pared arterial, por lo que las arteriolas más estrechas se pueden ocluir por embolización (McCall et al., 2008b).

La gravedad de esta patología está influenciada por el número de parásitos adultos, la duración de la infección, la respuesta inmune del hospedador frente al parásito y por el nivel de actividad física del perro (Knight, 1987; Dillon et al., 1995).

5.2. Hipertensión pulmonar

Debido principalmente a la disminución de la luz vascular, pérdida de la elasticidad arterial, y a la formación de tromboembolismos pulmonares, se produce un incremento de la resistencia al flujo sanguíneo que conduce a un aumento de la presión en la arteria pulmonar, produciéndose hipertensión pulmonar (Rawlings et al., 1981; Olson et al., 1982; Hirano et al., 1992; Sasaki et al., 1992; Rohn et al., 1995; Venco y Vezzoni, 2001).

Normalmente, esta hipertensión suele ser moderada en la mayoría de los casos. Sin embargo, debido a la pérdida de elasticidad arterial, durante el ejercicio, cuando el flujo sanguíneo aumenta hasta el triple del basal, la presión en la arteria pulmonar podría triplicarse (Kittleson, 1998). Es probable que esto contribuya a los síntomas clínicos de intolerancia al ejercicio que se observan habitualmente en perros con dirofilariosis (Rawlings et al., 1978).

5.3. Insuficiencia cardíaca congestiva

La insuficiencia cardíaca congestiva derecha es frecuente en infecciones masivas y en animales sometidos a ejercicio físico. Se produce un aumento de la poscarga y, para mantener la alta presión de perfusión necesaria para mover la sangre a los pulmones debida a la hipertensión pulmonar, hay un incremento del trabajo cardíaco y, en un período aproximado de 9-10 meses, los efectos de la hipertensión pulmonar se compensan mediante la hipertrofia del ventrículo derecho y/o dilatación ventricular (Calvert et al., 1999; Wang et al., 2005). Según algunos autores, cerca del 50% de los perros con complicaciones vasculares pulmonares derivadas de la dirofilariosis desarrollan insuficiencia cardíaca (Calvert et al., 1999).

5.4. Alteración del parénquima pulmonar

La alteración del parénquima pulmonar y la tos resultante son frecuentes en animales con dirofilariosis clínica. Aunque no se encuentre en contacto directo con el parásito,

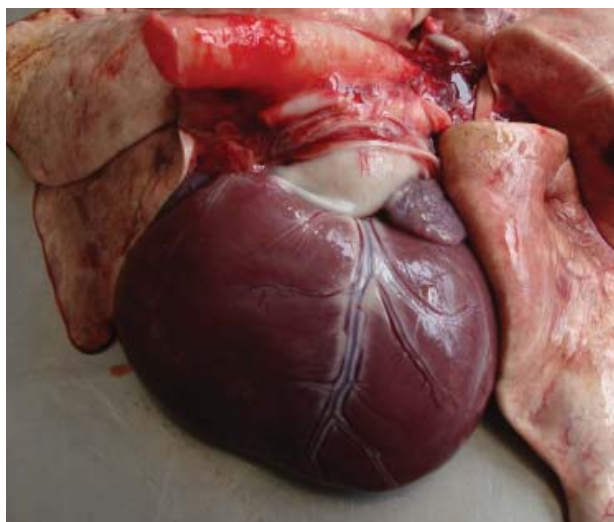


Figura 5. Dilatación de las cámaras cardíacas derechas en perro altamente parasitado por *D. immitis*.

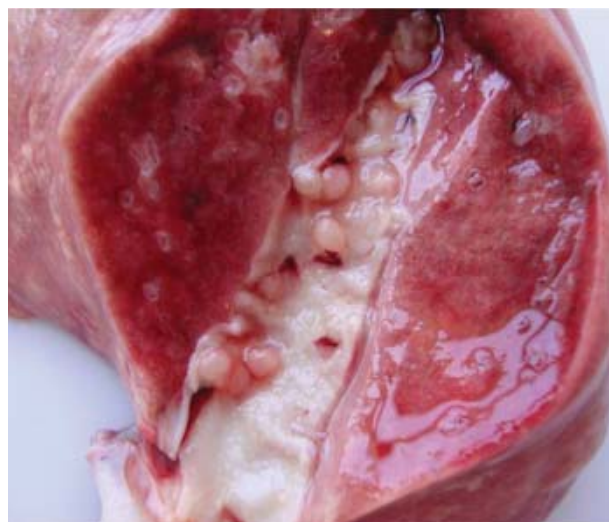


Figura 6. Endoarteritis pulmonar proliferativa en arteria pulmonar de perro con dirofilariosis crónica.



Figura 7. Radiografía torácica de un perro con dirofilariosis donde se aprecia cardiomegalia y dilatación de las arterias pulmonares.



Figura 8. Perro con dirofilariosis clase IV o síndrome de la vena cava, con presencia de ascitis y posición ortopneica.

el parénquima pulmonar sufre una respuesta inflamatoria local debida al depósito de antígenos del mismo. También se sospecha que la bacteria *Wolbachia* esté implicada en el proceso. Además, el daño a las arterias pulmonares hace que aumente la permeabilidad de los pequeños vasos al plasma y células inflamatorias, apareciendo edema e inflamación periarterial. Se forman infiltrados intersticiales y alveolares, compuestos en esencia de eosinófilos y neutrófilos, que resultan finalmente en una fibrosis irreversible (Rawlings, 1986). La fibrosis a su vez, contribuye a disminuir el área de intercambio gaseoso, aumentando la resistencia vascular pulmonar.

La neumonitis eosinofílica o alérgica, es un síndrome provocado principalmente por la hipersensibilización de los perros a los antígenos de microfilarias, que inducen su des-

trucción inmunomediada, produciendo un serio distrés respiratorio (Calvert y Losonsky, 1985). Las microfilarias son rápidamente capturadas e inmovilizadas en la microcirculación del pulmón, debido a un exceso de anticuerpos anti-microfilarias (IgG). Éstos adhieren los leucocitos a las microfilarias, causando su secuestro e inmovilización en la microcirculación del pulmón. Las microfilarias muertas son rodeadas por una inflamación eosinofílica granulomatosa, apreciable radiológicamente. Se considera que entre un 10 y un 15% de los perros con dirofilariosis oculta presenta neumonitis eosinofílica (Calvert et al., 1999).

5.5. Tromboembolismo pulmonar

El parásito vivo es resistente a la tromboembolización pero cuando muere, ya sea de forma espontánea o inducida por tratamientos adulticidas, se produce una trombosis masiva. Los vermes muertos son barridos distalmente hacia las arterias más finas y, como consecuencia, el flujo sanguíneo se deteriora, o incluso se interrumpe hacia los lóbulos caudales, que con frecuencia muestran consolidación, infarto y mínimo funcionamiento a nivel de intercambio gaseoso; esto puede provocar un desequilibrio entre ventilación y perfusión y desencadenarse una hipoxemia (McCall et al, 2008b).

Se produce una inflamación granulomatosa de la pared arterial que provoca un crecimiento exagerado de las vellosidades de la íntima vascular y un aumento de la permeabilidad, con la formación de edemas perivasculares. Los fragmentos del parásito son calcificados y parcialmente incorporados a la pared de la arteria, que posteriormente cicatrizan con formación de gran cantidad de tejido conectivo fibroso. Los trombos y la rigidez de estas arterias lesionadas, agravan la hipertensión pulmonar (Kittleson, 1998; Atkins, 2005).

5.6. Síndrome de la vena cava

El síndrome de la vena cava en perros se produce en animales con una alta carga parasitaria, con el 55-84% de los parásitos en las venas cavas craneal, caudal y aurícula derecha (Rawlings, 1986; Atkins, 1987; Atkins et al., 1988). El parásito en su estado adulto reside principalmente en las arterias pulmonares del hospedador definitivo, manteniéndose en estos vasos gracias a la circulación sanguínea. Pero cualquier incidente hemodinámico que tenga como consecuencia una hipoperfusión transitoria o mantenida de la arteria (como hipertensión pulmonar y disminución del gasto cardiaco), les hace caer a través de la válvula pulmonar en el ventrículo derecho (Kittleson, 1998). Así, los parásitos colonizan la aurícula derecha, vena cava caudal o venas hepáticas, produciendo insuficiencia cardiaca derecha y obstrucción del retorno sanguíneo elevando la presión venosa central (Strickland, 1998). La regurgitación de la tricúspide produce una

disminución del flujo de salida por la vasculatura pulmonar hacia el corazón izquierdo. Como resultado, hay una disminución del flujo sanguíneo sistémico dando síntomas de mala perfusión y shock cardiocirculatorio. Su pronóstico es generalmente desfavorable.

5.7. Alteraciones renales

La glomerulonefritis membranosa es frecuente en perros con dirofilariosis crónica. Esta glomerulopatía sucede porque se forman y depositan complejos autoinmunes contra antígenos del parásito en la membrana basal del glomérulo (Abramowsky et al., 1981; Grauer et al., 1988; 1989). Esta glomerulonefritis también se ha correlacionado con la presencia de microfilarias en los capilares glomerulares y vasos medulares, lo que provoca la presencia de infiltrados inflamatorios en glomérulos y un engrosamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares (Ludders et al., 1988; Paes-de-Almeida et al., 2003). Además, las microfilarias son una fuente importante de antígenos parasitarios, incluyendo *Wolbachia* y ésta, liberada desde las microfilarias muertas, produce inflamación y una respuesta inmune específica (McCall et al., 2008a; Morchón et al., 2012a).

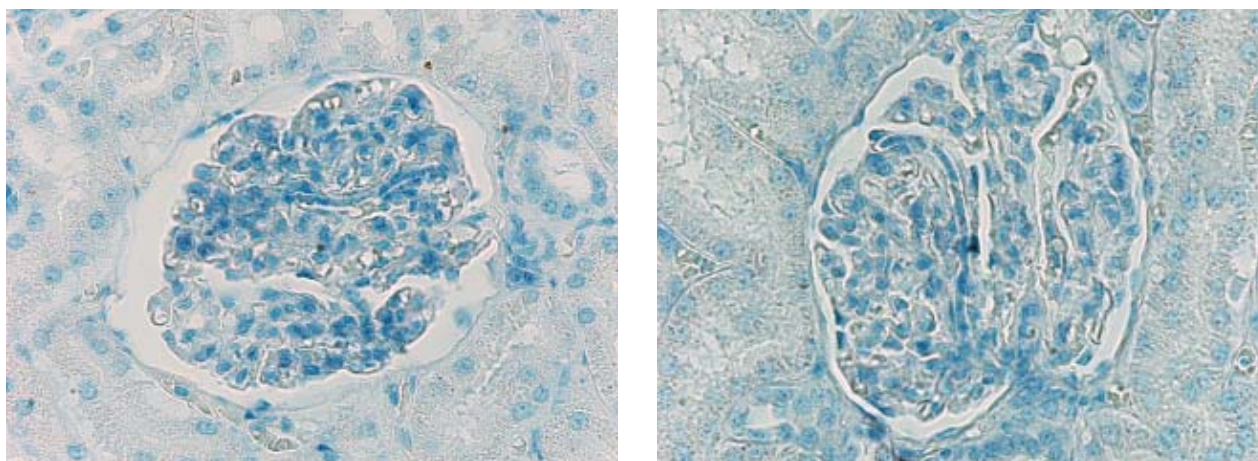


Figura 9 y 10. Imágenes tomada al microscopio de tejido renal (x40) en las que se aprecia la presencia de microfilarias de *D.immitis* en glomérulos renales de perros con dirofilariosis cardiopulmonar.

La glomerulonefritis puede dar paso a una nefrosis grave con proteinuria y, en algunos casos, puede llegar a provocar azotemia por insuficiencia renal. La concentración plasmática de antitrombina III también puede estar reducida, fomentando más aún la formación de trombos (Boudreaux y Dillon, 1991a). Otra alteración inmunopatológica que también puede desencadenarse a nivel renal es una nefritis intersticial, con infiltrado de células plasmáticas, leucocitos, polimorfonucleares y macrófagos en el intersticio medular y cortical.

5.8. Otras alteraciones

Aunque raras veces, se han descrito complicaciones derivadas de la presencia de filarias adultas en localizaciones aberrantes tan diversas como el cerebro, la cámara anterior del ojo, la cavidad peritoneal, el corazón izquierdo, arterias sistémicas, quistes y abscesos musculares y subcutáneos, los bronquios y el hígado (Liu et al., 1966; Patton y Garner, 1970; Mandelker y Brutus, 1971; Slonka et al., 1977; Weiner et al., 1980; Carastro et al., 1992; Henry, 1992; Frank et al., 1997; Sevimli et al., 2007).

6. SIGNOS CLÍNICOS

Durante los seis a siete meses desde que los parásitos son inoculados no se presenta ningún signo clínico, ya que las larvas mudan y migran sin causar ninguna alteración. La dirofilariosis clínica tarda en desarrollarse, por lo que la sintomatología se presenta en perros a partir de un año de edad y, generalmente, no se hacen evidentes hasta pasados varios años desde la infección (Kittleson, 1998; McCall et al., 2008b).

La tos no productiva y crónica, que se acentúa después del ejercicio, es el síntoma más habitual en perros levemente afectados o con enfermedad cardiopulmonar crónica, junto con disnea o taquipnea, intolerancia al ejercicio, pérdida de peso y síncope. Se pueden auscultar crepitaciones pulmonares difusas y soplo cardíaco sistólico, especialmente en casos de síndrome de la vena cava. Otros signos clínicos pueden ser: hemoptisis, epistaxis, letargia, apatía, hiporexia, ascitis y derrame pleural.

7. DIAGNOSTICO

Para el diagnóstico de la enfermedad es necesario realizar test de detección de antígenos y de microfilarias en sangre periférica, mientras que para establecer la gravedad de la enfermedad, son necesarias otras pruebas diagnósticas (Knight, 1995; American Heartworm Society, 2012).

7.1. Detección de antígenos

En el mercado hay disponibles kits de tests de detección de antígenos de *Dirofilaria immitis* por técnicas de ELISA o inmunocromatografía, que detectan proteínas secretadas principalmente por el tejido ovárico de parásitos adultos hembras de *Dirofilaria immitis*, aunque los tests de última generación también detectan proteínas comunes a parásitos hembras como machos (Grieve et al., 1981; Weil, 1987).

La especificidad es muy elevada en todos los tests disponibles y no existen reacciones cruzadas con otras filarias caninas (*D. repens*, *A. reconditum*, *A. dracunculoides*), por lo que los falsos positivos son muy poco frecuentes y suelen deberse a errores técnicos durante la realización del test (Goodwin, 1988; McCall et al., 2000).

La sensibilidad suele ser muy elevada; algunos factores pueden afectar la sensibilidad del test, como la edad del parásito y el tamaño del perro. Parásitos muy jóvenes y parásitos de edad avanzada presentan menor carga antigénica, mientras que la antigenemia que presente un perro de raza grande siempre va a ser menor que la que presente un perro de raza pequeña albergando el mismo número de parásitos. Los falsos negativos pueden suceder en infecciones con carga parasitaria muy ligera, en casos de filarias juveniles (menores de 6 meses de edad), infección sólo por filarias macho o fallos técnicos por no seguir las instrucciones correctamente (Tonelli, 1989; Goodwin, 1998; McCall, 1992; Courtney y Zeng, 2001a).



Figura 11. Radiografía de tórax ventrodorsal de un perro con dirofilariosis, donde se aprecia dilatación de las cámaras cardíacas derechas mostrando la característica forma de “D” invertida.

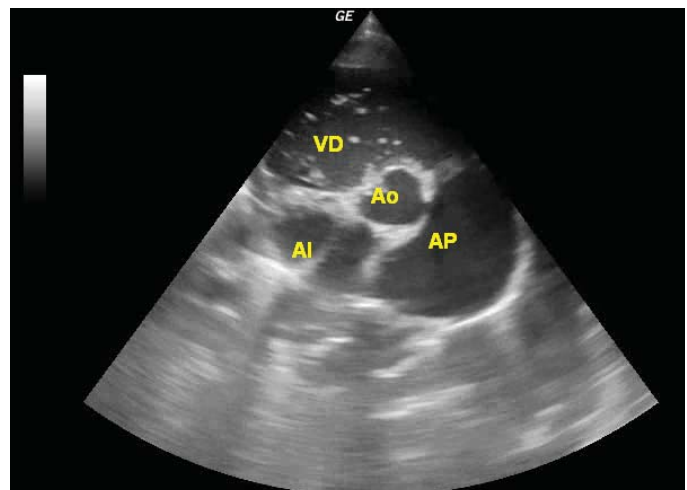


Figura 12. Ecocardiografía en corte parasternal derecho donde se observan las filarias en el ventrículo derecho (VD), y marcada dilatación de la arteria pulmonar (AP).

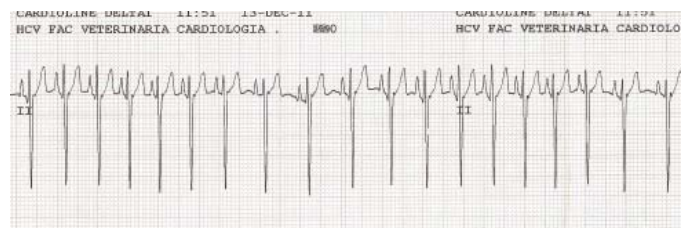


Figura 13. Electrocardiograma de perro con dirofilariosis, con bloqueo de rama derecha del Haz de His.

7.2. Detección de microfilarias

La detección de microfilarias en sangre se debe considerar como un método complementario, ya que incluso en áreas hiperendémicas, se calcula que alrededor de un 30% de los perros infectados son amicrofilarémicos; este porcentaje se eleva en poblaciones de perros que han recibido tratamiento preventivo a dosis intermitentes ([Rawlings et al., 1982](#)). Por otro lado, existen cuatro especies de filarias cuyas microfilarias podemos encontrar en sangre periférica, por lo que para poder confirmar el diagnóstico de dirofilariosis cardiopulmonar debemos identificar correctamente a las microfilarias.

Existen varios métodos para detectar microfilarias en sangre periférica ([Courtney, 1989](#); [Genchi et al., 2007](#)). La observación directa es un método sencillo, que consiste en examinar la muestra directamente al microscopio con el objetivo de x10 aumentos, o mediante la concentración en tubo de microhematocrito ([Altman, 1972](#); [Martini et al., 1996](#); [Courtney y Zeng, 2001b](#)).

Mediante el método de filtración, se permite concentrar y teñir las microfilarias, facilitando de esta manera su observación e identificación ([Acevedo et al., 1981](#)). El test de Knott modificado es bastante similar al método de filtración, y es el método de referencia empleado cuando se quiere cuantificar el número de microfilarias por mililitro de sangre ([Knott, 1939](#); [Jackson y Otto, 1975](#)).

El método histoquímico, permite identificar a la especie a la que pertenece la microfilaria mediante el estudio de la distribución somática de las zonas de actividad de fosfatasa ácida que estas microfilarias presentan. La positividad se observa de color rojizo en diferentes zonas de la microfilaria según sea la especie a la que pertenece ([Chalifoux y Hunt, 1971](#); [Peribáñez et al., 2001](#)).

7.3. Radiología

El examen radiográfico de tórax proporciona información insustituible sobre la localización y gravedad de las alteraciones vasculares y del parénquima pulmonar ([Losonsky et al., 1983](#); [Venco et al., 2003](#)). Los cambios que se observan son dilatación y mayor tortuosidad de las arterias pulmonares, y terminación de las mismas de forma brusca, por tromboembolismos que interrumpen el flujo a segmentos pulmonares ([Losonsky et al., 1983](#)). Las alteraciones del parénquima pulmonar pueden presentarse precozmente bajo la forma de respuesta inflamatoria a la presencia del parásito adulto y/o de las microfilarias, o más tardíamente como consecuencia de fenómenos tromboembólicos inducidos por la muerte de los parásitos. Se observan como zonas de densidad aumentada, adyacentes a las arterias afectadas y, según se agrava el cuadro, el aumento

de densidad puede generalizarse y afectar cualquier punto del campo pulmonar. La dilatación cardíaca derecha no es característica en casos leves y es posible que no exista o no sea evidente en casos de gravedad moderada (Losonsky et al., 1983); por lo general, se aprecia mejor en las proyecciones ventrodorsales, observándose una silueta cardíaca en forma de “D” mayúscula invertida.

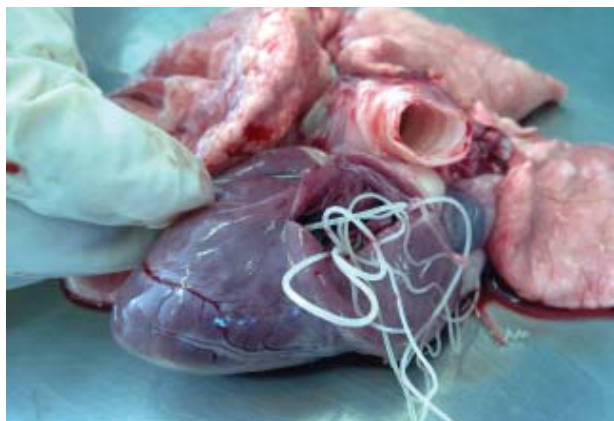


Figura 14. Filarias adultas en el ventrículo derecho de un perro infestado por *D. immitis*.

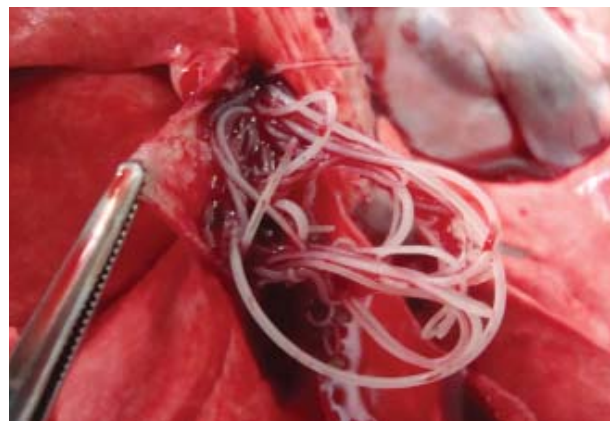


Figura 15. Filarias adultas en la arteria pulmonar de un perro con dirofilariosis.

7.4. Ecocardiografía

El examen ecocardiográfico permite la correcta valoración de las dimensiones de las cámaras cardíacas y de su cinética, de la velocidad, dirección y características del flujo en el interior de las cámaras cardíacas y de la parte inicial de los grandes vasos, así como la estimación aproximada del número y localización de las filarias y la valoración de la gravedad de la hipertensión pulmonar (Badertscher et al., 1988; Moise, 1988; Venco et al., 2003). Para diagnosticar una dirofilariosis, debe obtenerse una proyección paraesternal derecha de eje corto, que incluya el tracto de salida del ventrículo derecho, la válvula pulmonar, la arteria pulmonar principal y las porciones proximales de las arterias de los lóbulos caudales. La imagen ecocardiográfica del parásito adulto está representada por dos líneas paralelas hiperecógenas separadas por una línea hipoeecógena (Kittleson, 1998). La observación ecográfica de los parásitos es más fácil en infecciones masivas y en perros de pequeña talla, cuando las filarias adultas han ocupado la arteria pulmonar principal, ramas interlobares izquierda y derecha o dentro del ventrículo derecho.

7.5. Electrocardiografía

La electrocardiografía es útil para la detección de arritmias. Éstas son poco frecuentes en perros con dirofilariosis (2%-4%) (Lombard y Ackerman, 1984), excepto en los casos de síndrome de vena cava o insuficiencia cardíaca. Con frecuencia se observan ondas Q y S profundas y bloqueos de rama derecha.

7.6. Pruebas de laboratorio

En la mayoría de los perros con dirofilariosis el hemograma es normal, sin embargo alrededor de un 10% de los perros con dirofilariosis leve y un 60% con infestaciones graves presentan una moderada anemia normocítica normocrómica (Sharma y Pachauri, 1982; Calvert, 1987; Mass et al., 1992). Los perros con síndrome de la vena cava pueden presentar hemólisis (Buoro y Atwell, 1984).

La fórmula leucocitaria suele ser normal en perros asintomáticos (Rawlings, 1986). Es habitual encontrar linfopenia, neutrofilia o monocitosis. La eosinofilia está presente en el 85-95% de los perros; la basofilia junto con eosinofilia es un elemento sugestivo inespecíficos de la enfermedad, pero en el 50% de los casos hay eosinofilia sin basofilia (Rawlings et al., 1980; Confer et al., 1983).

El perfil de coagulación se altera significativamente en casos de tromboembolización grave, porque hay consumo activo de las plaquetas, fibrinógeno y otros substratos de la coagulación (Rawlings, 1982; Boudreaux y Dillon, 1991a).

En los casos más graves, puede haber presente elevación de las transaminasas hepáticas y azotemia renal. La disfunción glomerular provoca proteinuria e isostenuria en el 10% de los casos con signos clínicos. Los perros con síndrome de la vena cava pueden presentar una orina de color marrón por la presencia de bilirrubinuria y hemoglobinuria.

8. PROFILAXIS

8.1. Lactonas macrocíclicas

Se recomienda que los cachorros comiencen la profilaxis cuanto antes, y nunca más tarde de los 2 meses de edad (Atkins, 2011; American Heartworm Society, 2012). Los productos utilizados para prevenir la dirofilariosis son las lactonas macrocíclicas (moxidectina, ivermectina, selamectina y milbemicina oxima). Existen preparados comerciales de administración mensual vía oral y tópica, y también un preparado inyectable de administración anual (McTier et al., 1992).

Estos fármacos interrumpen el desarrollo de las larvas que han sido transmitidas por mosquitos al perro durante los 30-60 días anteriores a su administración. Las lactonas macrocíclicas poseen un ratio terapéutico/tóxico excelente y poseen actividad antihelmíntica contra las microfilarias, larvas en estadios L3 y L4, y en algunos casos

y durante su uso continuo, actúan sobre filarias pre-adultas (L5). Aunque esta característica proporciona una cierta seguridad en casos de omisión o retraso del tratamiento mensual, pasados dos meses su eficacia contra las formas larvarias desciende (McCall et al., 2001a). Además, las filarias juveniles L5, que pueden encontrarse desde los 50 días post-infección, son aún menos susceptibles a estos productos. Por lo tanto, se recomienda su administración mensual (McCall, 2005).

Las lactonas macrocíclicas presentan cierta eficacia frente a estados parasitarios de 3-8 meses post-infección cuando se administran mensualmente de forma continua (Rawlings, 2002; McCall, 2005). Este llamado “*reach back*” o efecto retroactivo es diferente para cada una de las lactonas macrocíclicas y han sido probados sólo en condiciones experimentales (McCall et al., 2008b).

Clase I	Anamnesis y exploración física normales
	Radiografía torácica, ecocardiografía y analítica normales
	Pronóstico favorable
Clase II	Ligera intolerancia al ejercicio y tos leve
	Radiografía torácica: ligero engrosamiento arteria pulmonar y aumento moderado del ventrículo derecho
	Ecocardiografía: presencia de filarias adultas
Clase III	Pronóstico reservado
	Intolerancia al ejercicio, tos persistente, disnea, anorexia, caquexia, soplo sistólico
	Radiografía torácica: aumento arterias pulmonares, dilatación del ventrículo derecho
	Ecocardiografía: filarias en arterias pulmonares y ventrículo derecho
Clase IV (Síndrome de la vena cava)	Pronóstico grave
	Síntomas anteriores junto con shock, letargia, ascitis, disnea, cianosis. Hemoglobinuria, hemoglobinemia
	Radiografía torácica: aumento arterias pulmonares, dilatación del ventrículo derecho y cava caudal
	Ecocardiografía: filarias en arterias pulmonares, ventrículo derecho, cava caudal y craneal
	Pronóstico desfavorable

Tabla 2. Clasificación clínica de la dirofilariosis canina

8.2. Falta de eficacia y resistencia parasitaria

Las lactonas macrocíclicas como preventivos de la dirofilariosis poseen una eficacia del 100%. Sin embargo, existen informes de falta de eficacia en varias regiones del mundo. La mayoría de los informes de falta de eficacia son debidos a problemas de interacción entre el veterinario y el cliente, o entre el cliente y su mascota. Es posible que un perro se infecte por olvido o retraso en la toma de una única dosis de preventivo, muy especialmente en zonas endémicas ([Atkins, 2011](#)).

Solamente una cepa de filarias ha demostrado poseer resistencia a las lactonas macrocíclicas ([Atkins, 2011](#); [Blagburn et al., 2011](#); [Snyder et al., 2011](#); [Bowman, 2012](#)). La cepa MP3 de *D. immitis* fue aislada en el año 2006 en un perro de Estados Unidos, que nunca recibió tratamiento preventivo. Desde entonces, esta cepa se mantiene de forma

Día	Tratamiento
Día 0	• Diagnóstico positivo • Comenzar la restricción de ejercicio • Si el perro es sintomático: estabilizar con tratamiento adecuado y administrar prednisona (0.5 mg/Kg BID 1ª semana, 0.5 mg/kg SID 2ª semana, 0.5 mg/kg cada 2 días durante la 3ª y 4ª semanas)
Día 1	• Administrar preventivo de dirofilariosis • Si hay presentes elevadas cantidades de microfilarias, pre-tratar con antihistamínicos y glucocorticoides si no está tomando prednisona para reducir el riesgo de anafilaxia • Animal bajo observación durante un periodo mínimo de 8 horas
Día 1-28	• Doxiciclina 10 mg/kg BID durante 4 semanas
Día 30	• Administrar preventivo de dirofilariosis
Día 60	• Administrar preventivo de dirofilariosis • Primera inyección de melarsomina 2.5 mg/kg IM • Si es necesario, repetir el protocolo de administración de prednisona • Restricción absoluta de ejercicio
Día 90	• Administrar preventivo de dirofilariosis • Segunda inyección de melarsomina 2.5 mg/kg IM
Día 91	• Tercera inyección de melarsomina 2.5 mg/kg IM • Si es necesario, repetir el protocolo de administración de prednisona • Restricción absoluta de ejercicio
Día 120	• Evaluar la presencia de microfilarias • Si es positivo, administrar 30 días de doxiciclina y repetir la prueba en 30 días
Día 271	• Test de antígenos a los 6 meses tras finalizar el tratamiento

Tabla 3. Protocolo de tratamiento adulticida ([American Heartworm Society, 2012](#)).

experimental en perros de laboratorio.

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

Es importante que se entienda que los parásitos no se vuelven resistentes, sino que el empleo de los fármacos preventivos selecciona los parásitos con resistencia genética. Esta resistencia se ha observado en otros parásitos, por ejemplo trichostrongiloides en pequeños rumiantes; sin embargo, las condiciones que favorecen estos procesos de selección (parásito de ciclo directo, tratamientos colectivos, falta de reservorios, elevadas cargas parasitarias y ciclo de vida corto) no se dan en la dirofilariosis (Bowman, 2012).

9. TRATAMIENTO

Se debe evaluar el estado clínico y cardiovascular del paciente mediante la historia clínica, examen físico, test de antígenos y radiografía torácica (Bowman y Atkins, 2009). Aún siendo un método poco refinado e inexacto para determinar la carga parasitaria, también debe tenerse en cuenta la reacción del test de antígenos, que puede dar información sobre el número de parásitos presentes en base a la reacción antigénica (Atwell et al., 1986; Rawlings et al., 1993). Se debe tener en cuenta que en casos crónicos puede observarse signos de enfermedad vascular muy avanzada en perros con una baja carga parasitaria. Igualmente, perros muy inactivos pueden presentarse asintomáticos y con mínimos cambios radiográficos teniendo una elevada carga parasitaria.

9.1. Clasificación del estado de gravedad

En función de la sintomatología, y por tanto de la gravedad de la enfermedad, la dirofilariosis se ha clasificado en cuatro clases o niveles de gravedad (Di Sacco y Vezzoni, 1992). Los hallazgos que caracterizan a cada grupo están resumidos en la tabla 2. Actualmente se prefiere una clasificación más simple, que clasifica los pacientes en dos categorías, basándose en el número de filarias estimado, el tamaño y edad del perro, la severidad de la enfermedad pulmonar y presencia de enfermedades concomitantes, así como la actividad física y la posibilidad de restricción del ejercicio durante el tratamiento adulticida (McCall et al., 2008b). Así, las categorías en que se clasifican los perros con dirofilariosis son:

1. *Bajo riesgo de complicaciones tromboembólicas.*

Lo comprenden animales con baja carga parasitaria y sin lesiones de la vasculatura o parénquima pulmonar. Los requisitos que el perro debe cumplir son:

- Asintomáticos
- Radiografías torácicas normales
- Bajo nivel de antígenos circulantes
- No se visualizan los parásitos en ecocardiografía
- Sin enfermedades concomitantes
- Posibilidad de restricción de ejercicio durante el tratamiento

2. *Riesgo elevado de complicaciones tromboembólicas.*

Se incluyen los perros que cumplan una o más de las siguientes condiciones:

- Síntomas relacionados con la enfermedad (tos, intolerancia al ejercicio, etc)
- Radiografías torácicas muestran anomalías compatibles con dirofilariosis
- Elevado nivel de antígenos circulantes
- Los parásitos se visualizan en la ecocardiografía
- Enfermedades concomitantes
- No existe posibilidad de restricción del ejercicio durante el tratamiento.

9.2. Eliminación de larvas migratorias

Previamente al tratamiento adulticida, se deben eliminar las larvas migratorias L3 y L4, ya que el fármaco adulticida (melarsomina diclorhidrato), no puede eliminar filarias menores de 4 meses de edad; por lo tanto, éstas deben de ser eliminadas primero administrando lactonas macrocíclicas a dosis preventivas durante 2 ó 3 meses previos al tratamiento adulticida. De esta manera, las larvas menores de 2 meses de edad son eliminadas mientras que las larvas mayores de 2 meses alcanzarán la edad suficiente para ser susceptibles a la melarsomina ([American Heartworm Society, 2012](#)). Un beneficio adicional de este protocolo es que, además, debilita a las filarias inmaduras y reduce la masa corporal de las hembras adultas al disminuir su capacidad reproductiva.

9.3. Eliminación de *Wolbachia*

La bacteria intracelular del género *Wolbachia* que alberga el parásito está también implicada en la patogénesis de la enfermedad, ya que induce una respuesta inflamatoria e inmune en los hospedadores. Por lo tanto, la muerte de las filarias durante el tratamiento adulticida implicaría una liberación masiva de *Wolbachia* en el organismo del perro con serias consecuencias para su salud ([Kramer et al., 2005](#)). El tratamiento con doxiciclina a dosis de 10mg/kg BID durante 4 semanas antes de la administración del adulticida elimina un 90% de la bacteria *Wolbachia* ([Bandi et al., 1999](#)), permanecien-

do en niveles bajos durante los 3 ó 4 meses posteriores a la administración del antibiótico. Al ser un organismo esencial para la supervivencia de la filaria, su eliminación provoca debilitamiento o disminución de la fertilidad. Por lo tanto, el perro previamente tratado con doxiciclina tendrá menor patología pulmonar asociada a la muerte de las filarias cuando se administre el tratamiento adulticida (Bazzocchi et al., 2008). Además, estudios recientes demuestran que el uso combinado de lactonas macrocíclicas a dosis preventivas junto doxiciclina reduce el número de microfilarias mucho más rápidamente, apareciendo perros negativos en menos de 3 meses (McCall et al., 2008a).

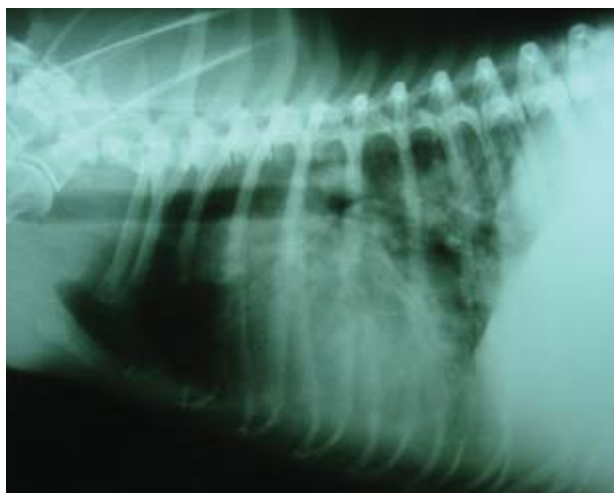


Figura 16. Radiografía torácica laterolateral de perro con dirofilariosis. Presenta un patrón pulmonar alveolar e intersticial con áreas radiodensas compatibles con tromboembolismos parasitarios.



Figura 17. Imagen macroscópica del pulmón del mismo perro de la imagen anterior, donde se pueden ver áreas infartadas y bulla cicatricial subpleural secundarios a dirofilariosis.

9.4. Eliminación de los parásitos adultos

La melarsomina diclorhidrato (*Immiticide*®) es el único fármaco adulticida disponible actualmente en el mercado (Atwell y Searle, 1989; Dzimiński et al., 1989). Se administra mediante inyección intramuscular profunda en la musculatura lumbar.

El tratamiento diferido es el protocolo de tratamiento recomendado, al ser más seguro y eficaz (Atkins y Miller, 2003; American Heartworm Society, 2012). Consiste en aplicar una primera inyección de melarsomina (2.5 mg/kg), una segunda inyección al cabo de un mes (2.5 mg/kg) y una tercera inyección pasadas 24 horas de la anterior (2.5 mg/kg) (Keister et al., 1992; Vezzoni et al., 1992; Nelson et al., 2005). Este protocolo elimina los adultos de forma escalonada, eliminando el 50% de los adultos (90% machos y 10% hembras) en la primera inyección, y el resto con la segunda y tercera inyección (Atkins y Miller, 2003). Esta eliminación progresiva reduce el tromboembolismo producido por la muerte de los parásitos, permitiendo al organismo del animal eliminar

los fragmentos embólicos de forma más efectiva, lo que resulta en complicaciones pulmonares menos severas y frecuentes. Además, es más eficaz eliminando parásitos adultos de *Dirofilaria immitis*, ya que elimina un 98% de las filarias adultas, frente al 90% eliminadas mediante el tratamiento clásico (Vezzoni et al., 1992).

9.5. Restricción de ejercicio

Desde que se diagnostica la enfermedad, y especialmente durante el periodo que dure el tratamiento adulticida, es indispensable restricción del ejercicio del animal para minimizar las complicaciones derivadas de la muerte de los parásitos. La posibilidad de restringir o no el ejercicio físico del perro durante el tratamiento adulticida es un factor determinante a la hora de clasificar al animal en un grupo de riesgo determinado (Dillon et al., 1995; McCall et al., 2008b).

Los parásitos muertos son arrastrados hacia las arteriolas pulmonares distales y capilares de los lóbulos pulmonares caudales, bloqueando el flujo sanguíneo y causando tromboembolismo. Durante periodos de actividad física incrementada, el aumento del flujo sanguíneo en esos vasos bloqueados podría provocar ruptura de los capilares y posterior fibrosis, que conllevaría a un aumento de la resistencia vascular pulmonar y favorecería el desarrollo de insuficiencia cardíaca derecha.

9.6. Tratamiento del tromboembolismo pulmonar

Es una consecuencia inevitable del tratamiento adulticida. El tromboembolismo de carácter leve suele pasar desapercibido. Si hay signos de embolismo (disnea, fiebre, tos, hemoptisis, exacerbación de fallo cardíaco derecho), éstos suelen aparecer entre los 7 y 10 días tras la administración del tratamiento, pues es cuando la mayoría de las filarias están muriendo, aunque pueden suceder hasta pasadas 4 semanas de la administración del tratamiento adulticida.

Para controlar los síntomas de tromboembolismo pulmonar se puede administrar prednisona. El uso conjunto de glucocorticoides junto con la restricción de ejercicio es el tratamiento de elección para el manejo del tromboembolismo pulmonar (Calvert et al., 1999). Se debe administrar sólo si se considera necesario, debido a los efectos adversos que puede presentar, como reducción del flujo pulmonar, empeoramiento de la endoarteritis y efectos procoagulantes (Rawlings et al., 1983).

El uso de la aspirina para reducir la arteritis pulmonar y como antitrombótico en perros infectados con *Dirofilaria immitis* está contraindicado en estos pacientes. No hay evidencias del beneficio clínico y hay investigaciones que sugieren que incluso

puede estar contraindicada (Boudreaux et al., 1991b; Knight, 1995; Kittleson, 1998; Atkins, 2005; American Heartworm Society, 2012).

9.7. Extracción quirúrgica de los parásitos

En perros con altas cargas parasitarias o con síndrome de la vena cava, existe una alternativa al tratamiento adulticida que es la extracción por vía transyugular (preferentemente derecha) de las filarias adultas accediendo a las cámaras cardíacas y arterias pulmonares mediante el uso de forceps flexibles Alligator o un lazo quirúrgico intravascular (Jackson et al., 1966; Sasaki et al., 1989; Ishihara et al., 1990; Bové et al., 2010).

Esta técnica quirúrgica permite minimizar los riesgos relacionados con los fenómenos tromboembólicos inducidos por los medicamentos adulticidas que ocurren después la muerte de los parásitos (Morini et al., 1998). Posteriormente a la extracción quirúrgica, se debe realizar un tratamiento adulticida con melarsomina para eliminar el resto de los parásitos adultos, así como las microfilarias y larvas migratorias (Strickland, 1998).

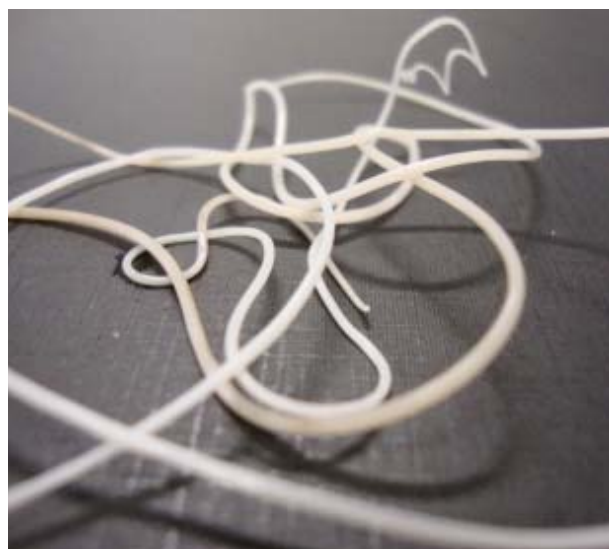


Figura 18. Adultos de *Dirofilaria immitis*. En la imagen se aprecia un macho, con el extremo posterior enrollado en espiral, y tres hembras.

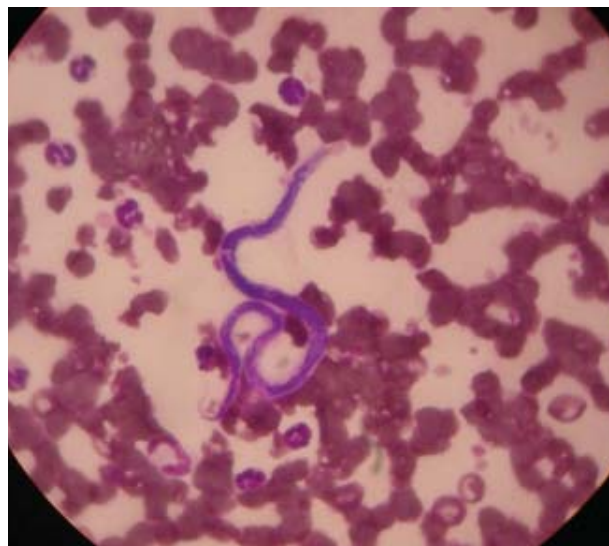


Figura 19. Microfilaria de *D.immitis* en un frotis sanguíneo (tinción hematoxilina-eosina, x40).

9.8. Lactonas macrocíclicas como adulticidas

Se sabe que las lactonas macrocíclicas poseen propiedades adulticidas (McCall et al., 1996; 1998; 2001a; McCall, 2005). La ivermectina en su dosis profiláctica mensual muestra actividad sobre infecciones que empezaron entre 3 y 7 meses antes, eliminando gradualmente parásitos pre-adultos (L5). Varios estudios demuestran que, si se aplican durante un periodo prolongado, presentan actividad adulticida parcial. La eficacia varía entre las diferentes lactonas macrocíclicas, siendo la ivermectina la más eficaz en los

diferentes estudios llevados a cabo (McCall et al., 1998; 2001a; 2001b; 2001c; 2003; Dzimianski et al., 2001; Rawlings, 2002; Atkins, 2005). No se recomienda seguir este método ya que el efecto adulticida requiere un periodo prolongado de tiempo antes de que los parásitos sean eliminados completamente. Además, cuanto más viejo sea el parásito al ser expuesto a la lactona macrocíclica por primera vez, más tiempo tarda en morir (Rawlings, 2002). Mientras tanto, la infección persiste y la enfermedad continúa empeorando (Rawlings et al., 2001). Los perros tratados de esta manera desarrollan una patología pulmonar más grave con el paso del tiempo, debido a la persistente irritación de la vasculatura pulmonar por parte de los parásitos. Ésta, además, es exacerbada por la nula restricción de ejercicio durante ese periodo de tiempo (Venco et al., 2004). La muerte del parásito no se realiza en condiciones controladas y puede coincidir con un momento de elevada actividad física del perro, lo que podría agravar considerablemente el cuadro de tromboembolismo.

Recientemente se han realizado estudios evaluando el empleo conjunto de doxiciclina e ivermectina como tratamiento adulticida, sin bien aún no hay resultados claros respecto a su eficacia y beneficios respecto a los tratamientos actuales (Bazzocchi et al., 2008; Grandi et al., 2010).

9.9. Confirmación de la eficacia del tratamiento adulticida

Para confirmar la eficacia del tratamiento, se debe realizar un test de antígenos a los 6 meses tras la última dosis de melarsomina. Sin embargo, este test no garantiza que el perro sea negativo a dirofilariosis, ya que puede haber presentes larvas o filarias juveniles que no presentan suficiente carga antigénica para dar positivo. Esto debe tenerse especialmente en cuenta si no se administró un tratamiento con lactonas macrocíclicas 2 ó 3 meses previos al tratamiento adulticida (American Heartworm Society, 2012). Además, a la vez que el test de antígenos, se debe determinar la presencia de microfilarias para asegurarse su correcta eliminación. Con la administración de lactonas macrocíclicas a dosis preventivas, en 6-9 meses todas las microfilarias son eliminadas.

9.10. Eliminación de las microfilarias

Se recomienda el empleo de lactonas macrocíclicas a dosis preventivas mensuales para la eliminación gradual de las microfilarias (Atkins, 2011). La muerte repentina de grandes cantidades de microfilarias puede producir efectos sistémicos entre las 4-8 horas tras la administración del fármaco. Además, también se han descrito reacciones adversas por la muerte simultánea de microfilarias en perros con baja microfilaremia, por lo que se recomienda en todos los casos su eliminación gradual, desde el momento en que se diagnostica la enfermedad (American Heartworm Society, 2012).

Biomarcadores de daño cardiopulmonar

1. HISTORIA DE LOS BIOMARCADORES CARDIOPULMONARES

El diagnóstico de la insuficiencia cardíaca y la evaluación de la función cardíaca en medicina humana y veterinaria se han basado tradicionalmente en la historia clínica, el examen físico, la auscultación y mediante el empleo de métodos diagnósticos como la electrocardiografía, radiografía y ecocardiografía. Pero desafortunadamente, el diagnóstico no siempre es fácil y estas pruebas son relativamente caras y exigen mucho tiempo.

Los primeros biomarcadores serológicos de daño cardíaco se basaron en la detección de enzimas cardíacas ([Ladenson, 2007](#)), publicándose en 1954 la primera descripción del uso de biomarcadores en el estudio de daño miocárdico, con la medición de aspartato aminotransferasa (AST) en un grupo de pacientes con infarto agudo de miocardio ([Karmen et al., 1954](#); [LaDue et al., 1954](#)). Un año más tarde, se describió el uso de lactato deshidrogenasa (LDH) para el diagnóstico del infarto de miocardio ([Wroblewski y LaDue, 1955](#)); posteriormente, se desarrollaron ensayos para la medición de creatina quinasa (CK) sérica como marcador cardíaco ([Dreyfus et al., 1960](#); [Dunn y Siegel, 1965](#)), convirtiéndose la CK en el marcador de elección debido a su rápida elevación en sangre tras el daño miocárdico y mayor especificidad en comparación con la AST y LDH ([Dolci y Panteghini, 2006](#)). Posteriormente, se desarrollaron ensayos para

FECHA	MARCADOR
Finales de los años 50	Aspartato Amino Transferasa (AST, SGOT)
Años 60	Creatin Kinasa (CK, CPK)
Años 70	Isoenzima de la CK (actividad de CK-MB)
Años 70	Isoenzimas de la Lactato Deshidrogenasa (ratio de LD1 a LD2)
Finales de los años 80	Concentración de masa de CK-MB
Mediados de los años 90	Troponina I, Troponina T

Tabla 1. Historia del empleo de los biomarcadores de daño miocárdico ([Landerson, 2007](#)).

determinar la actividad de la isoenzima CK-MB, un marcador más cardiospecífico que los anteriores, convirtiéndose en el biomarcador de daño miocárdico más importante de los años ochenta ([Jockers-Wretou y Pfeleiderer, 1975](#)).

Estos primeros biomarcadores no ofrecían especificidad cardíaca, ya que también estaban presentes en musculatura esquelética y otros tejidos. Además, presentaban una baja sensibilidad, con valores basales relativamente altos, que hacían complicada la interpretación de pequeños incrementos en la actividad serológica de estas enzimas, por lo que estos biomarcadores funcionaban incluso peor a la hora de diagnosticar patologías cardíacas no isquémicas.

Paralelamente, en 1975, se publicó por primera vez la relación entre mioglobina serológica y la presencia de infarto de miocardio ([Kagen et al., 1975](#); [Stone et al., 1975](#)), dando inicio al desarrollo de ensayos para la detección de anticuerpos monoclonales, lo que supuso un gran salto cualitativo en el campo del diagnóstico médico. Así, en los años ochenta se realizó un gran avance gracias al desarrollo del inmunoensayo y comenzó una nueva generación de biomarcadores, basados en la detección de anticuerpos, dando un enorme paso en la mejora del diagnóstico del infarto agudo de miocardio. En 1989, Katus et al. desarrollaron un inmunoensayo para detección de troponina T en pacientes con infarto agudo de miocardio ([Katus et al., 1989](#)); posteriormente, en 1995, Missov et al. describieron por primera vez la asociación entre troponina I y fallo cardíaco en 11 pacientes ([Missov et al., 1997](#)). Desde entonces hasta la actualidad, se ha incrementado notablemente el número de marcadores y su contribución a la cardiología, ocupando un primer plano en el diagnóstico y seguimiento de las cardiopatías, y actualmente son herramientas que se emplean para identificar individuos de alto riesgo, diagnosticar estados patológicos rápidamente y de forma precisa, y para determinar planes de tratamiento y pronóstico.

Mientras que el término “biomarcador” fue empleado por primera vez en 1989 ([Vasan, 2006](#)), en 2001 su definición se estandarizó como “una característica que es medida de forma objetiva y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas” ([Biomarkers Definitions Working Group, 2001](#); [Ramachandran, 2006](#)).

El uso de biomarcadores para detección de enfermedades cardiovasculares en medicina veterinaria supone un gran atractivo y se lleva evaluando ampliamente durante los últimos 15 años ([Boswood, 2009](#)). Varios inmunoensayos humanos han mostrado una sensibilidad adecuada para el diagnóstico de enfermedades cardíacas en veterinaria, además del creciente desarrollo de tests comerciales específicos para pequeños animales. El apoyo en este método diagnóstico sería de gran utilidad no solo al veterinario car-

diólogo, sino también para el veterinario de primera opinión, ya que podrían permitir:

- Confirmar o descartar enfermedad cardíaca en casos dudosos (cardiomegalia cuestionable en radiografías torácicas sin posibilidad de ecocardiografía, indicadores ecocardiográficos de función cardíaca o miocárdica ligeramente disminuidos, tos o disnea de origen dudoso, etc...).
- Confirmar o descartar enfermedad en estadios precoces, lo que permitiría iniciar tratamientos en el momento adecuado, reduciendo mortalidad y morbilidad asociados a los estadios avanzados de cardiopatías.
- Identificación de forma precisa de procesos difíciles de identificar (miocarditis, cardiopatía isquémica e hipertensión pulmonar).
- Monitorización durante la administración de fármacos potencialmente cardiotóxicos, o de enfermedades extracardíacas sobre la integridad y función miocárdica (doxorubicina, torsión / dilatación gástrica).
- Monitorización del tratamiento (estado cardíaco) en insuficiencia cardíaca congestiva
- Selección y cribado de ciertas poblaciones de razas en busca de enfermedades miocárdicas asintomáticas tales como la miocardiopatía dilatada (MCD) en Doberman.

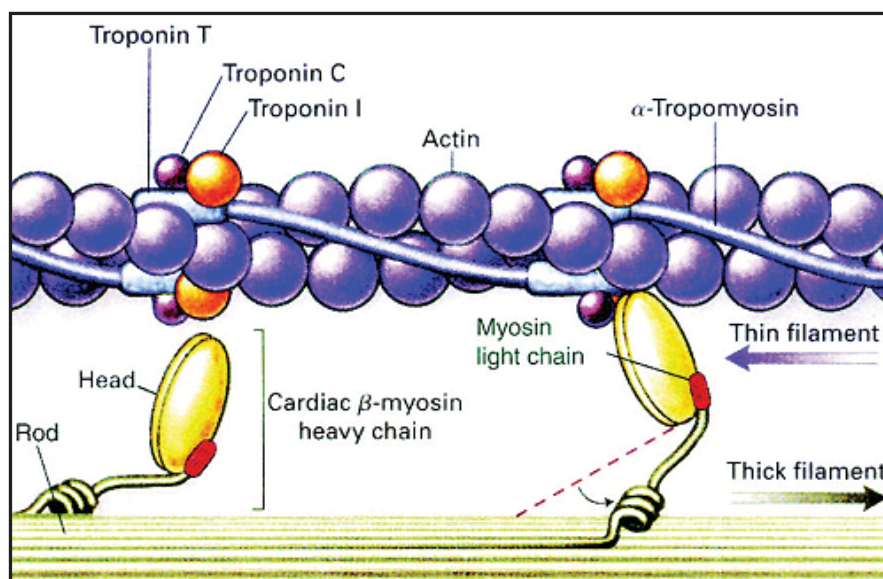


Figura 1. Esquema del filamento fino del sarcómero y estructura de la molécula proteica de actina a la que se asocian las proteínas reguladoras troponina y tropomiosina.

2. TROPONINAS CARDÍACAS: TROPONINA T e I

Las troponinas cardíacas son marcadores de integridad miocárdica y, debido a la elevada sensibilidad y especificidad para daño miocárdico que presentan, son consideradas los biomarcadores de elección para la detección de daño celular cardíaco ([Adams](#)

et al., 1993; Ohman et al., 1996; O'Brien et al., 1997a; Fredericks et al., 2001).

2.1. Fisiología

Las troponinas son proteínas reguladoras que forman parte del aparato contráctil del tejido muscular esquelético y cardíaco. Se encuentran integradas en los filamentos finos de actina, en la estructura de los miofilamentos musculares, y son esenciales para la regulación de la contracción del músculo mediada por el calcio.

Los miofilamentos de actina están constituidos por 2 hebras proteicas, que se enrollan para formar una estructura helicoidal doble. La tropomiosina es una molécula con forma de bastón, que corresponde a un dímero de dos cadenas helicoidales idénticas, que se enrollan una respecto de la otra para formar unos filamentos que discurren a lo largo de ambos bordes del miofilamento de actina. Completando esta estructura está la troponina, un complejo de 3 subunidades (troponina C, T e I) que se dispone en forma discontinua a lo largo del miofilamento; cada una de ellas es diferente funcionalmente e interactúan entre sí (Wells y Sleeper, 2008).

La troponina C se une al calcio para iniciar la contracción muscular. La troponina C está presente en dos isoformas: una de las isoformas está presente en las fibras musculares tipo 2 (contracción rápida) y la otra está presente en fibras musculares cardíacas y en las fibras musculares tipo 1 (contracción lenta). La homología que existe entre la isoforma cardíaca y una de las isoformas del músculo esquelético reduce la especificidad cardíaca de la troponina C y, por lo tanto, limita su utilidad diagnóstica para enfermedad cardíaca (Schreier et al., 1990).

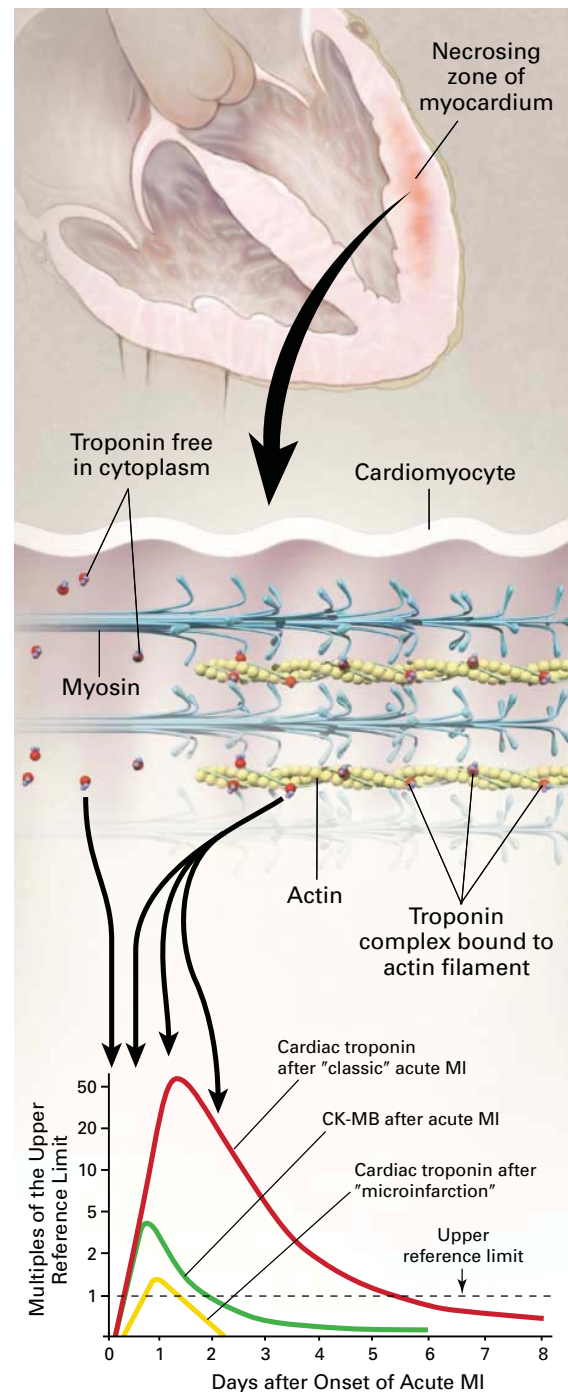


Figura 2. Esquema de la liberación de troponinas cardíacas durante el infarto agudo de miocardio (Antman, 2002).

La troponina T une el complejo troponina a la tropomiosina en las fibras musculares, manteniendo la unión entre la actina y la miosina. Existen múltiples isoformas de troponina T en músculo esquelético, mientras que en el tejido cardíaco humano existen cuatro isoformas, pero sólo una es característica del corazón adulto. Las otras tres isoformas cardíacas son expresadas en tejido fetal.

La troponina I inhibe la actomiosina ATP-asa y previene la interacción estructural de la miosina con los lugares de unión de la actina. La unión de los iones de calcio a la troponina C desplaza la troponina I y provoca un cambio de conformación de la tropomiosina, de modo que no interfiere con la unión actina-miosina y pueda llevarse a cabo la contracción muscular. Existen tres isoformas para la troponina I: dos de ellas están presentes en musculatura esquelética y la otra está presente sólo en musculatura cardíaca.

Liberación de troponina

La troponina se distribuye en dos compartimentos dentro de las células. En su mayor parte, se encuentra unida estructuralmente al filamento fino del aparato contráctil, mientras que un pequeño porcentaje permanece libre en el citosol celular. Este porcentaje corresponde aproximadamente al 2-4% de la troponina I y al 6-8% de la troponina T (Katus et al., 1991; Adams et al., 1994).

La cinética que muestra su liberación en la circulación sanguínea se correlaciona con la liberación de las troponinas presentes en los dos compartimentos celulares: tras el daño cardíaco agudo, la troponina libre citosólica es liberada, resultando en un incremento temprano de los niveles sanguíneos de troponina; posteriormente, es seguido por una liberación más lenta de las troponinas que se encuentran unidas estructuralmente al aparato contráctil, lo que resulta en una elevación sostenida de sus niveles serológicos (Katus et al., 1991; Adams et al., 1994; Jaffe et al., 1996). En humanos con infarto agudo de miocardio, los niveles de troponinas comienzan a elevarse a las 4-12 horas tras el infarto y alcanzan los valores más elevados a las 12-48 horas. Los niveles permanecen elevados durante 7-10 días en el caso de la troponina I y 10-14 días en caso de la troponina T (Cummins et al., 1987; Goldmann et al., 2001; Babuin y Jaffe, 2005). La elevación sostenida de troponinas durante varios días tras el infarto agudo de miocardio es probablemente debido a una liberación continuada desde los miocitos dañados (Fishbein et al., 2003). Se desconoce el mecanismo exacto de metabolización de las troponinas, aunque se cree que está relacionado con la depuración mediante el sistema reticuloendotelial (Freda et al., 2002), y también existen evidencias de que las troponinas podrían descomponerse en pequeños fragmentos que posteriormente podrían ser excretados renalmente (Diris et al., 2004).

2.2. Troponinas cardíacas en medicina humana

En humanos, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo ([Organización Mundial de la Salud, 2012](#)). El principal papel de la medición de troponinas cardíacas en medicina humana está enfocado al diagnóstico de la enfermedad isquémica cardíaca, como el infarto de miocardio. Durante años, los marcadores para el diagnóstico y evaluación del infarto agudo de miocardio incluían la CK total, CK-MB, LDH y AST ([Tunstall-Pedoe et al., 1994](#)). Sin embargo, estos biomarcadores tienen poca especificidad para daño cardíaco ([Tsung y Tsung, 1986](#); [Antman et al., 2000](#)), y aunque la CK-MB sea algo más específica que el resto, no lo es tanto como las troponinas ([Adams et al., 1993](#)). Además, los niveles de CK-MB regresan a los valores basales tras 48 horas del episodio isquémico, por lo que no es posible emplear este marcador para realizar un diagnóstico tardío de infarto, mientras que los niveles de troponinas permanecen elevados durante aproximadamente 10 días ([Rajappa y Sharma, 2005](#)). Debido a esto, en el año 2000 un comité de expertos de la Sociedad Europea de Cardiología y el Colegio Americano de Cardiología (ESC/ACC) desarrolló una nueva definición para el diagnóstico de infarto de miocardio ([Antman et al., 2000](#)), que estaba predominantemente basada en la medición de troponinas cardíacas, junto con

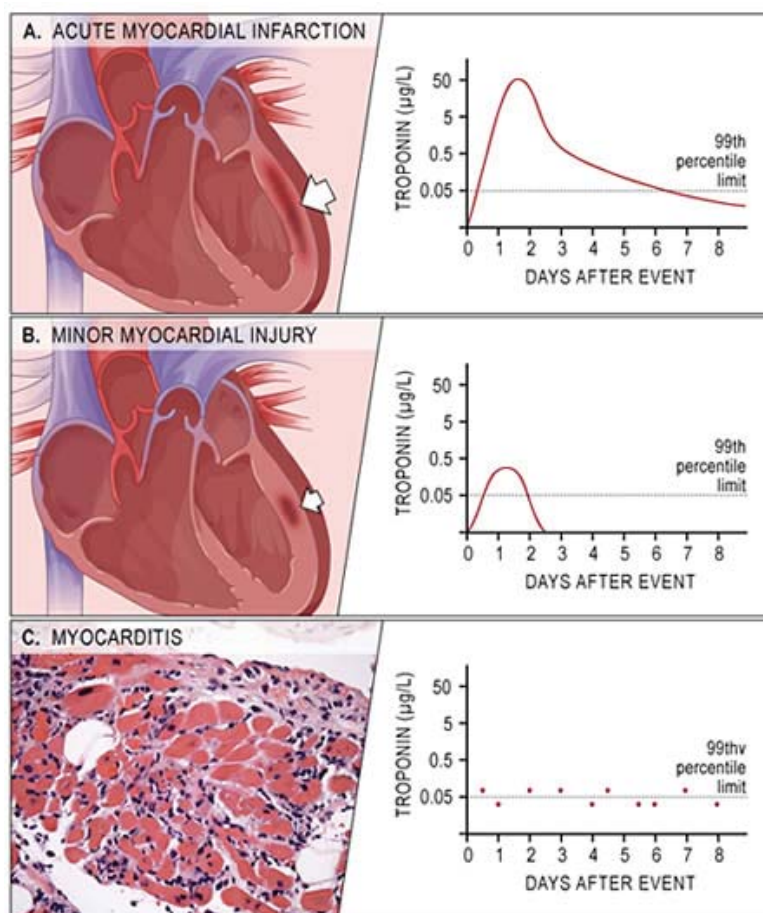


Figura 3. Cinética de la liberación de troponina tras daño miocárdico ([Melanson et al., 2007](#)).

un biomarcador que se eleve rápidamente, como la mioglobina o la CK-MB, en aquellas situaciones en las que se necesita un diagnóstico temprano ([Antman et al., 2000](#)). Estas nuevas medidas supusieron un incremento exponencial en el diagnóstico de infarto de miocardio ([Kontos et al., 2003](#)). Las últimas recomendaciones del ESC/ACC establecen las normas para su medición e interpretación en insuficiencia cardíaca aguda y crónica y, actualmente, junto con el ECG y el historial del paciente, son el método diagnóstico de referencia para el infarto agudo de miocardio ([Januzzi et al., 2012](#); [Newby et al., 2012](#)).

Mientras que la elevación de los valores de troponina indican daño miocárdico, éstas no dan ninguna información acerca del mecanismo que provoca ese daño. Para ayudar al diagnóstico, podrían analizarse muestras seriadas, porque daños agudos, tal como infarto de miocardio, mostrarán una elevación y caída de los valores serológicos típica, mientras que otras enfermedades cardíacas tal como la insuficiencia cardíaca congestiva, podrían mostrar elevaciones persistentes de troponina con valores relativamente bajos (Collinson y Stubbs, 2003).

Las troponinas cardíacas también presentan un papel importante a la hora de establecer un pronóstico. Con infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica o tromboembolismo pulmonar, cualquier nivel de troponina por encima de los valores de referencia está asociado a un mayor riesgo de complicaciones a corto y largo plazo (Antman et al., 1996; Stubbs et al., 1996; Galvani et al., 1997; Hamm et al., 1997; Giannitsis et al., 2000; LaVecchia et al., 2000). De hecho, el tamaño del área infartada podría ser predicho en base a los niveles alcanzados de troponina I o troponina T a las 72 horas (Licka et al., 2002; Metzler et al., 2002; Gallegos et al., 2004). Los niveles de troponinas con frecuencia regresan a valores normales tras el tratamiento con éxito del episodio isquémico agudo, lo que sugiere que los niveles de troponinas pueden utilizarse para monitorizar el curso clínico de la enfermedad (LaVecchia et al., 2000).

Diversos autores han discutido acerca de si la troponina es liberada durante el daño cardíaco reversible o si es solamente liberada tras un daño irreversible; hoy en día, se reconoce que la isquemia reversible también produce liberación de troponinas (Feng et al., 1998). Algunos estudios realizados tras ejercicio prolongado e intenso, han mostrado una liberación transitoria de troponinas cardíacas (Rifai et al., 1999; Neumayr et al., 2001), probablemente liberadas desde el compartimento citosólico. Esta hipótesis está apoyada por la observación de dos patrones de liberación de proteínas, llevadas a cabo en pacientes con angina inestable: un patrón temprano transitorio y un patrón persistente (Hamm et al., 1992; Feng et al., 1998; Wu y Ford, 1999). La observación de que la disfunción miocárdica encontrada durante la sepsis es reversible, también respalda la teoría de una liberación de troponinas asociado al daño reversible del miocardio (Parker et al., 1984). Sin embargo, aún no es posible diferenciar qué población de troponinas es liberada, por lo que el debate continúa abierto y se deben realizar más estudios para poder determinar su origen (Müller-Bardorff et al., 2002).

2.3. Troponinas cardíacas en pequeños animales

Animados por los grandes beneficios que el estudio de estas proteínas aportan a la cardiología humana, durante los últimos años se han publicado multitud de trabajos en los que se ha evaluado la utilidad de las troponinas en medicina veterinaria (Wells y

Sleeper, 2008); al igual que en medicina humana, en medicina veterinaria las troponinas cardíacas pueden ser liberadas durante la insuficiencia cardíaca aguda o crónica, siendo los niveles proporcionales a la gravedad de la patología. Se han llevado a cabo estudios de isquemia miocárdica con modelos experimentales en perros para estudiar el comportamiento de las troponinas (Cummins y Cummins, 1987; Remppis et al., 2000; Hori et al., 2012) y se ha visto que las concentraciones de troponina I se correlacionan con el tamaño del infarto (Ricchiuti et al., 1998).

Los niveles de troponinas pueden elevarse con muy pequeños focos de necrosis de miocardiocitos; en estos casos, la mayoría de los autores están de acuerdo en que los niveles de troponina I son más sensibles que los niveles de troponina T para detectar el daño cardíaco menor. Varios estudios han observado que la troponina I se elevaba con mayor frecuencia que la troponina T en varias patologías cardíacas en el perro (Hamm et al., 1997; Burguener et al., 2006; Apple et al., 2008; O'Brien, 2008). Esto podría ser debido al menor tamaño de la troponina I (24 KDa frente a los 37 KDa de la troponina T), por lo que ésta se libera con mayor facilidad en los primeros estadios de daño miocárdico (Linklater et al., 2007).

2.3.1. Ensayos

Las troponinas cardíacas se determinan empleando técnicas de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). La diferencia entre la secuencia de aminoácidos de las troponinas T e I del musculo esquelético y las cardíacas ha permitido la producción de anticuerpos específicos para la determinación de troponinas cardíacas mediante estas técnicas (Larue et al., 1992; Müller-Bardorff et al., 1997). El primer ensayo de detección de troponinas fue desarrollado a finales de los años ochenta. Desde entonces, estos ensayos han evolucionado drásticamente, obteniendo mayores sensibilidades y una mejor precisión. En los últimos años, se han desarrollado ensayos de troponina denominados “de alta sensibilidad”, que son 1000-10000 veces más sensibles que la primera generación de ensayos (Baker et al., 2011; Christ et al., 2011). El tiempo de obtención de los resultados también ha disminuido, pasando a ser de varias horas a los pocos minutos que tarda actualmente. Además, se han desarrollado unos tests de diagnóstico inmediato “in situ” (denominados *point-of-care*) que pueden ser empleados sin necesidad de enviar la muestra al laboratorio.

Determinación de la troponina I

Existen múltiples ensayos disponibles, procedentes de una variedad de fabricantes, para determinar la troponina I cardíaca, lo que ha traído consigo cierta confusión a la hora de interpretar los resultados. Los ensayos no están estandarizados, ya que los fa-

bricantes posiblemente diseñen los tests empleando diferentes anticuerpos patentados, que apunten a diversas secuencias de aminoácidos de la molécula de la troponina I (Katrukha et al., 1998; Apple, 1999), por lo que no existe un ensayo único estandarizado para la determinación de troponina I. Estudios comparativos empleando diversos analizadores concluyeron con la recomendación de que, hasta que el método esté estandarizado, se deben establecer rangos de referencia propios para cada analizador, y los valores absolutos obtenidos de diferentes analizadores no pueden ser comparados (Apple, 1999; Panteghini et al., 2004; Panteghini, 2005; Adin et al., 2006). Estudios en perros han mostrado que los niveles de troponina I no cambian significativamente en el suero almacenado a temperatura ambiental durante 5 días, ni en el suero que ha sido sometido hasta 5 ciclos de congelación y descongelación (Schober et al., 2002; Oyama y Solter, 2004).



Figuras 4 y 5. Algunos de los ensayos disponibles para la determinación de troponina I (figura 4) y troponina T cardíacas (figura 5), validados para su uso en veterinaria.

Determinación de la troponina T

Actualmente, sólo un fabricante produce un test para la determinación de troponina T (Singh et al., 2010), por lo que con esta proteína no existen problemas de comparación entre ensayos. La primera generación de ensayos de troponina T empleó un anticuerpo que presentaba reacciones cruzadas con la troponina T del músculo esquelético, por lo tanto descendía su especificidad para la detección de daño cardíaco (Katus et al., 1992; Dameron et al., 1997). Generaciones posteriores de ensayos de troponina T han reemplazado este anticuerpo por uno más específico y, por lo tanto, han eliminado los falsos positivos provocados por daño muscular (Müller-Bardorff et al., 2002). Aunque la sensibilidad de los ensayos para la determinación de troponinas ha mejorado a lo largo de los años, todavía existen dudas acerca de su precisión en daño miocárdico de bajo nivel (Apple et al., 2002b). Por otro lado, también se ha informado de falsos positivos debido

a interferencias por sustancias presentes en la sangre, como factores reumatoides, exceso de fibrina, anticuerpos heterófilos, hemólisis, lipemia, elevada fosfatasa alcalina y formación de complejos inmunes.

Empleo en medicina veterinaria

Mientras que algunos analizadores han sido específicamente fabricados para su uso en medicina veterinaria, se cree que los ensayos humanos para la determinación de troponinas pueden ser empleados para medir los niveles sanguíneos de las troponinas cardíacas T e I en la mayoría de las especies estudiadas (O'Brien et al., 1997a; 1997b; Schober et al., 1999; Fredericks et al., 2001; Sleeper et al., 2001; Adin et al., 2005; Oyama y Sisson, 2004; Oyama y Solter, 2004; Rishniw et al., 2004a; Sisson, 2004; O'Brien et al., 2006). Recientemente, se han secuenciado los genes para troponina I cardíaca felina y canina, demostrando que la homología entre los genes caninos y felinos, y genes humanos es del 95% y 96%, respectivamente. En la región empleada para la detección en la mayoría de los ensayos, genes caninos y felinos fueron idénticos entre ellos, mientras que los humanos fueron diferentes de éstos solamente por un aminoácido (Rishniw et al., 2004a). Las especies estudiadas incluyen perros, ratones, ratas, cerdos, monos, ovejas, conejos, caballos y vacas. Sin embargo, la medición de troponina I cardíaca parece menos útil en aves y nada útil en peces (O'Brien et al., 1997b).

Se han publicado valores normales de troponina T e I cardíaca en medicina veterinaria (Sleeper et al., 2001; DeFrancesco et al., 2002; Herndon et al., 2002; Phillips et al., 2003; Oyama y Sisson, 2004; Tarducci et al., 2004; Spratt et al., 2005; Burguener et al., 2006); aunque cada ensayo debe tener su propios rangos de referencia establecidos, la mayoría de los animales sanos presentan valores de troponina por debajo del umbral de detección de los ensayos actuales.

2.3.2. Troponinas en diferentes patologías

Cardiopatías adquiridas

Varios estudios en medicina veterinaria han mostrado que los niveles de troponina T e I pueden estar elevados en enfermedades cardíacas primarias (DeFrancesco et al., 2002; Herndon et al., 2002; Oyama y Sisson, 2004; Tarducci et al., 2004; Spratt et al., 2005; O'Brien et al., 2006). Un estudio mostró que, empleando el método de clasificación de insuficiencia cardíaca del International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC, 1995), los perros con insuficiencia cardíaca clases II y IIIA tenían niveles de troponina I mayores que los perros normales y los perros con insuficiencia cardíaca clase IA y IB (Spratt et al., 2005). Los perros con niveles de troponina I más elevados pre-

sentaban tiempos de supervivencia más cortos, correlacionando niveles de troponina con la gravedad y el pronóstico de la enfermedad. Además, se encontró una correlación entre el tamaño de las cámaras cardíacas y los valores de troponina I (Oyama y Sisson, 2004). Estudios similares llevados a cabo en perros usando el ensayo de troponina T, han mostrado valores elevados en aproximadamente el 30% de los pacientes con enfermedad cardíaca adquirida, lo que es congruente con otros estudios que muestran que la troponina I es más sensible que la troponina T (DeFrancesco et al., 2002; Tarducci et al., 2004).

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) en gatos puede provocar áreas de isquemia microscópicas e hipertrofia miocárdica con necrosis celular y liberación de troponinas en la circulación (Maron et al., 1986; Krams et al., 1998). Aunque los gatos con enfermedad leve a moderada podrían tener niveles de troponina I normales, los gatos con MCH moderada a severa tienen niveles de troponina I circulante significativamente mayores que los gatos normales (Herndon et al., 2002; Herndon et al., 2004a), especialmente aquellos gatos que presentan insuficiencia cardíaca, lo que sugiere que la determinación de troponina I podría ser empleada para diferenciar gatos con causas cardíacas y extracardíacas de distrés respiratorio (Herndon et al., 2002; Herndon et al., 2004b).



Figura 6. Boxer con cardiomiopatía arritmogénica ventricular derecha, sometido a un registro Holter 24 horas.

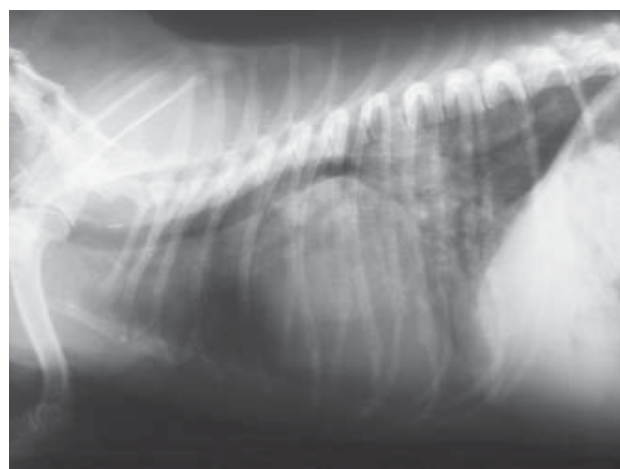


Figura 7. Radiografía torácica latero-lateral de un perro con VMAC, con cardiomegalia, dilatación de aurícula izquierda y edema pulmonar.

Varios estudios han evaluado los valores de troponinas en perros con valvulopatía mitral adquirida crónica (VMAC). No sólo presentaban valores elevados de troponina I, sino que además observaron que ésta se elevó más rápidamente en perros que murieron de enfermedad cardíaca, demostrando el valor pronóstico de las troponinas en perros con esta enfermedad (Oyama y Sisson, 2004; Spratt et al., 2005; Linklater et al., 2007; Bakirel y Gunes, 2009; Ljungvall et al., 2010; Hezzell et al., 2012; Trafny et al., 2012).

Se ha demostrado que los perros con miocardiopatía dilatada (MCD) con valores de troponina I más elevados tiene un peor pronóstico que perros con menores elevaciones, concluyendo que los niveles de troponina I tienen un impacto importante en la supervivencia de los perros con esta enfermedad (Pelander et al., 2002; Oyama y Sisson, 2004; Spratt et al., 2005; Noszczyk-Nowak, 2011). Por otro lado, varios estudios determinaron que las troponinas T e I tenían bajo valor predictivo para detectar MCD oculta en perros asintomáticos (DeFrancesco et al., 2002; Oyama et al., 2007). Sin embargo, en contraposición otro estudio más reciente ha publicado que la troponina I es un test diagnóstico valioso que puede detectar MCD en perros que son clínicamente normales (Wess et al., 2010).

Los perros Boxer con cardiomiopatía arritmogénica ventricular derecha presentan niveles de troponina I significativamente mayores que los Boxer sanos y los perros no Boxer (Baumwart et al., 2007). Esto probablemente se debe a una pérdida de troponinas persistente debido a la miocarditis y degeneración de las miofibras que se produce en esta enfermedad (Basso et al., 2004).

Cardiopatías congénitas

Los valores de troponina I en perros con cardiopatías congénitas (ductus arteriosos persistente (DAP), estenosis aórtica, estenosis pulmonar y defecto septal interventricular), no variaban significativamente respecto a los valores para perros sanos (Spratt et al., 2005). Aunque por otro lado, otro estudio mostró valores de troponina I en perros con estenosis subaórtica superiores a los valores de perros sanos, y además encontraron una correlación, aunque débil, con el grosor de la pared ventricular (Oyama y Sisson, 2004). Tras la corrección quirúrgica de algunas de estas patologías, se observó que 7 de los 10 perros estudiados presentaban niveles de troponina I elevados tras el cierre del DAP, probablemente por daño miocárdico provocado por cambios agudos en las presiones tras el cierre de la comunicación (Bussadori et al., 2008). Igualmente, perros con estenosis pulmonar grave tras cirugía de valvuloplastia mostraron concentraciones de troponina I elevadas en un 30% comparadas con valores pre-quirúrgicos, probablemente por daño miocárdico al inflar el balón de valvuloplastia (Saunders et al., 2009b).

Arritmias

Perros con bradiarritmias, principalmente bloqueo auriculo-ventricular y síndrome del seno enfermo, también mostraron valores elevados de troponina I, correlacionado con valor pronóstico de tiempos de supervivencia (Church et al., 2006; Guglielmini et al., 2006; Lee et al., 2009; Fonfara et al., 2010a; Trafny et al., 2010). La causa subyacente de estas arritmias, como fibrosis o inflamación, o daño hipóxico secundario a una

perfusión disminuida, probablemente sean las causas de estas elevaciones. En un perro con bloqueo auriculo-ventricular de tercer grado y valores elevados de troponina I, se observó una necrosis miocárdica extensa en la necropsia (Church et al., 2007). Los estudios de los valores de troponinas tras la implantación de un marcapasos son divergentes; algunos autores han observado una elevación de las mismas, sobre todo en perros con bloqueo auriculo-ventricular (Trafny et al., 2010), mientras que otros han publicado una reducción de los valores de troponina I tras la instauración del marcapasos (Fonfara et al., 2010b).

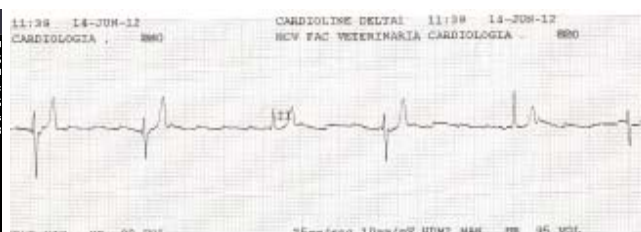
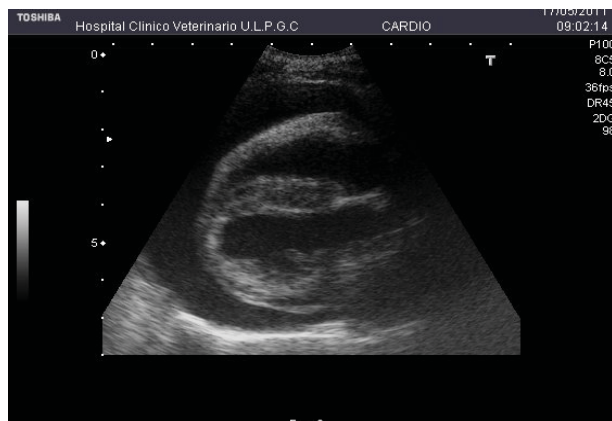


Figura 8. Electrocardiograma de un perro con bloqueo auriculo-ventricular de tercer grado.

Figura 9. Imagen ecocardiográfica de un perro con efusión pericárdica.

Disnea

Hay varios estudios que evalúan la utilidad de la troponina I para diferenciar la disnea de origen cardíaco de la disnea no cardiogénica en perros, sin embargo las conclusiones difieren entre ellas; unos autores no observaron ninguna diferencia significativa entre los valores de troponinas de ambos grupos de perros (Prosek et al., 2007), mientras que otros autores afirman su validez, si bien recomiendan no emplear la medición de troponina I como único método diagnóstico (Herndon et al., 2008; Payne et al., 2011). Perros braquicéfalos con síndrome obstructivo de las vías respiratorias altas también mostraron valores de troponina I elevados: se hipotetizó que probablemente existiera daño miocárdico, por activación simpática, hipoxia y elevación de la presión arterial, al igual que sucede en humanos con síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) (Planellas et al., 2012).

Enfermedad pericárdica

Se ha demostrado que la enfermedad pericárdica provoca elevaciones de troponinas en humanos (Brandt et al., 2001); se cree que su liberación es secundaria a inflamación del epicardio, mientras que la disminución en la perfusión coronaria durante el taponamiento cardíaco también podría producir su liberación. Estudios han mostrado que perros con efusión pericárdica tienen valores de troponina I significativamente más ele-

vados que los perros normales (Linde et al., 2003; Shaw et al., 2004; Spratt et al., 2005; Linde et al., 2006). Algunos autores sugirieron que los niveles de troponina I podrían ser empleados para diferenciar la efusión pericárdica idiopática y la efusión debida a hemangiosarcoma, al encontrar que los perros con hemangiosarcoma mostraban valores de troponina I significativamente más elevados en comparación con perros con efusión pericárdica idiopática (Shaw et al., 2004; Chun et al., 2010). Sin embargo, un estudio prospectivo diferente llevado a cabo con 20 perros, encontró que los niveles de troponina I no diferenciaban la etiología en estos casos (Linde et al., 2003).

Trauma cardíaco

Un traumatismo cardíaco directo puede resultar en elevaciones de troponinas; esto podría ser secundario a daños mecánicos tal como cirugía cardíaca, cateterización, contusiones miocárdicas por traumatismos torácicos, daños eléctricos provocados durante la cardioversión, procesos de ablación, o desfibrilización (Antman et al., 2000; Hasdemir et al., 2002; Velmahos et al., 2003). Elevaciones de las troponinas T e I también han demostrado ser sensibles para detectar daño cardíaco en perros y gatos con traumatismo torácico (Shober et al., 1999; Kirback et al., 2000; DeFrancesco et al., 2002; Burguener et al., 2006; Diniz et al., 2007).

Enfermedades infecciosas e inflamación

Durante la sepsis, la disfunción miocárdica y elevaciones de troponinas son frecuentes (Fernandes et al., 1999; Ver Elst et al., 2000). Se desconocen los mecanismos exactos, aunque se han propuesto varias posibilidades, como falta de suministro de oxígeno, microémbolos sépticos, efectos tóxicos de las endotoxinas bacterianas, o efectos cardio-depresores de las citoquinas, como el factor-alfa de necrosis tumoral (Ver Elst et al., 2000; Morrow, 2003); también podría estar implicado el daño por isquemia y reperfusión secundario a disfunción microvascular. Elevaciones de troponina I también se presentan en casos de miocarditis (Smith et al., 1997). Actualmente, hay pocos trabajos en medicina veterinaria acerca de los niveles de troponina I en sepsis.

Perros con parvovirus mostraron valores elevados de troponina I, probablemente debido a la miocarditis primaria o secundaria a sepsis que se puede presentar en esta enfermedad, siendo más elevadas en los perros que no sobrevivían a la enfermedad frente a los que sí (Kocaturk et al., 2012). Aunque no es común, la babesiosis canina puede provocar lesiones cardíacas, como hemorragia del epicardio y endocardio, infiltrado celular inflamatorio, necrosis de miocardio y efusión pericárdica (Lobetti et al., 2002). Se cree que estos cambios están relacionados con una respuesta inflamatoria severa e hipoxia anémica. Las elevaciones de la troponina I se pueden utilizar para determinar la

implicación cardíaca en la babesiosis, y existe una asociación entre niveles de troponina I y la gravedad clínica y mortalidad (Lobetti et al., 2012).

Un estudio de perros de Brasil infectados por *Ehrlichia canis*, mostró que el 44% de los pacientes presentaban concentraciones elevadas de troponina I que sugería la presencia de daño miocárdico, sin que hubiera enfermedad cardíaca aparente (Diniz et al., 2008). Otro estudio mostraba elevaciones de troponina I en 45.5-59.1% de los perros con ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*) (Koutinas et al., 2012). Perros infectados por *Leishmania infantum* presentaron elevaciones de troponina I en el 40% de los casos, indicativo de daño miocárdico (Silvestrini et al., 2012). Igualmente se observaron valores elevados en perros infectados por *Trypanosoma cruzi* (Barr et al., 2005). En un estudio en perros con leptospirosis (*Leptospira interrogans*) vieron que los niveles de troponinas predecían el resultado de la enfermedad, siendo sus valores mayores en perros que no sobrevivían a la enfermedad (Mastorilli et al., 2007).



Figura 10. Áreas de necrosis en pared miocárdica del corazón de un galgo tras la administración de ractopamina (Yaeger et al., 2012).

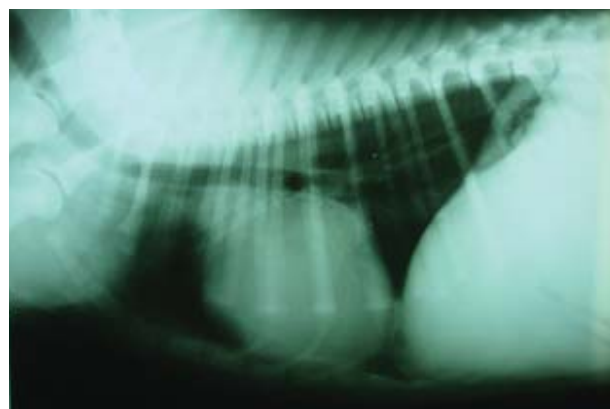


Figura 11. Radiografía torácica latero-lateral de un perro con DAP, con aumento de la silueta cardíaca.

Farmacos y tóxicos

La miocardiopatía secundaria a quimioterapia, especialmente por antraciclinas, como la doxorubicina, es irreversible y normalmente letal. El desarrollo de la miocardiopatía se relaciona con la dosis acumulativa del fármaco durante el tratamiento quimioterápico y los signos clínicos de enfermedad cardíaca pueden retrasarse, apareciendo cuando la quimioterapia ha terminado (Selting et al., 2004). En estudios veterinarios, la troponina T se elevó en 2 perros con linfoma recibiendo tratamiento quimioterápico (DeFrancesco et al., 2002), sin que mostraran evidencias de enfermedad cardíaca previamente. Un estudio retrospectivo mostró que elevaciones de troponina I fueron observadas en 32 de los 44 perros estudiados durante tratamiento quimioterápico con doxorubicina, para linfoma y osteosarcoma, pero las elevaciones no predijeron el de-

sarrollo de enfermedad cardíaca, basada principalmente en hallazgos del examen físico y radiografías torácicas (Selting et al., 2004).

En un estudio en galgos, tras la administración de ractopamina (un beta 2-agonista usado como anabolizante en ganado y en perros de competición), 7 de 9 presentaban elevaciones de troponina I y desarrollaron arritmias cardíacas; dos de ellos fueron eutanasiados, y en la necropsia se pudieron apreciar focos de necrosis en el miocardio (Yaeger et al., 2012).

No se observaron aumentos de los valores de troponina I tras la sedación con metomidina y butorfanol durante 30 minutos, ni tras anestesia con isoflurano en perros sanos (O'Brien et al., 2006; Singletary et al., 2010). Sin embargo, otros estudios han demostrado elevaciones de la troponina I en perros sanos tras la anestesia, en comparación con los valores pre-quirúrgicos (Saunders et al., 2009a; Cilli et al., 2010), considerando que la hipotensión y reducción de la perfusión tisular producidas durante la anestesia pudieron producir lesión miocárdica menor (Saunders et al., 2009a).

También se han descrito elevaciones de troponina I en perros envenenados con bufotoxina (veneno de sapo *Bufo spp*) (Camplesi et al., 2009) y por mordedura de víbora común europea (*Vipera berus*) y víbora palestina (*Vipera palaestinae*) (Segev et al., 2008; Pelander et al., 2010).

Ejercicio y daño muscular

Varios estudios han mostrado niveles de troponinas elevados en humanos tras realizar ejercicio físico de alta resistencia, como maratones y triatlones (Rifai et al., 1999; Chen et al., 2000; Neumayr et al., 2001); se cree que esto representa un daño cardíaco temporal, y que la liberación de troponina en estos casos podría proceder de la reserva libre citosólica. Perros de trineo de Alaska durante la realización de ejercicio extremo, mostraron elevaciones de troponina I, obteniéndose los mayores valores tras correr largas distancias (160 km) (McKenzie et al 2007), mientras que tras ejercicio intenso durante breves periodos de tiempo no se elevaron significativamente sus valores (Wakshlag et al., 2010).

Tromboembolismo pulmonar e hipertensión pulmonar

Humanos con tromboembolismo pulmonar (TEP) e hipertensión pulmonar (HTP) presentan elevaciones de troponinas cardíacas (Meyer et al., 2000; Douketis et al., 2002; Konstantinides et al., 2002; Torbicki et al., 2003; Andersen et al., 2012). Ambas patologías provocan sobrecarga de presión del ventrículo derecho y una menor perfusión

miocárdica. Estos cambios, junto con la hipoxemia provocada por el TEP, pueden producir daño cardíaco y liberación de troponinas (Giannitsis et al., 2000). Los pacientes con TEP y troponinas elevadas tienen un peor pronóstico que aquellos sin elevaciones de troponinas (Giannitsis et al., 2000). En veterinaria existen pocos estudios y los resultados son contradictorios: algunos autores no hallaron elevaciones de troponina I en perros con HTP precapilar (Kellihan et al., 2011), frente a otros que sí (Guglielmini et al., 2010); como explicación a estos resultados discordantes, concluyeron que podrían deberse a los diferentes estados de enfermedad en que se encontraban los perros de ambos estudios (Kellihan et al., 2011).



Figura 12. Perro afectado de VMAC con desarrollo de edema pulmonar agudo, en posición ortopneica.



Figura 13. Radiografía torácica laterolateral de perro con MCD, en la que se puede apreciar cardiomegalia y presencia de edema pulmonar.

Otras patologías extracardíacas

Las complicaciones cardiovasculares por dilatación vólvulo-torsión gástrica (DVT) son frecuentes; éstas incluyen shock, isquemia y daños por reperfusión, y arritmias. Se ha demostrado que perros con DVT pueden desarrollar isquemia y necrosis del miocardio (Schober et al., 2002). Dos estudios en veterinaria han evaluado las mediciones de troponinas para identificar el daño miocárdico en perros con DVT (Schober et al., 2002; Burgener et al., 2006). Un estudio evaluó 85 perros con DVT y encontró niveles elevados de troponinas I y troponinas T en 87% y 51% de los pacientes, respectivamente. Los resultados del segundo estudio fueron similares, con valores de troponina I y troponina T elevados en 93% y 57% de los pacientes, respectivamente (Burgener et al., 2006). Todos los perros que murieron tenían valores elevados de troponina I (Schober et al., 2002; Burgener et al., 2006).

Los gatos con hipertiroidismo presentan anomalías cardiovasculares frecuentemente. Estas pueden ser taquicardia, hipertrofia miocárdica, hipertensión, arritmias, e in-

suficiencia cardíaca congestiva, especialmente si al mismo tiempo hay presente una miocardiopatía primaria. Varios estudios han demostrado elevaciones de troponina I en esta patología (Connolly et al., 2003; 2005). En uno de ellos, evaluaron 23 gatos hipertiroideos, de los cuales 11 presentaban niveles elevados de troponina I (Connolly et al., 2005). Seis meses después del tratamiento con yodo radioactivo, sólo tres gatos tenían todavía concentraciones elevadas de troponina I, lo que sugiere que el daño continuado a los miocardiocitos se había resuelto en la mayoría de los ellos.

Otras patologías que han mostrado elevaciones de troponinas por daño miocárdico secundario son golpe de calor (Mellor et al., 2006), rabdomiolisis (Wells et al., 2009), polimiositis (Warman et al., 2008), anemia hemolítica inmonomediada (Gow et al., 2011), anemia, pancreatitis, Cushing y Addison descompensados, cólico severo, linfoma y otras neoplasias (Serra et al., 2010). Perros con piometra mostraron de ligeras a moderadas elevaciones de troponina I sin haber llegado a determinar su origen (Hagman et al., 2007; Pelander et al., 2008).

Edad y Raza

Aunque hay pocos estudios al respecto, perros de edades avanzadas podrían relacionarse con incrementos de troponina I (Oyama y Sisson, 2004; Ljungvall et al., 2010). Se han observado mayores valores de troponina I en perros Doberman sanos con más de 8 años de edad, posiblemente por cambios en el miocardio relacionados con la edad o por miocardiopatía inicial (Wess et al., 2010).

LaVecchio et al. (2009) encontraron valores de troponina I significativamente mayores en galgos deportivos retirados que en perros de otras razas. Sin embargo, otras patologías subyacentes deben tenerse en cuenta y hacen falta más estudios para determinar si existen variaciones de los valores basales de troponinas entre diferentes razas de perros.

Fallo renal

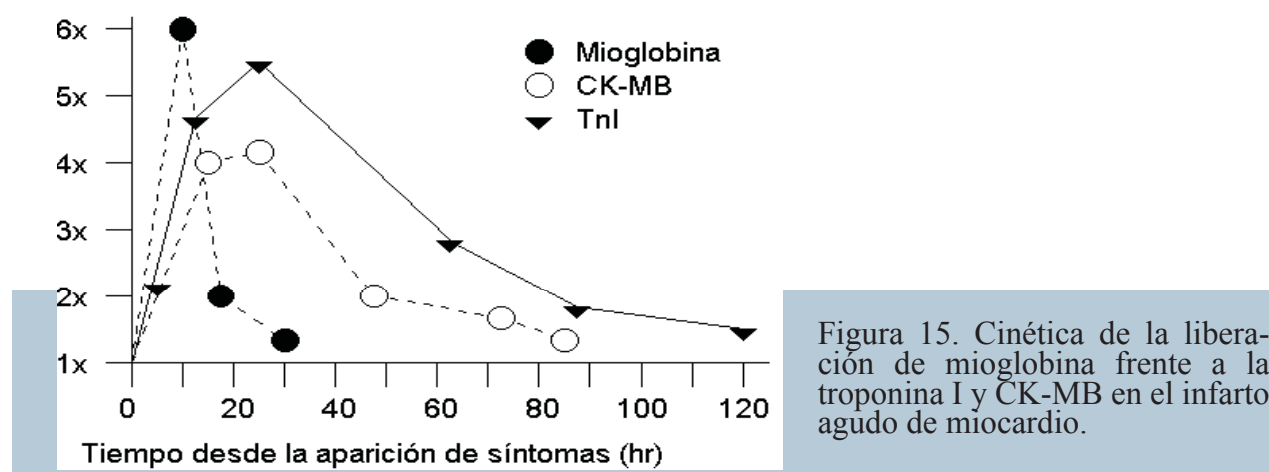
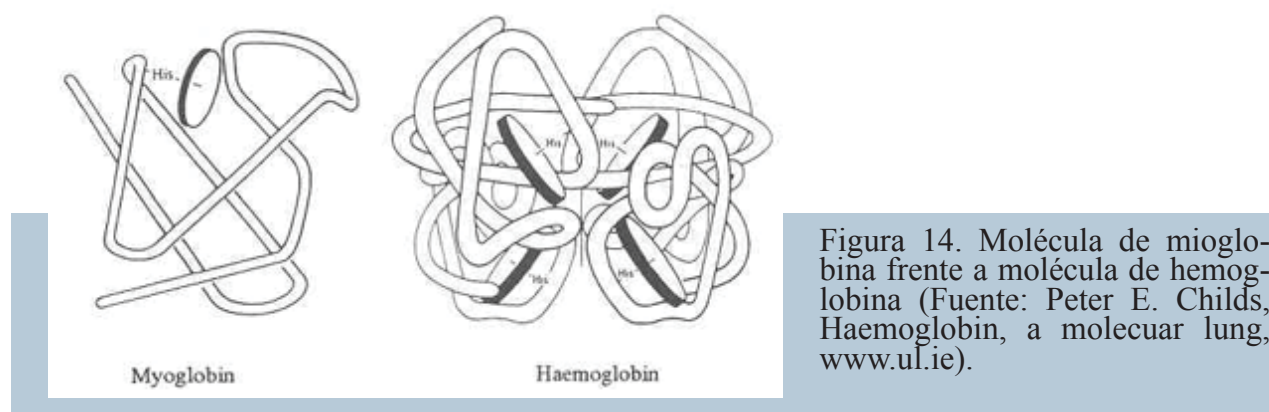
Diferentes estudios muestran que entre el 7-18% de los humanos con fallo renal presentan valores elevados de troponina I (Freda et al., 2002; De Zoysa, 2004; Abbas et al., 2005) y además estos valores elevados son indicadores pronósticos de mortalidad (Stolear et al., 1999; Apple et al., 2002a). Aunque la causa exacta de estas elevaciones se desconoce, se han propuesto varios mecanismos, incluyendo necrosis miocárdica oculta, hipertrofia ventricular y aclaramiento renal disminuido (Diris et al., 2004; Jeremias y Gibson, 2005). La troponina T está más comúnmente asociada a elevaciones durante la insuficiencia renal, con un 82% de los pacientes con elevaciones de troponina T frente

al 7% con valores elevados de troponina I (Apple et al., 2002a; Lamb et al., 2004). Probablemente, el aclaramiento de la troponina T está disminuido por su mayor tamaño (37 KDa frente a los 24 KDa de la troponina I), por lo que su medición es menos útil para detectar daño miocárdico no isquémico en pacientes con insuficiencia renal (Schober, 2005). Hay varios estudios que muestran elevaciones de troponina I en gatos y perros con azotemia e insuficiencia renal (Rishniw et al., 2004b; Porciello et al., 2008; Sharkey et al., 2009; Serra et al., 2010).

3. MIOGLOBINA

3.1. Fisiología

La mioglobina es una proteína monomérica de peso molecular relativamente bajo (17.8 KDa), que fija el oxígeno del músculo estriado, tanto cardíaco como esquelético. Está unida de manera reversible al oxígeno y aumenta su transporte a las mitocondrias, desempeñando un papel importante en el metabolismo aerobio celular (Kamga et al., 2012). La mioglobina está relacionada filogenéticamente con la hemoglobina (Kendrew et al., 1954; Wittenberg y Wittenberg, 1989), y mientras la hemoglobina se une a cuatro



moléculas de oxígeno, la mioglobina se une solamente a una molécula de oxígeno, y esta unión no es modificada por el pH del sarcoplasma. Así, el oxígeno unido a la mioglobina puede emplearse cuando el músculo está privado de oxígeno procedente de la circulación sanguínea, necesario para mantener la función mitocondrial (Kamga et al., 2012).

La mioglobina está localizada en tejido muscular esquelético y cardíaco, y representa el 2% del contenido proteico citoplasmático en esas células (Varki et al., 1978; Kiessling et al., 1981; Vaidya, 1992); la proteína es idéntica en ambos tipos de tejido muscular (Wu, 1989). Además, no sólo está presente en el músculo estriado, sino que también se ha demostrado su presencia en musculatura lisa en humanos; mediante técnicas inmunohistológicas, se detectó en muy pequeñas concentraciones en el colon, intestino delgado, útero y vejiga, además de arterias y venas (Qiu et al., 1998).

El daño celular, debido a una perfusión tisular inadecuada o por trauma, puede conducir a la liberación de mioglobina a la circulación (Varki et al., 1978). Los niveles de mioglobina se elevan a las 2 horas tras el episodio isquémico, alcanzan sus valores máximos entre las 6-9 horas y regresan a la normalidad entre las 24-36 horas (Vaidya, 1992). La vida media de la mioglobina en plasma es de 5-9 minutos en perros y 10-20 minutos en humanos (Klocke et al., 1982; Ellis y Saran, 1989), y se elimina con rapidez por la orina. La elevación tan temprana de los niveles de mioglobina se atribuye al pequeño tamaño de la proteína (Vaidya, 1992; Bhayana y Henderson, 1995).

3.2. Mioglobina en medicina humana

En medicina humana, la utilidad de la mioglobina reside en su elevada sensibilidad y valor predictivo negativo en las primeras horas del infarto agudo de miocardio (Brogan et al., 1994; McCord et al., 2001; Singh et al., 2010).

Su principal ventaja radica en la rapidez de su elevación en sangre, siendo actualmente la prueba diagnóstica más precoz del infarto agudo de miocardio (Van Blerk et al., 1992; Montague y Kircher, 1995; Laurino et al., 1996; de Winter et al., 2000; Lang et al., 2000; McCord et al., 2003) o contusión cardíaca (Keller y Shatney, 1988; St Louis y Grandhi, 1994; Ferjani et al., 1997; Bertinchant et al., 2000; Collins et al., 2001; Sybrandy et al., 2003). Sin embargo, durante las 3-4 primeras horas desde la aparición de los síntomas, un incremento aislado de mioglobina no es lo suficientemente sensible para el diagnóstico (Mair, 1997); por lo tanto, elevaciones de mioglobina obligan a la determinación ulterior de otro marcador más cardiospecífico, como las troponinas cardíacas o CK-MB; estos marcadores son más específicos pero la elevación de sus valores serológicos comienza más tarde. Por otro lado, la medición de valores

de mioglobina nos proporciona información sobre la posible extensión de la necrosis miocárdica, si sus cifras no vuelven a la normalidad en el tiempo estimado normal (24 a 36 horas después del daño miocárdico).

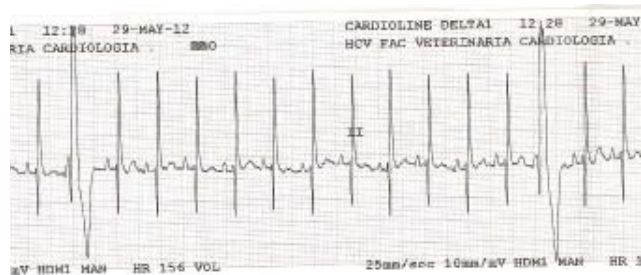
Un estudio con 951 pacientes humanos con sospecha de padecer un síndrome coronario agudo, observó que los valores de mioglobina y de troponina I en el momento de la presentación del paciente en el centro de urgencias, eran importantes indicadores, independientes entre sí, del pronóstico a largo plazo, y ambos se asociaron con una mayor mortalidad en un periodo de 5 años (Jaffery et al., 2008). Otro estudio con 3461 pacientes, concluyó que, a pesar de la ausencia de especificidad cardíaca, valores elevados de mioglobina estaban fuertemente relacionados con la mortalidad de los pacientes (Kontos et al., 2007). El hecho de que la mortalidad asociada a la mioglobina fuera elevada en pacientes con valores de troponina I negativos, sugiere que la mioglobina podría predecir la mortalidad a través de mecanismos basados en isquemia no miocárdica. Por ejemplo, la hipotensión y la perfusión renal reducida pueden resultar en liberación de mioglobina por la musculatura esquelética (Spangenthal y Ellis, 1995) y podría contribuir a la mortalidad de origen no cardíaco. De acuerdo con esta teoría, un pequeño estudio en 31 pacientes que presentaban sepsis o shock hipovolémico mostraron que las elevaciones de mioglobina (97%) eran más frecuentes que elevaciones de troponina I (74%) (Arlati et al., 2000).

La carencia de especificidad diagnóstica es debida a que los niveles séricos de mioglobina se pueden elevar en varias patologías con daño a las células musculares esqueléticas, como rabdomiolisis, cirugías, inyección intramuscular, miopatías, tras realizar ejercicio intenso, shock y convulsiones, y por varias toxinas y medicamentos (Brianzoni et al., 1981; Klocke et al., 1982; Baadsgaard y Schmidt, 1984; Vaidya, 1992; Bhayana y Henderson, 1995). Ya que es eliminado a través del riñón, los niveles séricos de mioglobina pueden estar elevados en insuficiencia renal (Varki et al., 1978; Klocke et al.,



Figura 16. Radiografía abdominal de perro con DVT, donde se aprecia una marcada dilatación gástrica.

Figura 17. Extrasístoles ventriculares derechas en el ECG del mismo perro de la imagen anterior.



1982; Vaidya, 1992; Spangenthal y Ellis, 1995). Aunque hay estudios donde observaron que la eliminación de mioglobina no se vio afectada por la tasa de filtración glomerular ni por la función renal, lo que sugiere un importante papel de la eliminación extrarrenal (hígado, bazo) (Wakabayashi et al., 1994; Lappalainen et al., 2002).

Con la introducción de ensayos de troponina más sensibles y precisos, que pueden detectar necrosis miocárdica más temprano desde la aparición de los síntomas, la medición de mioglobina ya no ofrece ninguna ventaja respecto a estos marcadores más cardioespecíficos (Eggers et al., 2004; 2005). Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la elevación de mioglobina ha demostrado tener un fuerte valor pronóstico en la aparición de efectos adversos en pacientes de alto riesgo (de Lemos et al., 2002) y de bajo riesgo (Newby et al., 2001) con síndrome coronario agudo.

3.3. Mioglobina en pequeños animales

En animales, la determinación de mioglobina no se considera clínicamente útil debido a su baja especificidad, rápida eliminación y la baja incidencia de patología isquémica en comparación con humanos. Probablemente debido a esta causa, existen pocos trabajos publicados en los que se haya determinado los valores de mioglobina sérica en medicina veterinaria.

3.3.1. Ensayos

Hasta la fecha, solamente un inmunoensayo electroquimioluminiscente “point-of-care” empleado en humanos para cuantificar la mioglobina, ha sido estudiado para medir la mioglobina en pacientes caninos (Burgener et al., 2006; Adamik et al., 2009).

3.3.2. Mioglobina en diferentes patologías

Hasta la fecha, dos trabajos han publicado valores de mioglobina en perros con dilatación-vólvulo-torsión gástrica (DVT) (Burgener et al., 2006; Adamik et al., 2009), mostrando su valor como indicador pronóstico, ya que asociaban valores elevados de mioglobina con mortalidad debido a complicaciones cardíacas derivadas de la patología. En ambos estudios se observaron valores de mioglobina elevados en el momento del ingreso y tras 48 horas en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, Adamik et al. (2009) concluyeron que el valor de mioglobina en el momento del ingreso del perro en el hospital no se podía emplear como único parámetro para predecir la supervivencia del animal.

Burgener et al., (2006) estudiaron los valores de mioglobina en perros con trauma-

tismo torácico, obteniendo valores elevados en todos los perros estudiados (n=8) en el momento de su ingreso en el hospital y tras 48 horas. Otro estudio en perros con contusión torácica inducida experimentalmente mostró, mediante técnicas de inmunohistoquímica, pérdidas aisladas de mioglobina celular y presencia en el espacio intercelular a partir de los 5 minutos tras la contusión, y depleción de mioglobina en las fibras miocárdicas en los perros muertos entre los 60-180 minutos tras el trauma, junto con focos hemorrágicos y/o necróticos, aunque en este estudio no se midieron los valores séricos de mioglobina; además, estos perros también manifestaron taquicardias ventriculares (Guan et al., 2007). Resultados similares se han encontrado en estudios inmunohistoquímicos en isquemia inducida experimentalmente en cerdos, ratas y perros (Block et al., 1983; Nomoto et al., 1987; Fujiwara et al., 1988).

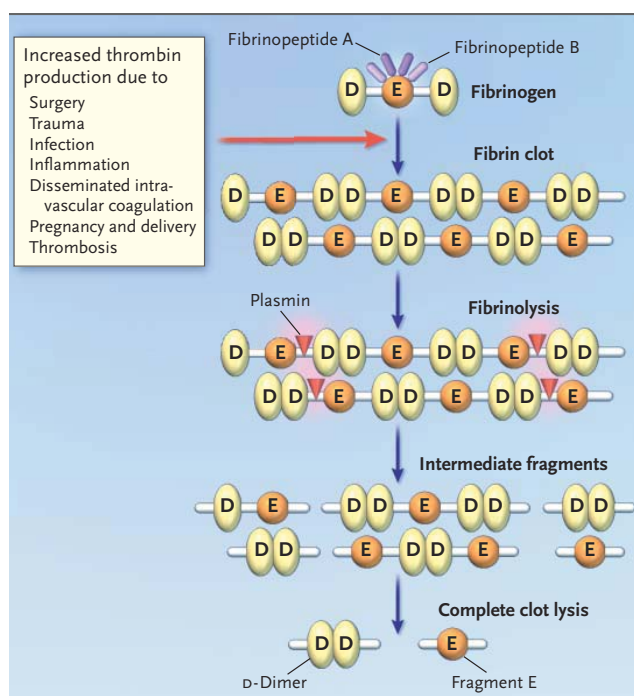


Figura 18. Esquema global de la fibrinogénesis y fibrinólisis con la formación final de dímero-D (Bockenstead, 2003).

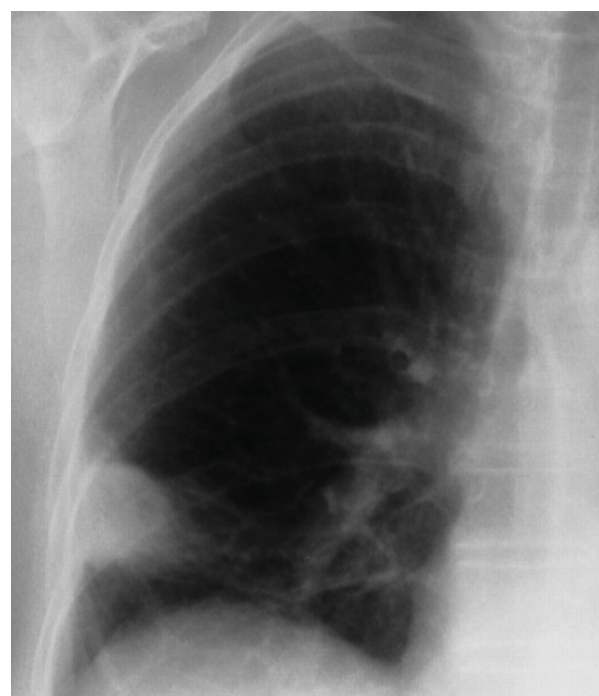


Figura 19. Radiografía posteroanterior del pulmón derecho de una mujer con embolismo pulmonar (Fuente: radiographics.rsna.org).

En un estudio experimental, se observaron valores serológicos elevados de mioglobina a los 20-40 minutos tras producir oclusión arterial en perros, con una vida media de 38 minutos (Klocke et al., 1982); mientras que otro estudio experimental en 18 perros en los que se indujo hipotensión sistémica, mostró que el análisis de la cinética de la mioglobina plasmática permite una detección temprana de la reperusión coronaria tras el daño miocárdico incluso en presencia de una importante hipotensión sistémica (Spangenthal y Ellis, 1995).

4. Dímero-D

El dímero-D es el principal producto de la degradación de la fibrina por la plasmina y es generado en el paso final de la formación de trombos. Se trata de uno de los parámetros de la hemostasia más estudiados en la última década, debido principalmente al papel que ha desarrollado en los algoritmos diagnósticos no invasivos de trombosis venosa profunda (TVP) y tromboembolismo pulmonar (TEP), dada la tendencia que se está registrando, cada vez mayor, de hacer un diagnóstico no invasivo de estas patologías, que conduce a subrayar todos los intentos encaminados a un diagnóstico más cómodo, rápido y barato.

4.1. Fisiología

Durante el proceso de activación de la coagulación, se forma trombina, la cual, además de ser un potente activador plaquetario, cataliza la transformación de fibrinógeno a fibrina y promoviendo su polimerización (Fuster et al., 1988). Por lo tanto, mediante la acción de la trombina se liberan dos pequeños péptidos (fibrinopéptidos A y B), dando lugar a los monómeros solubles de fibrina. La unión en paralelo de los dominios D y E de dos monómeros da lugar a la formación de dímeros de fibrina, que posteriormente se unen entre sí de forma no covalente formando polímeros de fibrina (Walker y Nesheim, 1999; Horan y Francis, 2001). El factor XIII, activado por la trombina, actúa sobre estos polímeros y catalizando la formación de enlaces covalentes entre los dominios D de dímeros adyacentes de fibrina, estabilizando la molécula. La molécula resultante forma el coágulo en sí (Bockenstedt, 2003).

Una vez formado dicho coágulo, comienza a actuar el sistema fibrinolítico, por medio de la plasmina, la cual lleva a cabo una escisión aleatoria de las moléculas de fibrina estabilizada a nivel de las uniones no covalentes entre los dominios D y E de los monómeros originales de fibrina (Bockenstedt, 2003), pero respetando las uniones covalentes entre los dominios D de moléculas adyacentes, obteniendo como resultado dímeros-D y fragmentos-E de fibrina (Bauer, 2002). Ambos son parte del producto final de este proceso de degradación de la fibrina estabilizada.

Por lo tanto, el dímero-D se genera exclusivamente a partir de la degradación de la fibrina estabilizada, mientras que los productos de degradación del fibrinógeno (PDFs) se originan tanto a partir de la degradación del fibrinógeno como de la fibrina no estabilizada (Aguilar, 2010). Por lo que los resultados de estos ensayos no siempre representan los mismos procesos fisiológicos o patológicos (Stokol, 2003).

El dímero-D es una molécula pequeña (182 KDa); la elevación de las concentracio-

nes serológicas se detecta aproximadamente una hora después del inicio de la formación del trombo. Los niveles de dímero-D elevados persisten unos 7 días tras el episodio tromboembólico (Meissner et al., 2000); posee una vida media de 8 horas y su vía de eliminación es principalmente renal, y en menor medida por el sistema mononuclear fagocítico (Adam et al., 2009).

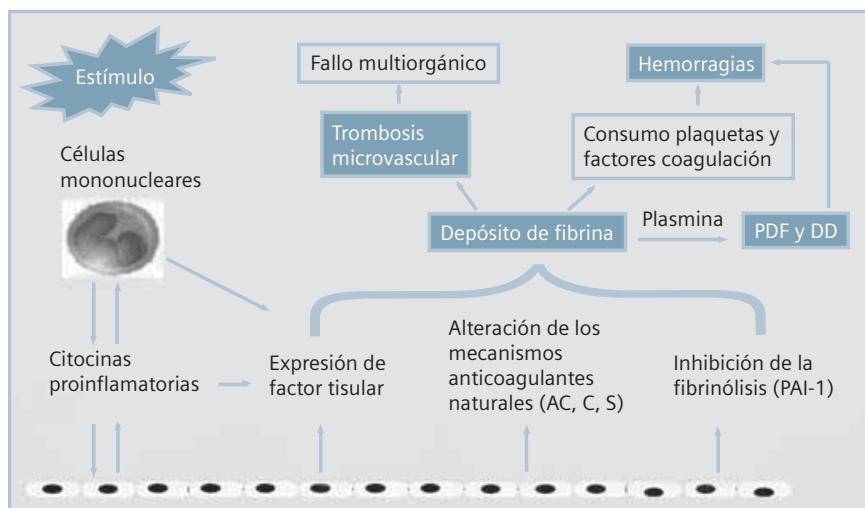


Figura 20. Fisiopatología de la CID y generación de Dímero-D (Páramo, 2010).

4.2. Dímero-D en medicina humana

El dímero-D se usa principalmente para detectar enfermedades tromboembólicas, incluyendo coagulación vascular diseminada (CID), TVP y TEP (Bick y Baker, 1992; Horan y Francis, 2001; Kelly et al., 2002).

En el manejo del TEP, la sospecha clínica y la realización de una gammagrafía pulmonar es la estrategia diagnóstica más recomendada (Goldhaber y Morpurgo, 1992; Hyers, 1995; Palla et al., 1995); sin embargo, entre el 40-60% de los casos el resultado no es concluyente (Hull et al., 1985). La angiografía permanece como el patrón de diagnóstico imprescindible en determinados pacientes (Torbicki et al., 2008), pero es costosa e invasiva, y no está exenta de riesgo (Stein et al., 1992); además, no está disponible en muchos centros de urgencias (Jurado-Gámez et al., 2000). Ante la sospecha clínica, una prueba con un elevado valor predictivo negativo tendría un gran interés para descartar esta patología y evitar pruebas innecesarias o, por el contrario, para afianzar la sospecha clínica (Anderson y Wells, 2000; Mavromatis y Kessler, 2001; Kelly et al., 2002). Muchos autores defienden el uso de dímero-D dentro de un algoritmo diagnóstico para diferenciar pacientes que necesitan someterse a más pruebas más definitivas de tromboembolismo pero invasivas (Mavromatis y Kessler, 2001; Kelly et al., 2002). Así, empleando el dímero-D se reduce el número de pruebas diagnósticas requeridas

para confirmar tromboembolismo y reduce sustancialmente los costes sanitarios (Kelly et al., 2002).

Numerosos estudios han concluido que los resultados negativos en los valores de dímero-D serológicos poseen un fuerte valor predictivo negativo para excluir estas patologías, con una sensibilidad entre 95-100% para TEP, aunque este valor varía según el método empleado (Perrier, et al., 1997; Quinn et al., 1999; Anderson y Wells, 2000; Mavromatis y Kessler, 2001; Kelly et al., 2002; Abcarian et al., 2004; Goldhaber y Bounameaux, 2012). Sin embargo, algunos autores advierten contra la sobreinterpretación de resultados negativos en casos con una elevada sospecha clínica de trombosis, ya que la obtención de valores normales de dímero-D no pueden excluir la posibilidad de tromboembolismo en todos los casos (Anderson y Wells, 2000; Abcarian et al., 2004; Breen et al., 2009).

De igual manera, para el diagnóstico del TVP, la flebografía con contraste ha sido el procedimiento diagnóstico de elección clásico, pero es una prueba invasiva y compleja desde el punto de vista técnico, que conllevaba una no despreciable morbilidad (Pearson et al., 1995; Cogo et al., 1998), y que sólo confirma la enfermedad en 10-25% de los pacientes con sospecha clínica (Heijboer et al., 1993; Wells et al., 1997), por lo que en los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias diagnósticas basadas en las escalas de predicción clínica y valores de dímero-D, reservando las pruebas de imagen para los casos seleccionados.

El valor predictivo positivo del dímero-D es muy bajo en la gran mayoría de los trabajos (24-30%) (Ginsberg et al., 1993; Goldhaber et al., 1993). Debido a su baja especificidad, un test positivo no puede ser empleado para confirmar tromboembolismo, aunque algunos autores creen que un valor de dímero-D elevado podría ser suficiente evidencia para iniciar tratamiento trombolítico, especialmente en aquellos pacientes con un índice elevado de sospecha (Kelly et al., 2002). Un dímero-D alto obliga a realizar otras técnicas diagnósticas para confirmar o excluir TEP o TVP.

Los niveles de dímero-D elevados persisten unos 7 días tras el episodio tromboembólico (Meissner et al., 2000); a partir de ahí, un resultado negativo no puede excluir la patología. La localización del trombo también influye en los valores serológicos de dímero-D, ya que se ha visto que pacientes con TVP de localización distal o TEP subsegmentarios, muestran una mayor probabilidad de presentar resultados falsamente negativos (Aguilar, 2010).

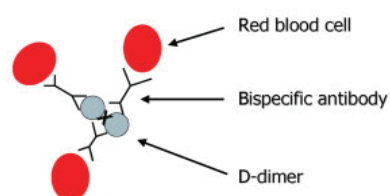
Se ha visto que los niveles de dímero-D aumentan con la edad, posiblemente por la elevada prevalencia de comorbilidades (Kelly et al., 2002; Rumley et al., 2006; Douma

et al., 2010; Tita-Nwa et al., 2010; Penaloza et al., 2012), por lo que se considera que la especificidad y utilidad clínica de la medición del dímero-D disminuyen al aumentar la edad de los pacientes.

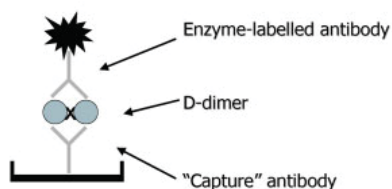
Existen numerosos procesos patológicos que no son de naturaleza trombótica que también pueden cursar con una elevación del dímero-D, como traumatismo, cirugías, neoplasias, sepsis, coagulación intravascular diseminada, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar y eventos coronarios agudos (Jafri et al., 1993; Sbarouni et al., 1994; Anderson y Wells, 2000; Horan y Francis, 2001; Cugno et al., 2004; Warwick et al., 2008; Chalmers et al., 2009; Hargett y Tapson, 2008; Ho, 2011; Kelly et al., 2002). Especialmente interesante es la elevación del dímero-D durante el embarazo, ya que se produce una activación fisiológica del sistema hemostático para preparar a la gestante para el parto, y los niveles de dímero-D sufren un incremento progresivo de lo largo de todo el embarazo (Kline et al., 2005; Jeremiah et al., 2012).

4.3. Dímero-D en pequeños animales

En perros, el dímero-D es más comúnmente usado como un test complementario para el diagnóstico de CID (Caldin et al., 1998; 2000; Stokol et al., 2000; Scott-Moncrieff et al., 2001; Griffin et al., 2003), aunque tiene un potencial para la detección de



ELISA D-dimer assay



Latex agglutination D-dimer assay

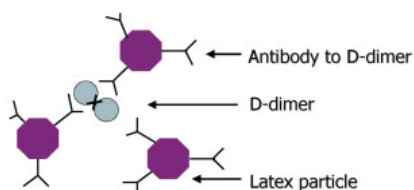


Figura 21. Determinación de dímero-D humano en un ensayo validado para su uso en perros.

Figura 22. Tipos de ensayos de determinación de Dímero-D: todos los ensayos emplean anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos específicos del fragmento Dímero-D (Bates, 2012).

tromboembolismo (Nelson y Andreasen, 2002; Griffin et al., 2003; Nelson, 2005) y para valorar el inicio de tratamiento preventivo tromboembólico o monitorizar respuesta al tratamiento (Anderson y Wells, 2000; Kelly et al., 2002).

4.3.1. Ensayos

La determinación de las concentraciones plasmáticas de dímero-D ha sido posible gracias al desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen epitopos de los fragmentos de dímero-D. Los complejos resultantes se determinan mediante técnicas de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) o técnicas de aglutinación (latex bead o ensayos inmunturbidimétricos) (Kroneman et al., 1990; Anderson y Wells, 2000; Horan y Francis, 2000), habiendo muchos kits o aparatos diferentes disponibles para su uso en humanos (Reber y DeMoerloose, 2000; Mavromatis y Kessler, 2001; Kelly et al., 2002). En general, los ensayos por ELISA y aglutinación en latex cualitativos o semicuantitativos son menos sensibles, y los ensayos cuantitativos basados en inmunturbidimetría o ELISA mediante espectrofotometría son más sensibles. Estos últimos requieren formación técnica específica y están disponibles sólo en laboratorios especializados, mientras que los primeros pueden encontrarse en kits de diagnóstico “in situ”.

Ambas técnicas han sido empleadas para la detección de dímero-D en perros (Caldin et al., 2000; Otto et al., 2000; Stokol et al., 2000; Scott-Moncrieff et al., 2001; Griffin et al., 2002; Nelson y Andreasen, 2002; 2003; Bauer et al., 2009; Boutet et al., 2009), pero no todos los kits producen reacciones cruzadas con el dímero-D canino y algunos no pueden ser empleados en esta especie (Stokol, 2003), por lo tanto todos los analizadores empleados para medir dímero-D en veterinaria deben ser previamente validados en esta especie.

Desafortunadamente, los diferentes analizadores varían enormemente debido a las diferencias en el método empleado, anticuerpos detectados y calibradores. Además, diferentes estudios han empleado varios valores de cut-off para determinar la sensibilidad y especificidad del test (Horan y Francis, 2001; Mavromatis y Kessler, 2001; Kelly et al., 2002). Por lo tanto, los resultados de los diferentes sistemas no son directamente comparables en humanos (Anderson y Wells, 2000; Reber y DeMoerloose, 2000; Horan y Francis, 2001; Mavromatis y Kessler, 2001; Kelly et al., 2002) o perros (Stokol et al., 2000; Griffin et al., 2002), lo que complica la interpretación de los resultados a la hora de seguir las diferentes publicaciones. Debido a la falta de estandarización, se recomienda que cada laboratorio siga sus propios rangos de referencia.

Actualmente, hay disponibles aparatos “in situ” (point-of-care), muchos de los cuales ya han sido evaluados para su uso en pacientes caninos (Griffin et al., 2003;

Dewhurst et al., 2008; Bauer y Moritz, 2009), así como un kit ELISA específico usando anticuerpos para dímero-D canino, aunque actualmente no está disponible en el mercado (Griffin et al., 2003). Los perros sanos generalmente presentan valores de dímero-D por debajo del límite de detección del equipo (Caldin et al., 2000; Stokol et al., 2000; Nelson y Andreasen, 2002).

4.3.2. Dímero-D en alteraciones hemostáticas

Al igual que en humanos, el dímero-D se usa principalmente para detectar enfermedades tromboembólicas, incluyendo CID y TVP o TEP en pacientes caninos (Caldin et al., 1998; 2000; Stokol et al., 2000; Nelson y Andreasen, 2002; Griffin et al., 2003). Además, al igual que sucede en humanos, las concentraciones de dímero-D se incrementan en perros con patologías no tromboembólicas, como intervenciones quirúrgicas (Nelson y Andreasen, 2002), anemia hemolítica inmuno-mediada (Scott-Moncrieff et al., 2001), cáncer, enfermedad hepática, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal (Nelson y Andreasen, 2002; Tarnow et al., 2007; Dewhurst et al., 2008; Zoia et al., 2012) o hemorragias internas (secundarias a coagulopatías, trauma o neoplasia) (Nelson y Andreasen, 2002; Griffin et al., 2003). Aunque CID podría ser una complicación en muchas de estas enfermedades, estos estudios enfatizan que aunque el dímero-D es específico de fibrinólisis, no es específico de enfermedad tromboembólica. Por lo tanto, las conclusiones son las mismas que en pacientes humanos: el dímero-D no debería ser

Systemic bacterial infections/sepsis - Gram-negative bacteria (endotoxin) - Gram-positive bacteria (bacterial coat mucopolysaccharide, enzymes) Viral diseases - Canine parvovirus - Infectious canine hepatitis - Feline panleukopenia - FIP Canine parasitic and rickettsial infections - Babesiosis (<i>Babesia canis rossi</i>) - Monocytic ehrlichiosis (<i>Ehrlichia canis</i>) and Rocky Mountain spotted fever (<i>Rickettsia rickettsii</i>) - Leishmaniasis (<i>Leishmania infantum</i>) - Spirocerosis (<i>Spirocerca lupi</i>) - Heartworm disease (<i>Dirofilaria immitis</i>) - Caval syndrome (<i>Angiostrongylus vasorum</i> and <i>Dirofilaria immitis</i>) Neoplasia - Solid tumors (e.g., mammary tumors) - Lymphoid leukemia - Myeloproliferative disorders - Lymphoma - Hemangiosarcoma (canine) - Pulmonary adenocarcinoma	Immunologic disorders - Immune-mediated hemolytic anemia - Hemolytic transfusion reaction - Transplant rejection Vascular disorders - Aortic aneurysm - Vasculitis - Hemangioma Massive tissue injury - Heatstroke and hyperthermia - Gastric dilatation-volvulus (canine) - Burns - Head trauma - Fat embolism - Surgery (especially extensive and orthopedic) - Severe mechanical trauma Reaction to toxins - Snakebite Miscellaneous - Pancreatitis - Polycythemia - Hepatic failure
--	---

Tabla 2. Listado de condiciones clínicas potencialmente asociadas a CID en pequeños animales (Bruchim et al., 2008).

usado como indicador diagnóstico único de enfermedad tromboembólica, aunque es altamente sensible con un fuerte valor predictivo negativo.

Por otro lado, y a diferencia que en los humanos, no se han evaluado posibles incrementos de dímero-D relacionados con la edad en pequeños animales.

Coagulación intravascular diseminada (CID)

CID es la patología adquirida que cursa con tromboembolismos y hemorragias más grave en el perro (Bateman et al., 1998; Goggs et al., 2009). CID es siempre consecuencia de otra enfermedad, incluyendo sepsis, neoplasia o anemia hemolítica inmunomediada. Se inicia mediante la activación de la coagulación, generalmente como consecuencia de un daño endotelial extenso y expresión de factor tisular. Esto sobrepasa los mecanismos de control y resulta en trombosis generalizada, con consecuente fibrinólisis. El consumo de plaquetas y el agotamiento de los factores de coagulación provocan hemorragias, las cuales caracterizan clínicamente este síndrome. La trombosis es una consecuencia grave de CID, porque resulta de fallo multiorgánico secundario a hipoxia e infarto. Además, la formación de productos de degradación de la fibrina (PDFs) durante la fibrinólisis contribuye a la formación de hemorragias al inhibir la polimerización de la fibrina y agregación plaquetaria (Bateman et al., 1998; Gaffney, 2001).

El diagnóstico de CID es complicado y requiere la presencia simultánea de evidencias clínicas de hemorragia o trombosis, una enfermedad inicial subyacente, y una constelación de hallazgos de laboratorio, incluyendo trombocitopenia, tiempos de protrombina o tromboplastina parcial aumentados, hipofibrinogenemia, concentraciones de antitrombina disminuidas, y niveles incrementados de PDFs (Bateman et al., 1998; Goggs et al., 2009). No existe ningún test patognomónico para CID (Bateman et al., 1998; Horan y Francis, 2001), y el diagnóstico todavía requiere la combinación de hallazgos laboratoriales y clínicos anómalos, ofreciendo el dímero-D información adicional de apoyo (Bick y Baker, 1992; Horan y Francis, 2001). La medición de PDFs se ha empleado rutinariamente en humanos y animales como un método diagnóstico auxiliar de CID. Éstos detectan productos formados vía fibrinogenolisis y/o fibrinolisis; por lo tanto, valores elevados de PDFs indica solamente la acción de la plasmina. Estudios en medicina humana y veterinaria han mostrado una sensibilidad de 72-74% y especificidad de 84% para la detección de CID (Caldin et al., 2000; Stokol, 2003). Estos resultados muestran que los PDFs podrían ser indicadores poco sensibles en el diagnóstico de CID (Nelson y Andreasen, 2003), y se ha sugerido que el dímero-D constituye un test diagnóstico de CID más sensible y específico que la determinación de PDFs (Bick y Baker, 1992; Griffin et al., 2003; Stokol et al., 2000).

Caldin et al (1997) fueron los primeros en evaluar el dímero-D para el diagnóstico de CID en perros. Empleando un método inmunturbidimétrico, compararon los resultados de dímero-D en perros sanos y perros con CID. La concentración media de dímero-D fue mayor en 71 perros con CID descompensada (determinada mediante signos clínicos y perfiles hemostáticos alterados) que en perros sanos. Empleando un cut-off de 0.25 $\mu\text{g/ml}$, el ensayo tenía un 76% y 82% de sensibilidad para el diagnóstico de CID en dos diferentes estudios (Caldin et al., 1997; 1998). Stokol et al (2000) también evaluaron este método inmunturbidimétrico y, adicionalmente, un método de aglutinación en látex para el diagnóstico de CID en 20 perros. Este estudio empleó diferentes valores de cutoff, con 0.30 $\mu\text{g/ml}$ y 0.39 $\mu\text{g/ml}$. La sensibilidad fue similar (85% para el cutoff de 0.3 $\mu\text{g/ml}$) pero más baja (65%) para el cut-off de 0.39 $\mu\text{g/ml}$ que en los estudio de Caldin et al (Caldin et al., 1997; 1998). En contraste, el método de aglutinación en látex mostró una sensibilidad 100% en la misma cohorte de perros, lo cual era significativamente mayor que la sensibilidad del método inmunturbidimétrico usando el cutoff de 0.39 $\mu\text{g/ml}$.

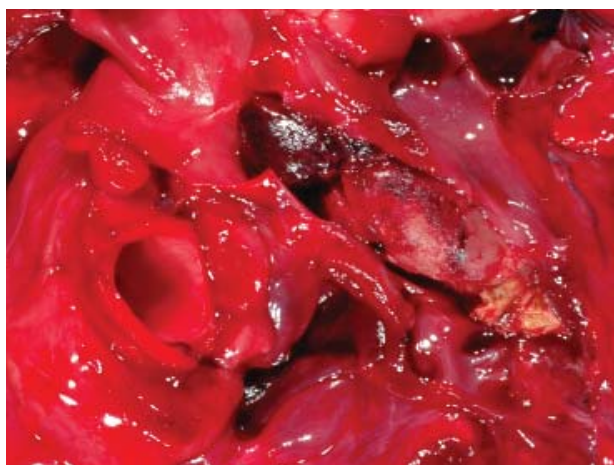


Figura 23. Tromboembolismo pulmonar en un perro con disnea aguda y cianosis.

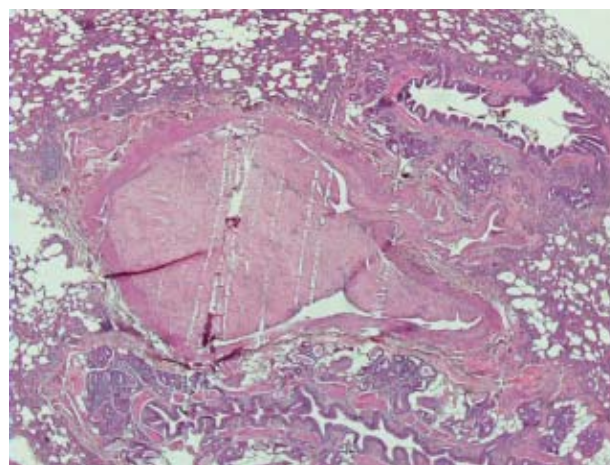


Figura 24. Imagen histológica de un tromboembolismo pulmonar canino.

Estos estudios indican que unos pocos perros clínicamente sanos pueden tener concentraciones de dímero-D ligeramente mayores que los intervalos de referencia establecidos, mientras que algunos perros con CID podrían tener concentraciones de dímero-D dentro de estos intervalos. Estos últimos perros podrían haber sufrido CID mucho menos grave, pequeños trombos (Kelly et al., 2002), o formación de fibrina o actividad fibrinolítica disminuídas (Sidelmann et al., 2000). Alternativamente, el anticuerpo anti-humano de dímero-D empleado en el ensayo inmunturbidimétrico podría no tener reactividad cruzada óptima con el dímero-D canino. La especificidad del dímero-D fue elevada (97% para la aglutinación de látex y método inmunturbidimétrico empleados a 0.39 $\mu\text{g/ml}$) en perros sanos (Stokol et al., 2000).

Otros estudios han publicado sensibilidad y especificidad de 93% y 30% respectivamente, empleando un método inmunturbidimétrico con un cutoff de 0.1 µg/ml (Lanevski-Pietersma et al., 2003), y 94.8% y 92.8% con un método de aglutinación en látex, sin especificar el cutoff empleado (Hirschberger et al., 2004). Dewhurst et al. (2008) publicaron una sensibilidad de 87% y especificidad de 26% empleando un método inmunométrico, con un cutoff de 0.5 µg/ml en un estudio con perros sanos, perros con evidencias de CID o tromboembolismo, y perros enfermos pero sin evidencia de CID o alteraciones tromboembólicas.

La especificidad del test es probablemente más baja cuando se evalúan los pacientes clínicamente enfermos. Caldin et al (1998) comunicaron que el dímero-D obtuvo una especificidad de 95% comparando perros con CID (n=102) con aquellos con otras enfermedades pero sin evidencia de CID (n=76). De manera similar, en un estudio preliminar, Nelson y Andreasen (2002) mostraron que las concentraciones de dímero-D por aglutinación en látex fueron mayores en perros tras cirugías o con una serie de enfermedades, incluyendo neoplasia, insuficiencia renal o cardíaca, y enfermedad hepática. Las concentraciones de dímero-D fueron particularmente elevadas en perros con evidencias clínicas de hemorragias internas. Muchos de estos perros padecían enfermedades que podrían inducir CID, y no se especificó el número de perros en cada categoría de enfermedad con potencial complicación por DIC. Sin embargo, este estudio ilustra que concentraciones aumentadas de dímero-D no son específicas de CID. Scott-Moncrieff et al (2001) emplearon dímero-D como un test diagnóstico secundario para evaluar la función hemostática en 20 perros con anemia hemolítica inmunomediada. El dímero-D estaba incrementado en el 80% de estos perros. Estos valores, junto con los resultados de otros tests de coagulación, se emplearon como una evidencia de apoyo para la incidencia de CID en esos perros.

El dímero-D parece ser un test sensible para CID y es probablemente superior a los tradicionales ensayos de PDFs séricos para este propósito. Por desgracia, el dímero-D no es específico de esta patología, por lo que nunca debe emplearse como método diagnóstico único. Debe ser considerado un test diagnóstico de soporte, dependiendo el diagnóstico de éste basándose en los hallazgos clínicos y anomalías hemostáticas (Bateman et al., 1998; Horan y Francis, 2001). Un estudio reciente evaluó los valores de dímero-D en la detección temprana de DIC en perros en riesgo (Machida et al., 2010) con prometedores resultados, pero todavía faltan estudios que evalúen su utilidad para diagnosticar patologías en fases más tempranas y en animales de riesgo, y monitorizar o confirmar la resolución de la enfermedad. Por otro lado, parece ser que los ensayos de dímero-D no son útiles para el diagnóstico de CID en la especie felina (Brazzell et al., 2007) o poseen un valor limitado (Tholen et al., 2009).

Tromboembolismo

En perros y gatos el tromboembolismo está asociado a una multitud de enfermedades y es una complicación de ciertas enfermedades grave y potencialmente letal (Keyes et al., 1993; Johnson et al., 1999; Goggs et al., 2009). El tromboembolismo no es frecuente en estas especies y su incidencia real es desconocida (Keyes et al., 1993; Palmer et al., 1998; Johnson et al., 1999; Boswood et al., 2000). Un estudio retrospectivo de 10 años en un hospital veterinario de referencia sugirió que la prevalencia de TEP en perros fue del 0.9% (Johnson et al., 1999).

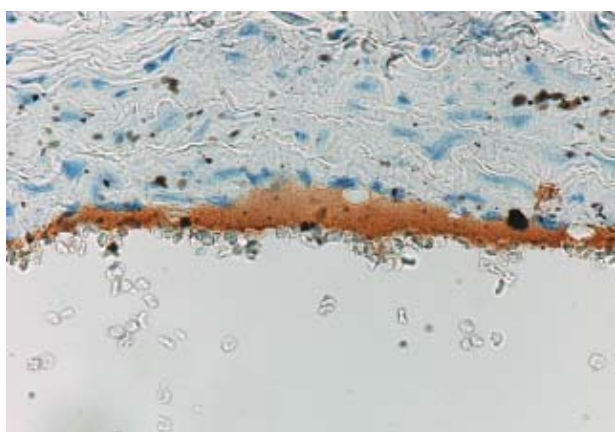


Figura 25. Depósitos de dímero-D en pared arterial de un perro con tromboembolismos, visible mediante técnicas de inmunohistoquímica (x40).

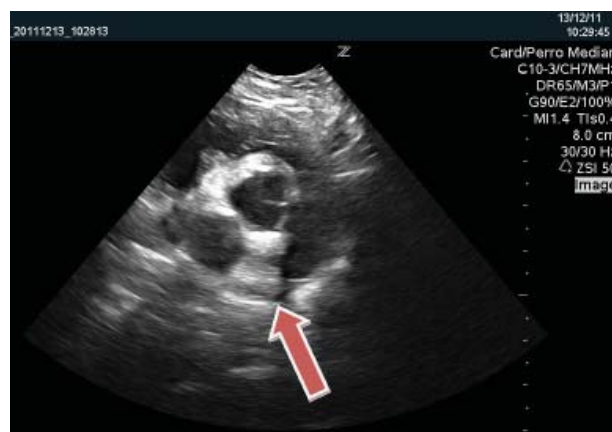


Figura 26. Ecocardiografía en corte parasternal derecho donde se aprecia un trombo en el tracto de salida de la arteria pulmonar de un perro con disnea.

Sin embargo, probablemente la incidencia real sea superior, ya que el TEP es difícil de diagnosticar antemortem, porque pruebas de diagnóstico definitivo, como escintigrafía pulmonar o arteriografía, no están disponibles actualmente en medicina veterinaria (Keyes et al., 1993; Goggs et al., 2009), mientras que los signos clínicos son altamente variables, inconsistentes y poco específicos, complicándose con la presencia de signos clínicos propios de las enfermedades subyacentes (Nelson, 2005; Goggs et al., 2009). En un estudio, el 60% de los casos de tromboembolismo diagnosticados, sufrían nefropatía con pérdidas de proteínas o neoplasia y valores elevados de dímero-D (Nelson y Andreasen, 2003; Donahue et al., 2011). Un estudio reciente evaluó los valores de dímero-D para detectar trombosis de los vasos cutáneos y necrosis de la piel en perros con vasculitis cutánea (Rosser, 2009).

Por otro lado, el diagnóstico post-mortem no está exento de complicaciones; según las observaciones de un estudio experimental, el 50% de los trombos se lisaban durante las 3 primeras horas post-mortem (Moser et al., 1973). Los trombos en perros se lisan mucho más rápidamente que en humanos debido a una mayor actividad del activador de plasminógeno, mayor lisis plaquetaria y secreción de activador del plasminógeno por el

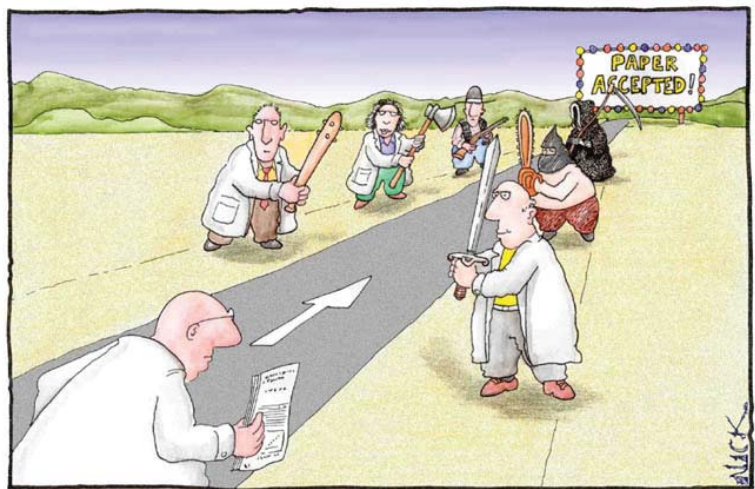
endotelio pulmonar (Lang et al., 1993). Además, la detección de los trombos no siempre es posible, dependiendo de su localización.

Algunos estudios han evaluado diferentes ensayos para identificar procesos tromboembólicos en perros, obteniendo una sensibilidad de 100% y especificidad de 70% con un método de aglutinación en latex (Nelson y Andrease, 2003) y sensibilidad de 87% y especificidad de 26% empleando un método inmunométrico (Dewhurst et al., 2008) ambos con un cutoff de 0.5 µg/ml.

El dímero-D tiene el potencial de ser útil para la detección antemortem de TEP en pacientes caninos. Un estudio experimental en perros demostró que tras la inducción de TEP, los niveles de dímero-D estaban incrementados significativamente a los 30 minutos post-embolización, alcanzaron su punto más alto a las 2 horas post-embolización y permanecieron significativamente elevados durante 24 horas (Ben et al., 2007). Los niveles de dímero-D están ciertamente elevados en perros con evidencias clínicas de tromboembolismo (Griffin et al., 2002; Nelson y Andreasen, 2002; 2003); en el estudio de Nelson y Andreasen (2002), la enfermedad tromboembólica estaba asociada a los valores de dímero-D más elevados comparados con otras condiciones, incluyendo enfermedad hepática y neoplasia. El resultado de éste y otros estudios plantean la posibilidad de que el grado de incremento en el dímero-D dé mayor información diagnóstica, con valores más elevados siendo más indicativos de tromboembolismo, especialmente si se pueden excluir hemorragias internas en la evaluación clínica. Sin embargo, no hay que olvidar que, al igual que en humanos, perros con TEP crónico pueden presentar valores normales de dímero-D (Griffin et al., 2003).

IV

ARTÍCULOS



Most scientists regarded the new streamlined peer-review process as 'quite an improvement.'

“Nothing shocks me, I am a scientist”.

(Dr HW Indiana Jones, Indiana Jones and the Temple of Doom)

Artículos

1. Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A., 2011. ***Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels.** *Vet Parasitol.* 176:313-316.
2. Carretón, E., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., Simón, F., Passeri, B., Cantoni, A.M., Kramer, L., 2013. **D-dimer deposits in lungs and kidneys suggest its use as a marker in the clinical workup of dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease.** *Vet Parasitol.* 191:182-186.
3. Carretón, E., Morchón, R., González-Miguel, J., Simón, F., Juste, M.C., Montoya-Alonso, J.A., 2013. **Variation of d-dimer values as assessment of pulmonary thromboembolism during adulticide treatment of heartworm disease in dogs.** *Vet Parasitol.* doi:pii: S0304-4017(13)00030-7. 10.1016/j.vetpar.2013.01.005.
4. Carretón, E., Grandi, G., Morchón, R., Simón, F., Passeri, B., Cantoni, A.M., Kramer, L., Montoya-Alonso, J.A., 2012. **Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs.** *Vet Parasitol.* 189:390-393.
5. Carretón, E., Morchón, R., González-Miguel, J., Juste, M.C., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. **Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs.** *Vet Parasitol.* (aceptado con revisiones menores 26/03/2013).



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar*Dirofilaria immitis* infection in dogs: Cardiopulmonary biomarker levelsE. Carretón^{a,*}, J.A. Corbera^a, M.C. Juste^a, R. Morchón^b, F. Simón^b, J.A. Montoya-Alonso^a^a Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas (Las Palmas), Spain^b Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Dirofilaria immitis

Cardiac troponin T

Cardiac troponin I

Myoglobin

D-dimer

Cardiopulmonary biomarkers

ABSTRACT

Cardiopulmonary biomarkers are biological parameters that can be objectively measured and quantified as indicators of pathogenic processes (heartworm disease) or as indicators of response to therapeutic intervention. To determine levels of cardiopulmonary biomarkers in canine dirofilariasis, measurements of cardiac troponin T, cardiac troponin I, myoglobin, and D-dimer concentrations were performed for dogs with and without evidence of adult heartworm infection. The results showed that levels of cardiac troponin T were undetectable in all dogs studied while levels of cardiac troponin I were higher in dogs infected with *Dirofilaria immitis*. In healthy dogs, levels of myoglobin and D-dimer were below detection limits of the instrument and were significantly higher in heartworm-infected dogs, notably in microfilaremic dogs. The results suggest the possibility of using troponin I and myoglobin as markers for cardiac damage and the D-dimer as a supportive tool for a diagnosis of pulmonary thromboembolism in dogs with cardiopulmonary dirofilariasis.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Heartworm disease, caused by the filarial nematode *Dirofilaria immitis*, is increasingly diagnosed in temperate and tropical areas of the world (Genchi et al., 2007). The pathophysiologic response to heartworm infection is mainly due to the presence of adult worms in the pulmonary arteries. Intimal proliferation occurs in arteries occupied by living worms, while embolic fragments trigger thrombosis. Both these effects lead to pulmonary hypertension, which is one of the most important causes of clinical signs in heartworm disease. Thrombosis and thromboembolism may compromise the pulmonary circulation further. Severe pulmonary hypertension, if not treated, may progress to congestive heart failure (McCall et al., 2008).

Cardiopulmonary biomarkers are biological parameters that can be objectively measured and quantified as indicators

of pathogenic processes like heartworm disease, or as responses to therapeutic interventions (Singh et al., 2010). The use of these biomarkers is a regular practice in human medicine for detection and prognosis of cardiovascular diseases. In veterinary medicine, these markers allow early detection of cardiopulmonary diseases, confirm doubtful cases and processes, and contribute to the establishment of prognosis and the decision on a specific treatment (Morrow and de Lemos, 2007; Boswood, 2009). Troponin T and troponin I are cardiac-specific isoforms of troponin, a striated muscle-structural protein (O'Brien, 2008), released into the circulation when the cardiac myocytes are damaged by necrosis or ischemia. Because troponin T and troponin I can be measured in plasma, both enzymes are used as an indicator of myocardial damage (Boswood, 2009). Myoglobin is an oxygen-binding protein found in skeletal and heart muscle. Cell injury caused by inadequate tissue perfusion or trauma may lead to the release of myoglobin into blood stream. In human medicine, it is used as an early diagnostic tool for acute myocardial infarction (Collinson et al., 2003). During the process of clot formation, thrombin cleaves fibrinogen to form soluble fibrin monomers that become

* Corresponding author. Tel.: +34 928 457426; fax: +34 928 451114.
E-mail address: ecarreton@becarios.ulpgc.es (E. Carretón).

insoluble when factor XIII cross-links these monomers. Insoluble fibrin is cleaved by plasmin, producing different oligomers, one of them being the D-dimer (Goggs et al., 2009). Thus, increased concentrations of D-dimer in plasma is a marker of fibrinolysis, and consequently, of clot formation.

The aim of the present study was to determine the levels of troponin T, troponin I, myoglobin, and D-dimer in dogs with and without adult heartworm infection to determine their application as biomarkers of the damage caused by *D. immitis*.

2. Materials and methods

2.1. Sample and sampling procedure

Cardiac troponin T, cardiac troponin I, myoglobin, and D-dimer were measured in 88 client-owned dogs brought to the Veterinary Medicine Service of Las Palmas de Gran Canaria University. Their clinical status in relation to heartworm disease was assessed using a commercial ELISA test kit to detect circulating antigens (PetChek1 HW PF, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) according to manufacturer instructions. Dogs positive for circulating adult heartworm antigen were further evaluated for the presence or absence of microfilariae using a modified Knott test. Dogs were separated into three groups based on adult heartworm antigen status, clinical signs, and the presence or absence of circulating microfilariae. Group 1 comprised 13 clinically healthy dogs 1–10 years old (mean 4.8 years); six dogs were females and seven were males. All were negative for circulating *D. immitis* antigen, had no circulating microfilariae, and had no obvious signs of heartworm infection. Group 2 consisted of 21 amicrofilaremic dogs 2–14 years of age (mean 4.9 years) that were positive for circulating *D. immitis* antigens; 10 were females and 11 were males. Group 3 comprised 50 microfilaremic dogs 1–14 years old (mean 5.1 years) that were positive for circulating *D. immitis* antigen; 27 were females and 23 males.

The study <0.1 ng/ml and <74 ng/ml, was approved by the ethical committee of Veterinary Medicine Service of Las Palmas de Gran Canaria University and was carried out in accordance with the current European legislation on animal protection.

2.2. Biomarker tests

Blood samples were drawn from the cephalic vein of each animal on sampling days. Measurement of circulating troponin T, myoglobin and D-dimer was performed using heparinized blood, within 4 h of venipuncture, using specific CARDIAC T Quantitative®, CARDIAC M® and CARDIAC D-Dimer® immunoassay system (Cardiac Reader® system, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) respectively, according to manufacturer instructions. The measuring range was 0.1–2 ng/ml for troponin T, 30–700 ng/ml for myoglobin, and 0.1–4 µg/ml for D-dimer. Values below and above these ranges were displayed as negative and high, respectively. Reference ranges of troponin T and myoglobin in healthy dogs on Cardiac Reader were established as <0.1 ng/ml and <74 ng/ml, respectively (Burgener et al.,

2006). A range of D-dimer concentration on Cardiac Reader in clinically healthy dogs in <0.2 µg/ml was established, based on reference ranges reported in a previous study (Bauer and Moritz, 2009).

Measurement of circulating troponin I was performed within 4 h using the test Troponina I Easy Reader® (Geron Laboratories; Germany) and was processed using Vedalab Easy Reader® (Veda.Lab diagnostics; Alençon, France) according to manufacturer instructions. Reference ranges for this assay were established using values of the healthy dogs included in the study; reference ranges vary widely based upon the equipment used making comparison of absolute values obtained from different equipment of little clinical utility (Adin et al., 2006; Wells and Sleeper, 2008).

2.3. Statistical analysis

The SPSS statistical package (version 17.0 for Windows) was used for all data analyses. Descriptive analyses of the variables were carried out using the test of proportions for qualitative variables and measurements of central tendency (mean), measures of dispersion (standard deviation; SD) for quantitative variables. The comparisons of absolute means between groups were made using the Student's *t* test for normally distributed variables. Bivariate analyses of proportionality of distribution of categorical variables were estimated using the χ^2 test. A *P* value <0.05 was determined as indicating significance.

3. Results

Levels of cardiac troponin T levels in all dogs (*n* = 71) were below the detection limit (<0.1 ng/ml) of the instrumentation used (Table 1).

In group 1 (healthy dogs without heartworm disease; *n* = 8), cardiac troponin I levels were between 0.33 and 1.18 ng/ml. Dogs in group 2 (positive for *D. immitis* antigen and amicrofilaremic; *n* = 14) had cardiac troponin I values ranging from 0.44 to 3.26 ng/ml (Table 1). Values in group 3 dogs (positive for *D. immitis* antigen and microfilariae; *n* = 16) ranged from 0.67 to 1.97 ng/ml. The values for group 1 were significantly lower than those of both groups 2 and 3 (*P* < 0.05). No statistically significant differences were found between the values for groups 2 and 3 (both of which had dogs that were positive for circulating heartworm antigen).

Myoglobin levels were under 30 ng/ml for all dogs tested in group 1 (*n* = 9). Elevated circulating myoglobin values (>74 ng/ml) were found in 18.8% and 23.9% of the dogs in groups 2 (*n* = 16) and 3 (*n* = 46), respectively (Table 1).

Statistically significant differences (*P* < 0.01) were found between the mean myoglobin value for dogs from group 1 versus the mean for the dogs in groups 2 and 3 that had elevated myoglobin values (Table 1). There was also a significant difference (*P* < 0.01) between mean the myoglobin value in dogs in group 2 (amicrofilaremic) versus the mean for group 3 (microfilaremic).

D-dimer values were below the detection limit of the instrument (<0.1 ng/ml) in all dogs tested in group 1 (*n* = 9).

Table 1

Mean values for cardiopulmonary biomarkers studied for groups of dogs with and without heartworm infection.

Cardiopulmonary markers	Group 1 (n = 13)	Group 2 (n = 21)	Group 3 (n = 54)
Cardiac troponin T	<0.1 ng/ml (n = 9)	<0.1 ng/ml (n = 16)	<0.1 ng/ml (n = 46)
Cardiac troponin I	0.9 ± 0.3 ng/ml (n = 8)	1.23 ± 0.8 ng/ml ^a (n = 14)	1.2 ± 0.4 ng/ml ^a (n = 16)
Myoglobin	<30 ng/ml (n = 9)	93 ± 18 ng/ml ^a (n = 3)	273 ± 24 ng/ml ^{a,†} (n = 11)
D-dimer	<0.1 µg/ml (n = 9)	0.39 ± 0.1 µg/ml ^{b,**} (n = 7)	0.63 ± 0.2 µg/ml ^{b,**,†} (n = 22)

Data are shown as the mean or the mean ± standard deviation.

Group 1: Healthy dogs without heartworm disease; Group 2: *D. immitis*-Ag+ and amicrofilaremic; Group 3: *D. immitis*-Ag+ and microfilaremic.^a Includes only dogs with elevated values of myoglobin (>74 ng/ml).^b Includes only dogs with elevated values of D-dimer (>0.2 µg/ml).^{*} Significantly greater than Group 1 ($P < 0.05$).^{**} Significantly greater than Group 1 ($P < 0.01$).[†] Significantly greater than Group 2 ($P < 0.01$).

Elevated D-dimer levels (>0.2 µg/ml) were detected in 44% of the dogs tested in group 2 (n = 16) and 48% of group 3 (n = 46) (Table 1). Statistically significant differences ($P < 0.01$) were found between mean D-dimer value for group 1 and the mean values for dogs in groups 2 and 3 with elevated levels. Statistically significant differences ($P < 0.01$) were also found between mean D-dimer value for dogs with elevated levels in group 2 versus that in group 3.

4. Discussion

Cardiopulmonary biomarkers are biological parameters that can be measured objectively and be used as indicators of pathogenic processes or as a response to therapeutic interventions (Singh et al., 2010). Several cardiac biomarkers have been used in veterinary medicine for diagnosing and assessing the extent and severity of cardiopulmonary disease (Nelson and Andreasen, 2003; Boswood, 2009). In heartworm disease, primary lesions occur in pulmonary arteries and lung parenchyma, causing pulmonary hypertension that can progress to congestive heart failure (McCall et al., 2008). In the present study, we measured levels of troponin T, troponin I, and myoglobin as indicative of the myocardial damage and D-dimer levels as a marker of thrombolysis in dogs infested with *D. immitis*.

There are several studies that demonstrate the utility of both troponin T (DeFrancesco et al., 2002; Tarducci et al., 2004; Burgener et al., 2006; Linklater et al., 2007; Bakirel and Gunes, 2009), and troponin I (Oyama and Sisson, 2004; Burgener et al., 2006; O'Brien, 2008; Bakirel and Gunes, 2009) in the evaluation of myocardial damage in different pathologies, as the slightest increase in serum levels indicates a pathological change. In the current study, values of troponin T were below limits of detection both in animals with heartworm disease and healthy control subjects. This result is similar to that found in previous studies in dogs positive for circulating heartworm antigen (Sribhen et al., 1999). However, levels of troponin I were slightly higher in the antigen positive animals both with and without circulating microfilariae in comparison with the control group. This may indicate the presence of myocardial damage in dogs positive for heartworm antigen.

Several studies suggest that troponin I is a more sensitive and specific marker than troponin T for the detection of

minor cardiac damage (Hamm et al., 1997; Burgener et al., 2006). This could be due to the difference in size of the troponin I molecule in comparison with that of troponin T, the former being smaller, and therefore, less severe cardiac damage may allow leakage to occur (Linklater et al., 2007).

Although levels of troponin I can rise in non-cardiac pathologies, such as renal failure (Porciello et al., 2008; Sharkey et al., 2009), the dogs in our study did not show any evidence of concomitant renal pathology, and we therefore attribute the differences found between the healthy control animals and the dogs with heartworm disease to the presence of *D. immitis*.

In human medicine, myoglobin is used as an early indicator of acute myocardial infarction. The highest serum levels occur several hours before other cardio-specific biomarkers, allowing a more rapid diagnosis and prognosis (Collinson et al., 2003). Myoglobin may come from both cardiac and skeletal muscle. Detection of elevated plasma myoglobin in dogs is not considered clinically useful due to its low specificity, rapid elimination, and the low incidence of ischemic cardiac disease levels in dogs compared with humans. This is why an increase in myoglobin plasma values is not specific for cardiac damage in the dog. In our study, the concentrations of myoglobin in dogs infested with *D. immitis* were elevated in 23% of the dogs, notably in dogs with microfilaremia. There are several studies that show elevated levels of myoglobin in dogs with cardiac damage in a range of pathologies, such as gastric dilatation-volvulus, blunt chest trauma, and systemic hypotension (Spangenthal and Ellis, 1995; Burgener et al., 2006; Adamik et al., 2009); however, there are no published data on dogs with cardiopulmonary dirofilariasis. Therefore, we cannot confirm whether the origin of these levels of myoglobin is cardiac or skeletal. Further studies would need to be carried out to make this determination.

The D-dimer is a fibrin degradation product. High plasma concentrations may indicate the presence of thrombi and their degradation. In 47% of dogs positive for *D. immitis* antigen, D-dimer were above the normal range, most notably in microfilaremic dogs. Moreover, these dogs had higher average values than amicrofilaremic dogs that were positive for heartworm antigen. Other studies have demonstrated elevated values of D-dimer in dogs with clinical evidence of thromboembolism (Griffin et al., 2003; Nelson and Andreasen, 2003; Stokol, 2003). In our

study, these elevated values may have been due to the thromboembolic complications caused by the *D. immitis* infection. Pulmonary thromboembolism is a common complication in animals infected with *D. immitis*, due to the presence of dead worms and fragments of diseased vascular intima (Adcock, 1961; Rawlings, 1986; Knight, 1987; Atwell et al., 1988). The presence of microfilaremia seems to increase D-dimer values, suggesting that the presence of microfilariae could increase the tendency to develop pulmonary thromboembolism.

In conclusion, these preliminary data suggest the possibility of using troponin I and myoglobin as markers for cardiac damage and D-dimer as a marker supportive for thromboembolism in dogs with cardiopulmonary dirofilariasis. However, more studies should be carried out to obtain more reliable data on the marking capacity of these molecules.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was partially supported by Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información, Gobierno de Canarias, Spain (co-financed by FEDER funds) (grant C20080100093) and by Junta de Castilla y León, Spain (grant SA090/A09).

References

- Adamik, K.N., Burgener, I.A., Kovacevic, A., Schulze, S.P., Kohn, B., 2009. Myoglobin as a prognostic indicator for outcome in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 19, 247–253.
- Adcock, J.L., 1961. Pulmonary arterial lesions in canine dirofilariasis. *Am. J. Vet. Res.* 22, 655–662.
- Adin, D.B., Oyama, M.A., Sleeper, M.M., Milner, R.J., 2006. Comparison of canine cardiac troponin I concentrations as determined by 3 analyzers. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 1136–1142.
- Atwell, R.B., Sutton, R.H., Moodie, F.W., 1988. Pulmonary changes associated with dead filariae (*Dirofilaria immitis*) and concurrent antigenic exposure in dogs. *J. Comp. Pathol.* 98, 349–361.
- Bakirel, U., Gunes, S., 2009. Value of cardiac markers in dogs with chronic mitral valve disease. *Acta Vet.-Beograd.* 59, 223–229.
- Bauer, N., Moritz, A., 2009. Evaluation of the Cardiac reader (R) as a point-of-care instrument for measurement of fibrin D-dimers in dogs. *Tierärztl. Prax.* 37, 319–325.
- Boswood, A., 2009. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. *J. Vet. Cardiol.* 11 (Suppl 1), S23–S32.
- Burgener, I.A., Kovacevic, A., Mauldin, G.N., Lombard, C.W., 2006. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 277–283.
- Collinson, P.O., Stubbs, P.J., Kessler, A.C., 2003. Multicentre evaluation of the diagnostic value of cardiac troponin T CK-MB mass, and myoglobin for assessing patients with suspected acute coronary syndromes in routine clinical practice. *Heart* 89, 280–286.
- DeFrancesco, T.C., Atkins, C.E., Keene, B.W., Coats, J.R., Hauck, M.L., 2002. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin T in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. *J. Vet. Intern. Med.* 16, 553–557.
- Genchi, C., Guerrero, J., McCall, J.W., Venco, L., 2007. Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infections in dogs and cats, in: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in Dog and Cat and Human Infections, Rolando Editore, Italy, pp. 145–162.
- Goggs, R., Benigni, L., Fuentes, V.L., Chan, D.L., 2009. Pulmonary thromboembolism. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 19, 30–52.
- Griffin, A., Callan, M.B., Shofer, F.S., Giger, U., 2003. Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. *Am. J. Vet. Res.* 64, 1562–1569.
- Hamm, C.W., Goldmann, B.U., Heeschen, C., Kreymann, G., Berger, J., Meinerz, T., 1997. Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I. *N. Engl. J. Med.* 337, 1648–1653.
- Knight, D.H., 1987. Heartworm infection. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 17, 1463–1518.
- Linklater, A.K.J., Lichtenberger, M.K., Thamm, D.H., Tilley, L., Kirby, R., 2007. Serum concentrations of cardiac troponin I and cardiac troponin T in dogs with class IV congestive heart failure due to mitral valve disease. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 17, 243–249.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* 66, 193–285.
- Morrow, D.A., de Lemos, J.A., 2007. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation* 115, 949–952.
- Nelson, O.L., Andreasen, C., 2003. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 830–834.
- O'Brien, P.J., 2008. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 245, 206–218.
- Oyama, M.A., Sisson, D.D., 2004. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 831–839.
- Porciello, F., Rishniw, M., Herndon, W.E., Birettoni, F., Antognoni, M.T., Simpson, K.W., 2008. Cardiac troponin I is elevated in dogs and cats with azotaemia renal failure and in dogs with non-cardiac systemic disease. *Aust. Vet. J.* 86, 390–394.
- Rawlings, C.A. (Ed.), 1986. *Heartworm Disease in Dogs and Cats*. WB Saunders Co, Philadelphia, USA.
- Sharkey, L.C., Berzina, I., Ferasin, L., Tobias, A.H., Lulich, J.P., Hegstad-Davies, R.L., 2009. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in dogs with renal failure. *JAVMA* 234, 767–770.
- Singh, V., Martinezclark, P., Pascual, M., Shaw, E.S., O'Neill, W.W., 2010. Cardiac biomarkers – the old and the new: a review. *Coron. Artery Dis.* 21, 244–256.
- Spangenthal, E.J., Ellis, A.K., 1995. Cardiac and skeletal muscle myoglobin release after reperfusion of injured myocardium in dogs with systemic hypotension. *Circulation* 91, 2635–2641.
- Sribhen, C., Kasemsant, N., Kaewmukul, S., Sribhen, K., 1999. Blood chemistry profile and cardiac Troponin T concentration in Thai stray dogs infected with heartworms. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 33, 251–257.
- Stokol, T., 2003. Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 1419–1435.
- Tarducci, A., Abate, O., Borgarelli, M., Borrelli, A., Zanatta, R., Cagnasso, A., 2004. Serum values of cardiac troponin-T in normal and cardiomyopathic dogs. *Vet. Res. Commun.* 28 (Suppl 1), 385–388.
- Wells, S.M., Sleeper, M.M., 2008. Cardiac troponins. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 18, 235–245.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

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



Short communication

D-dimer deposits in lungs and kidneys suggest its use as a marker in the clinical workup of dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease

E. Carretón^{a,*}, J. González-Miguel^b, J.A. Montoya-Alonso^a, R. Morchón^b, F. Simón^b, B. Passeri^c, A.M. Cantoni^c, L. Kramer^c

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

^b Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy and Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

^c Department of Animal Health, University of Parma, 43100 Parma, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 July 2012

Received in revised form 11 August 2012

Accepted 13 August 2012

Keywords:

Dirofilaria immitis

Thromboembolism

D-dimer

Lung

Kidney

Immunohistochemistry

ABSTRACT

It has been reported that dogs with heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) show increased plasma levels of D-dimer, a fibrin degradation product present in the blood after a blood clot is degraded by fibrinolysis. In the present study the authors show that, in dogs with both experimental and natural infections with *D. immitis*, D-dimer deposits in lungs and kidneys are associated with pulmonary thromboembolism and microfilariaemic status, as well as there was a clear association between increased plasma values of D-dimer and positive staining in immunohistochemistry. Results suggest that the monitoring of D-dimer levels in infected dogs could be useful in evaluating the presence of pulmonary thromboembolism in the lungs and that microfilariae may induce microthrombosis in kidneys, thus contributing to renal pathology.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Canine heartworm disease (CHWD) is caused by the filarial nematode *Dirofilaria immitis* that resides in the pulmonary arteries, and occasionally right heart chambers, of dogs, cats, ferrets and wild canids. Infection is characterized by endothelial proliferation, perivascular inflammation and thrombo-embolism, all leading to chronic pulmonary hypertension and right-side congestive heart disease (Simón et al., 2012). Although the exact incidence of pulmonary thromboembolism in these animals is unknown, it is thought that it is a substantial complication in infected animals and in animals under adulticide treatment. D-dimer is a fibrin degradation product present

in the blood after a blood clot is degraded by fibrinolysis. During the process of clot formation, thrombin cleaves fibrinogen to form soluble fibrin monomers that become insoluble when factor XIII cross-links these monomers. Insoluble fibrin is cleaved by plasmin, producing different oligomers, one of them being the D-dimer (Goggs et al., 2009). Thus, increased concentrations of D-dimer in plasma is a marker of fibrinolysis, and consequently, of clot formation.

Several studies have documented that increased plasma D-dimer concentrations can be useful in the identification of dogs with thromboembolic disease and disseminated intravascular coagulation, suggesting that early recognition of these conditions in critically ill dogs followed by instigation of antithrombotic therapy may help in the reduction of mortality (Nelson and Andreasen, 2003; Stokol, 2003; Dewhurst et al., 2008). Carretón et al. (2011) recently reported that levels of D-dimer were significantly

* Corresponding author. Tel.: +34 636024279; fax: +34 928451114.
E-mail address: ecarreton@becarios.ulpgc.es (E. Carretón).

higher in heartworm-infected dogs, when compared to non-infected dogs. The authors thus suggested that D-dimer could be used as a supportive tool for diagnosis of pulmonary thromboembolism in dogs with heartworm disease. Furthermore, it was shown that plasma levels of D-dimer were particularly high in dogs with circulating microfilariae, suggesting that thrombosis may also be due to the presence of first stage larvae in tissues where they have been shown to deposit, for example in the kidneys. The aim of the present immunohistochemical study, using a specific monoclonal antibody against D-dimer, was therefore to evaluate the presence of D-dimer in lung and kidney tissue of experimentally and naturally infected dogs.

2. Materials and methods

2.1. Animals

2.1.1. Experimentally infected dogs

Tissue samples from a total of 20 young adult beagles (male and female) from a previous study (Kramer et al., 2008) were used in this study. The dogs were born and raised in a mosquito-proof environment and did not have any prior exposure to natural infection with *D. immitis*. Adult heartworms were harvested from a donor dog approximately 8 months after infection; seven male and nine female heartworms were introduced by intravenous (IV) transplantation into each study dog. Approximately 6 weeks later (day 0), the dogs were ranked within gender by microfilarial count and randomly allocated to two groups of ten dogs each. Dogs in Group 1 served as microfilariaemic control dogs. The dogs in Group 2 served as infected dogs, treated with doxycycline (10 mg/kg/day, orally from weeks 0–6, 10–12, 16–18, 22–26, and 28–34) or doxycycline as above together with ivermectin (6 µg/kg monthly), which has been shown to reduce pathology due to thromboembolism and to eliminate circulating mf rapidly (Bazzocchi et al., 2008). Approximately 36 weeks after IV filarial transplant, dogs were humanely euthanized and necropsied. The right caudal lobe of the lung and the kidneys from each animal were sampled and fixed in 10% buffered formalin until processing.

2.1.2. Naturally infected dogs

Twenty-three dogs from a local dog shelter in Las Palmas, Spain, a hyperendemic area of HWD (Montoya-Alonso et al., 2011) were used in the study. Inclusion in the study was based on a positive result for circulating *D. immitis* antigens (PetChek1 HW PF, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA). Dogs were further evaluated for the presence or absence of microfilariae using a modified Knott test. Levels of plasma D-dimer were measured according to Carretón et al. (2011). Reference ranges for healthy dogs were established in <0.2 µg/ml based on previous studies (Bauer and Moritz, 2009; Carretón et al., 2011). Recruited dogs were humanely euthanized and necropsied. The right caudal lobe of the lung and the kidneys from each animal were sampled and fixed in 10% buffered formalin until processing. The study was approved by the Ethics Committee of the Veterinary Medicine Service of Las Palmas de Gran

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

2.2. Histology and immuno-histochemistry

Lung and kidney tissues were embedded in paraffin and processed for histology and immuno-histochemistry. Six micron thick sections were placed on polylysine pre-treated slides. Tissue sections were stained with hematoxylin/eosin for routine histological examination.

Anti-D-dimer immuno-histochemistry was carried out as follows. Briefly, tissue sections were pre-treated in a microwave oven for three 5 min cycles at 400 W in citrate buffer. Endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation in 2% H₂O₂ for 10 min. Sections were blocked for 20 min with 10% swine serum and then incubated for 60 min with an anti-D-dimer antibody (Product # ABS 015-22-02, Thermo Scientific, USA) at 1:250 dilution. Slides were then treated with a secondary anti-rabbit Ig biotinylated complex, rinsed and incubated with a Streptavidin–HRP complex (LSAB+ System–HRP kit, Dako). All incubations were performed at room temperature and between each step washed two times with PBS for 5 min per wash. Reactivity was revealed with 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution kit (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako, Denmark) and stopped with rinses in distilled water. Slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated with graded ethanol, cleared in xylene and then cover slipped. Negative controls were carried out with omission of the primary antibody.

3. Results

All experimentally infected dogs in Group 1 showed varying degrees of pulmonary thrombo-embolism, often with worm fragments surrounded by clots (Fig. 1(1)). The presence of pulmonary thromboembolism in experimentally infected dogs was consistently associated with positive staining for D-dimer (Fig. 1(2)). As reported previously (Kramer et al., 2008), dogs treated with doxycycline or with a combination of doxycycline and ivermectin showed drastically reduced lung pathology and the virtual absence of thrombo-embolism. In the present study, lungs from these dogs were rarely positive for D-dimer (Fig. 1(3)). Of the naturally infected dogs, 34.8% ($n=8$) showed pathological levels of plasma D-dimer (mean value: 0.42 ± 0.18 µg/ml) associated in all cases with positive staining for D-dimer in pulmonary tissue (Fig. 1(4)). These dogs showed numerous pulmonary arteries affected by thrombo-embolism in some cases as well (Fig. 1(5)). Out of the dogs with normal plasma levels of D-dimer (<0.2 µg/ml), only 13.3% ($n=2$) showed positive staining for D-dimer in pulmonary tissue. It was also noted that lungs of mf+ dogs were more frequently positive to D-dimer staining than mf– dogs (Table 1) being observed in many cases positive staining for D-dimer associated to aggregates of microfilariae (Fig. 1(6)).

Staining for D-dimer in the kidneys of experimentally infected dogs appeared to depend on mf status. Indeed, mf+ dogs showed D-dimer deposits within the glomerular capillaries (Fig. 1(7)), while mf– dogs were consistently

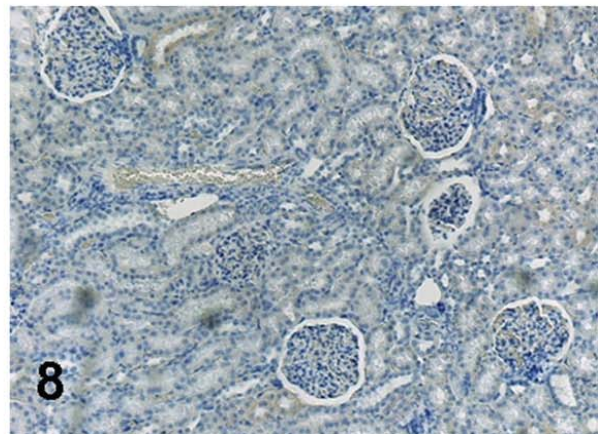
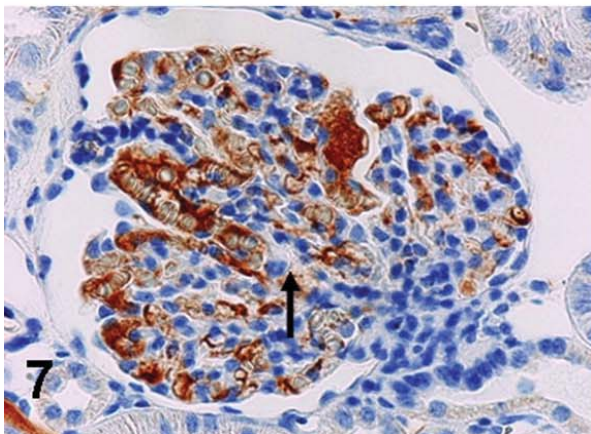
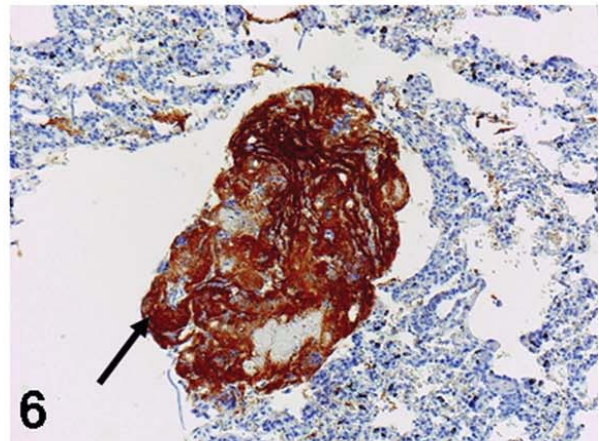
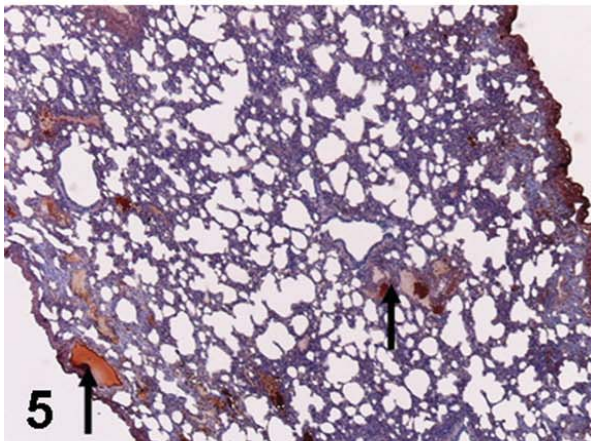
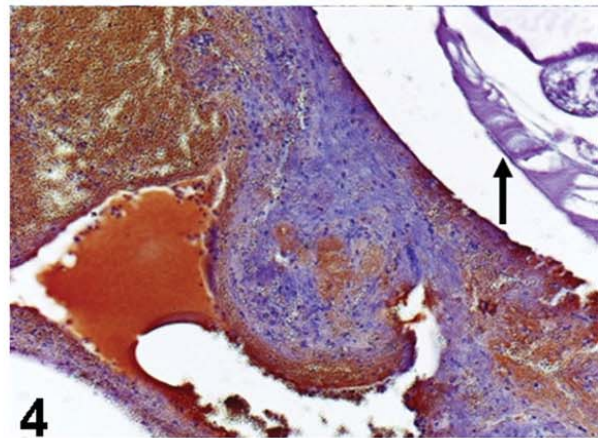
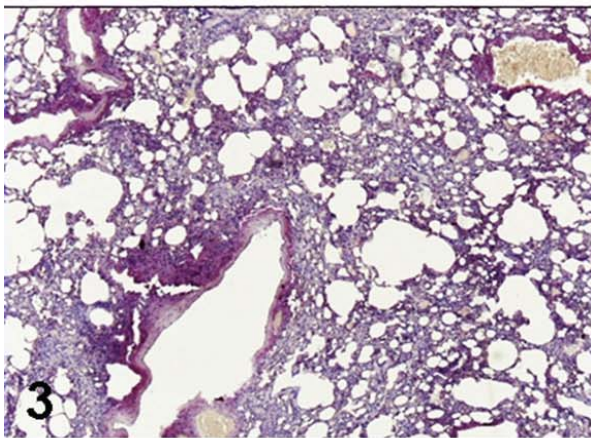
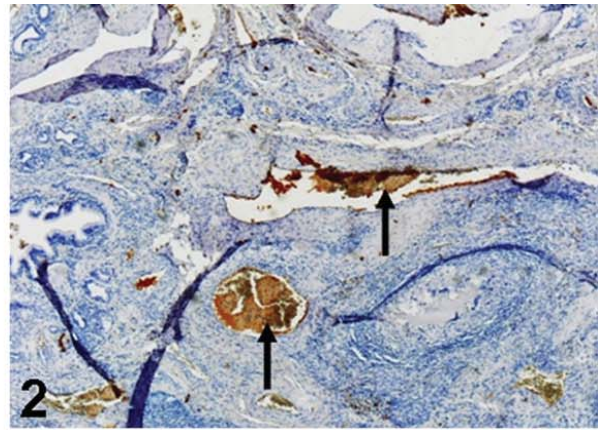
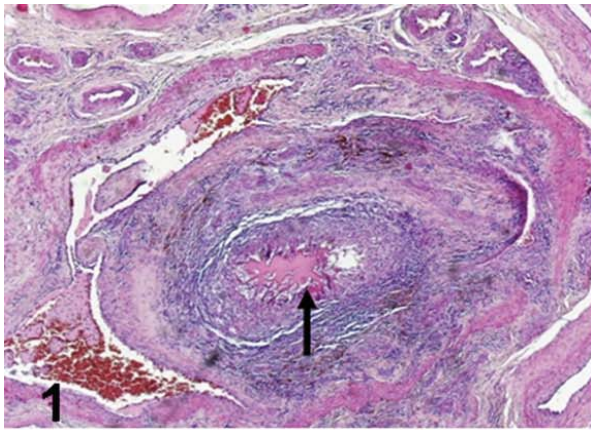


Table 1

Tissues of lung and kidneys for immunohistochemistry from naturally heartworm-infected dogs, divided by non-pathological and pathological plasma levels of D-dimer and by mf status.

	Positive staining for D-dimer
Lungs (n = 23)	
Plasma D-dimer <0.2 µg/ml (n = 15)	13.3% (n = 2)
Plasma D-dimer >0.2 µg/ml (n = 8)	100% (n = 8)
mf+ (n = 19)	47.4% (n = 9)
mf– (n = 4)	25.0% (n = 1)
Kidneys (n = 17)	
Plasma D-dimer <0.2 µg/ml (n = 9)	33.3% (n = 3)
Plasma D-dimer >0.2 µg/ml (n = 8)	75.0% (n = 6)
mf+ (n = 13)	69.2% (n = 9)
mf– (n = 4)	0% (n = 0)

negative (Fig. 1(8)). Of the naturally infected dogs, similar results are found, with mf+ dogs showing D-dimer within the glomerular capillaries in most cases and mf– dogs showing negative staining for D-dimer in renal tissue (Table 1).

4. Discussion

In the present study, D-dimer deposits in the lung and in the kidney of both experimentally and naturally infected dogs was studied in order to verify if this degradation product of clot formation is present in these tissues during infection. We chose the experimentally infected dogs from a previous study in order to determine if pulmonary thromboembolism was associated with the formation and deposit of D-dimer in the lungs and to compare staining with dogs that had been treated with drug regimes that have been shown to greatly reduce lung pathology. Results suggest that when thrombi are present, D-dimer forms and deposits in affected arteries. Where thrombi are absent, no staining is observed. The naturally infected dogs used in this study were further characterized by determination of D-dimer plasma levels and there was a clear association between increased plasma values and positive staining in immunohistochemistry, while the positive staining showed by 2 of the dogs with non-pathological plasma values of D-dimer could be due to local mild phenomenon of thrombosis, not severe enough to increase the plasma values of D-dimer. Pulmonary thromboembolism is a common complication due to the presence of dead worms and fragments of diseased vascular intima; mild pulmonary thromboembolism may be clinically unapparent, but in severe cases this constitutes a life-threatening complication. Thus, the determination of D-dimer plasma levels can be considered a valuable instrument in the prognosis,

clinical management and follow up of *D. immitis*-infected dogs to evaluate lung pathology due to pulmonary thromboembolism. Indeed, as reported by Nelson (2005), the difficulty in diagnosing pulmonary thromboembolism in dogs may be confounded by its subtle symptomatic presentation and lack of non-invasive tests that are sensitive and specific for the diagnosis. Although numerous laboratory markers of coagulation have been studied, only the D-dimer assay has shown clinical utility in detecting early embolism in humans (Torbicki et al., 2008) and is considered the marker of choice for dogs with a suspicion of pulmonary thromboembolism, including that caused by heartworm disease (Nelson and Andreasen, 2003; Stokol, 2003). However, since D-dimer is increased in any condition resulting in the formation and breakdown of fibrin, D-dimer concentrations may be increased in dogs with other diseases associated with thromboembolism, coagulopathies, or hemorrhage and, therefore, D-dimer should not be used as a single diagnostic indicator of pulmonary thromboembolism (Nelson, 2005; Dewhurst et al., 2008), although negative D-dimer concentrations may exclude pulmonary thromboembolism in a suspicious patient (Nelson and Andreasen, 2003). This strategy for interpreting negative D-dimer results is well documented in humans (Stein et al., 2004).

We also evaluated the presence of D-dimer in the kidneys in order to further study renal complications in heartworm-infected dogs due to circulating microfilariae. It has been shown that *D. immitis*-infected dogs can present proteinuria, and that microfilariaemic dogs have significantly higher urine protein concentrations compared to amicrofilariaemic dogs, further confirming that microfilariae play an important role in alterations of kidney function (Morchón et al., 2012). Furthermore, Carretón et al. (2011) showed not only that D-dimer was increased in dogs with heartworm disease, but also that microfilariaemic dogs had significantly higher average values than amicrofilariaemic dogs that were positive for heartworm antigen. There are no reports on the effect of mf on the coagulation properties in infected dogs. We thus thought it interesting to determine if microfilarial status (mf+ vs. mf–) was correlated to D-dimer expression in kidney glomeruli. The apparent correlation between D-dimer staining in kidneys and the presence of circulating mf may suggest that renal function is compromised in infected dogs not only due to immune complex formation but also to microthrombosis in capillaries. We found that 33% of the kidneys from naturally infected dogs were positive to immunohistochemistry staining while being negative to pathological serum values of D-dimer. This

Fig. 1. Histology and anti-D-dimer immunohistochemistry of lungs and kidneys from dogs with heartworm (*D. immitis*) disease. (1) Lung tissue from an untreated *D. immitis*-experimentally infected dog showing pulmonary thrombo-embolism around worm fragment (arrow; H&E, 20×); (2) serial section of the same tissue as in (1), showing positive staining for D-dimer in the affected artery (arrows; DAB-HPS, 20×); (3) lung tissue from an experimentally infected dog treated with a combination of doxycycline and ivermectin, with lack of staining for D-dimer (DAB-HPS, 20×); (4) lung tissue from a naturally infected dog, showing intense staining for D-dimer around an adult nematode (arrow) in the pulmonary artery (DAB-HPS, 40×); (5) lung tissue from a naturally infected dog, showing intense staining for D-dimer in numerous arteries (arrows; DAB-HPS, 20×); (6) lung tissue from a naturally infected dog, showing intense staining for D-dimer around a group of microfilaria circulating within the pulmonary artery (arrow; DAB-HPS, 40×); (7) kidney tissue from an untreated (mf+) experimentally infected dog showing intense staining for D-dimer within a glomerular capillary (arrow; DAB-HPS, 60×); (8) kidney tissue from an experimentally infected dog treated with doxycycline (mf–), showing lack of staining for D-dimer within glomerular capillaries (DAB-HPS, 20×).

could be due to the fact that the microthrombi generated at renal level are not severe or extensive enough to raise the serum levels. During filarial infections, mf circulate unimpeded through the blood stream and it is not clear how intravascular filarial parasites avoid precipitating thrombosis. Foster et al. (1991) showed that mf of *Brugia malayi*, a human filarial parasite, are able to inhibit the intrinsic coagulation pathway and platelet aggregation in vitro. When mf die, this inhibition is no longer active. Thus, as results of the present study would indicate, we may hypothesize that when mf deposit in the glomeruli during patent infection, they cause thrombosis and D-dimer formation, which may worsen the glomerular function.

To conclude, the monitoring of D-dimer levels in infected dogs is useful in evaluating the presence of pulmonary thromboembolism in the lungs and that microfilariae may induce microthrombosis in kidneys, thus contributing to renal pathology.

Acknowledgements

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

References

- Bauer, N., Moritz, A., 2009. Evaluation of the cardiac reader (R) as a point-of-care instrument for measurement of fibrin D-dimers in dogs. *Tierarztl. Prax.* 37, 319–325.
- Bazzocchi, C., Mortarino, M., Grandi, G., Kramer, L.H., Genchi, C., Bandi, C., Genchi, M., Sacchi, L., McCall, J.W., 2008. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Int. J. Parasitol.* 38, 1401–1410.
- Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A., 2011. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels. *Vet. Parasitol.* 176, 313–316.
- Dewhurst, E., Cue, S., Crawford, E., Papasouliotis, K., 2008. A retrospective study of canine D-dimer concentrations measured using an immunometric “point-of-care” test. *J. Small Anim. Pract.* 49, 344–348.
- Foster, C.B., Flanigan, T.P., Kazura, J.W., Dumenco, L.L., Ratnoff, O.D., 1991. Inhibition of the activation of Hageman factor (factor XII) and of platelet aggregation by extracts of *Brugia malayi* microfilariae. *J. Lab. Clin. Med.* 117, 344–352.
- Goggs, R., Benigni, L., Fuentes, V.L., Chan, D.L., 2009. Pulmonary thromboembolism. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 19, 30–52.
- Kramer, L., Grandi, G., Leoni, M., Passeri, B., McCall, J., Genchi, C., Mortarino, M., Bazzocchi, C., 2008. *Wolbachia* and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Parasitol.* 158, 191–195.
- Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F., 2011. Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, cats and humans from the island of Gran Canaria, Spain. *Vet. Parasitol.* 176, 291–294.
- Morchón, R., Carretón, E., Grandi, G., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., Genchi, C., Kramer, L.H., 2012. Anti-*Wolbachia* surface protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 17–20.
- Nelson, O.L., 2005. Use of the D-dimer assay for diagnosing thromboembolic disease in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 41, 145–149.
- Nelson, O.L., Andreasen, C., 2003. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 830–834.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 507–544.
- Stein, P.D., Hull, R.D., Patel, K.C., Olson, R.E., Ghali, W.A., Brant, R., Biel, R.K., Bharadia, V., Kalra, N.K., 2004. D-dimer for the exclusion of acute venous thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review. *Ann. Intern. Med.* 140, 589–602.
- Stokol, T., 2003. Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 1419–1435.
- Torbicki, A., Perrier, A., Konstantinides, S., Agnelli, G., Galie, N., Pruszczyk, P., Bengel, F., Brady, A.J., Ferreira, D., Janssens, U., Klepetko, W., Mayer, E., Remy-Jardin, M., Bassand, J.P., ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), 2008. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the task force for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 29, 2276–2315.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

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

Variation of D-dimer values as assessment of pulmonary thromboembolism during adulticide treatment of heartworm disease in dogs

E. Carretón^{a,*}, R. Morchón^b, J. González-Miguel^b, F. Simón^b,
M.C. Juste^a, J.A. Montoya-Alonso^a

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

^b Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy and Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 November 2012

Received in revised form

26 December 2012

Accepted 9 January 2013

Keywords:

Dirofilaria immitis

Heartworm disease

D-Dimer

Pulmonary thromboembolism

Thrombocytopenia

ABSTRACT

Dirofilaria immitis adult worms lodged in the pulmonary arteries are the causative agent of heartworm disease, characterized by endarteritis and obstruction of the blood flow. Dying worms form embolic fragments which trigger thrombosis. Thus, pulmonary thromboembolism is an inevitable consequence of successful adulticide therapy. Clinical signs of pulmonary thromboembolisms are highly variable and non-specific, and its diagnosis is often difficult to obtain. The D-dimer assay is considered the marker of choice for dogs with a suspicion of pulmonary thromboembolism. The aim of the present study was to evaluate the variation of D-dimer and platelets in 15 heartworm-infected dogs during the adulticide treatment with ivermectin, doxycycline and melarsomine. Nine dogs were considered to have a low parasite burden and 6 had a high burden. Measurements were carried out on days 0, 60, and afterwards weekly on days 67, 75, 82, 91, 98, 106, 113, 120, and finally on day 271 after treatment. 40% of dogs showed pathological concentrations of D-dimer and 40% showed slight or mild thrombocytopenia on day 0. The levels of D-dimer decreased by day 60, probably due to the joint action of the ivermectin, doxycycline and exercise restriction. All dogs with high parasite burden showed elevated values of D-dimer on several occasions during the treatment, reaching the highest values the first and second week after the injections of melarsomine. Only 33.3% of the dogs with low parasite burden showed elevated D-dimer levels at some point during the treatment, and all of them showed undetectable levels from the third week after the first injection of melarsomine. On day 271, all dogs showed undetectable levels of D-dimer. There was no correlation between thrombocytopenia and levels of D-dimer during the treatment. The evaluation of serum D-dimer appears to be a supportive test in the assessment and monitoring of pulmonary thromboembolism in dogs with heartworm disease during the adulticide treatment.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Heartworm disease (HWD) is a vector-borne transmitted disease caused by the filarial nematode *Dirofilaria*

immitis, which mainly affects dogs, cats, and other carnivores in temperate, humid and tropical areas all over the world. Moreover, it causes zoonotic infections, producing pulmonary dirofilariasis in humans (Simón et al., 2012).

The pathophysiologic response to heartworm infection is mainly due to the presence of adult worms in the pulmonary arteries, the existence of microfilariae and the release of the endosymbiotic bacteria *Wolbachia pipientis*

* Corresponding author. Tel.: +34 636024279; fax: +34 928451114.

E-mail address: ecarreton@becarios.ulpgc.es (E. Carretón).

from both adults and microfilariae when they die. The adult worms cause endoarteritis with intimal proliferation and thickening of the wall vessels, and obstruction of the blood flow by narrowing the lumen of the smaller pulmonary arterioles-branches. Furthermore, when the worms die, along with platelet aggregation and fragments of diseased vascular intima, embolic fragments are formed which trigger thrombosis. These events lead to pulmonary hypertension, which is one of the most important causes of clinical signs in heartworm disease. Severe pulmonary hypertension, if not treated, may progress to congestive heart failure (McCall et al., 2008; Simón et al., 2012). Thrombosis and thromboembolism may compromise the pulmonary circulation further; moreover, during the adulticide treatment, pulmonary thromboembolism (PTE) is an inevitable consequence of successful adulticide therapy. Mild thromboembolism may be clinically unapparent but in severe cases life-threatening respiratory distress can occur.

D-Dimer is an end product of the degradation of a fibrin-rich thrombus. During the process of clot formation, thrombin cleaves fibrinogen to form soluble fibrin monomers that become insoluble when factor XIII cross-links these monomers. Insoluble fibrin is cleaved by plasmin, producing different oligomers, one of them being the D-dimer. Thus, increased concentrations of D-dimer in plasma is a marker of fibrinolysis, and consequently, of clot formation. D-Dimers result only from the degradation of cross-linked fibrin (stabilized clot) and, thus, in contrast to other degradation products, are specific for active coagulation and fibrinolysis (Goggs et al., 2009).

D-Dimer assays are the focus of much research in human studies of PTE and in veterinary studies of thromboembolic diseases (Nelson and Andreasen, 2003; Stokol, 2003; Torbicki et al., 2008). Several studies have reported that increase in plasma D-dimer concentrations can be useful in the identification of dogs with thromboembolic disease and disseminated intravascular coagulation (Nelson and Andreasen, 2003; Stokol, 2003; Dewhurst et al., 2008). It has recently been reported that a significant number of dogs with naturally acquired HWD show an increase in plasma concentrations of D-dimer (Carretón et al., 2011, 2012). The authors showed that these elevated concentrations of D-dimer would be due to thromboembolic processes, suggesting that D-dimer could be used as a supportive tool for diagnosis and evaluation of PTE in dogs with heartworm disease.

The purpose of the present study was to evaluate the variation of D-dimer, as well as platelets, in dogs infected by *D. immitis* during the adulticide treatment with ivermectin, doxycycline and melarsomine, following the American Heartworm Society's recommended protocol.

2. Materials and methods

15 client-owned dogs brought to the Veterinary Medicine Service of Las Palmas de Gran Canaria University were included in the study. Ten were male and 5 were female and the age ranged from 2 to 7 years; 10 were mixed-bred dogs and 5 were pure-bred dogs (Dalmatian, Samoyed, Beagle, German Shepherd Dog and Dachshund). All the owners gave their consent to participate in this

study. The dogs lived in a hyperendemic area of HWD (Montoya-Alonso et al., 2011). Inclusion in the study was based on a positive result for circulating *D. immitis* antigens (PetChek® HW PF, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA). Dogs were further evaluated for the presence or absence of microfilariae using a modified Knott test. Thoracic radiography and echocardiography exams were carried out in all dogs at the beginning and at the end of the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Veterinary Medicine Service of Las Palmas de Gran Canaria University and was carried out in accordance to current European legislation on animal protection.

Echocardiographic findings and levels of circulating antigens were evaluated to estimate the worm burden (Venco et al., 2003). According to Venco et al. (2003), when worms were visualized in the pulmonary trunk and/or in the proximal intralobar pulmonary arteries, the worm burden was more likely to be clinically significant, while when no worms were visualized or only a few echoes occupying the right pulmonary artery and extending to the main pulmonary artery, the worm burden was considered low.

The dogs received adulticide treatment following the American Heartworm Society recommended management protocol (American Heartworm Society, 2012). Briefly, on day 0 the dog is diagnosed and verified as heartworm positive, monthly heartworm preventative based on ivermectin (6 µg/kg) and the administration of doxycycline (10 mg/kg BID) for 4 weeks is initiated. On day 60 the dog is treated with the first intramuscular injection of melarsomine (2.5 mg/kg), followed on day 90 by a second injection, and a third injection on day 91. On day 120 the dog is tested for presence of microfilariae and discharged. Finally, on day 271, 6 months after completion, an antigen test is carried out to confirm the adulticide efficacy. Moderate exercise restriction was recommended from day 0 until day 60 and significant since day 60 until at least one month after the last melarsomine injection.

The blood sampling and measurements were done on day 0, day 60 and from then on, on a weekly basis; on day 67, day 75, day 82, day 91, day 98, day 106, day 113 and day 120. Finally, on day 271 the last blood sample and measurements were taken and the test for detection of circulating antigens was carried out (PetChek® HW PF, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA).

Measurement of circulating D-dimer was performed using heparinized blood, within 4 h of venipuncture, using specific CARDIAC D-Dimer® immunoassay system (Cardiac Reader system, Roche® Diagnostics, Mannheim, Germany), according to manufacturer instructions. The measuring range was 0.1–4 µg/ml; values below and above these ranges were displayed as negative and high, respectively. A range of D-dimer concentration on Cardiac Reader in clinically healthy dogs in <0.2 µg/ml was established, based on reference ranges reported in a previous study (Bauer and Moritz, 2009).

Platelet count was performed using blood collected in EDTA-3K tubes, following standardized techniques (canine profile) (Medonic® CA530, Boule Medical AB, Stockholm, Sweden). Slight or mild thrombocytopenia was considered when the platelet count was 50–142 × 10³ platelets/µl (Furlanello et al., 2005) and thrombocytosis

was considered when the platelet count was $>500 \times 10^3$ platelets/ μl (Neel et al., 2012).

2.1. Statistical analysis

For data statistical analysis the IBM® SPSS® Statistics (version 19) was used throughout. Descriptive analyses of the variables were carried out using the test of proportions for qualitative variables and measurements of central tendency (mean), measures of dispersion (standard deviation; SD) for quantitative variables. For continuous variables we used the Kolmogorov–Smirnov test to check that the variables were normally distributed. The comparisons of absolute means between groups were made with the *T* of Student test for normally distributed variables. Bivariate analyses of proportionality of distribution of categorical variables were estimated using the χ^2 test. A *P* value <0.05 was determined as indicating significance.

Finally, the correlation between abnormalities in platelet number and D-dimer concentration in the different groups by means of a Spearman rank correlation was evaluated.

3. Results

Based on the modified Knott test results on day zero, 7 dogs (47%) showed microfilaremia and 8 (53%) were amicrofilaric. On day 120, only one dog showed microfilaremia and on day 271, none of them revealed presence of microfilariae.

Echocardiographic findings and analysis of the levels of circulating antigens suggest that 9 dogs (60%) can be considered as having a low burden of heartworms (group 1) while 6 can be considered to have a high burden (group 2).

On day zero, 40% (6/15) of dogs showed elevated values of D-dimer ($>0.2 \mu\text{g/ml}$). Of these, 42.85% (3/7) were microfilaric and 37.5% (3/8) were amicrofilaric.

On day zero, the group 1 (low parasite burden) showed elevated levels of D-dimer in 33.3% of dogs (3/9), while in group 2 (high parasite burden) 50% of the dogs (3/6) showed elevated levels of D-dimer.

Table 1

Mean values of D-dimer for group 1 (low parasite burden) and group 2 (high parasite burden) during the treatment. Includes only dogs with elevated values of D-dimer ($>0.2 \mu\text{g/ml}$). Data are shown as the mean or the mean $\pm$ standard deviation ($\mu\text{g/ml}$). The asterisk (*) refers to the first intramuscular injection of melarsomine and the two asterisks (**) refers to second (day 90) and third (day 91) intramuscular injections of melarsomine.

Day of treatment	Group 1 (low burden) (n = 9)	Group 2 (high burden) (n = 6)
Day 0	0.32 ± 0.15 (n = 3)	0.29 ± 0.1 (n = 3)
Day 60*	0.2 (n = 1)	0.29 (n = 1)
Day 67	0.28 (n = 1)	0.5 ± 0.3 (n = 5)
Day 75	0.2 (n = 1)	0.4 ± 0.39 (n = 6)
Day 82	None	0.25 ± 0.06 (n = 4)
Day 91**	None	0.38 ± 0.17 (n = 2)
Day 98	None	0.39 ± 0.12 (n = 6)
Day 106	None	0.47 ± 0.28 (n = 6)
Day 113	None	0.47 ± 0.42 (n = 5)
Day 120	None	0.58 ± 0.53 (n = 2)
Day 271	None	None

The variations in the percentages of dogs in groups 1 and 2 showing elevated levels of D-dimer during the treatment are described in Fig. 1. There were statistically significant differences between both groups during all the treatment ($P < 0.05$).

The mean values of D-dimer in dogs with elevated levels during the treatment in groups 1 and 2 of dogs are shown in Table 1.

On day zero, 40% (6/15) of the studied dogs showed slight or mild thrombocytopenia; of these, 42.8% (3/7) presented microfilaremia and 37.5% (3/8) were amicrofilaric. Concerning the parasite burden, 33.3% (3/9) of dogs from group 1 and 50% (3/6) of dogs from group 2 showed thrombocytopenia. There were not statistically significant differences in mean values of platelets between groups 1 and 2 during the treatment, except on day 67 ($P = 0.04$). At the end of the treatment (day 120), all dogs had a platelet count within the reference ranges for healthy dogs.

The mean values of platelets in all the studied dogs as well as in dogs of groups 1 and 2 during the treatment are described in Table 2. There were not statistically

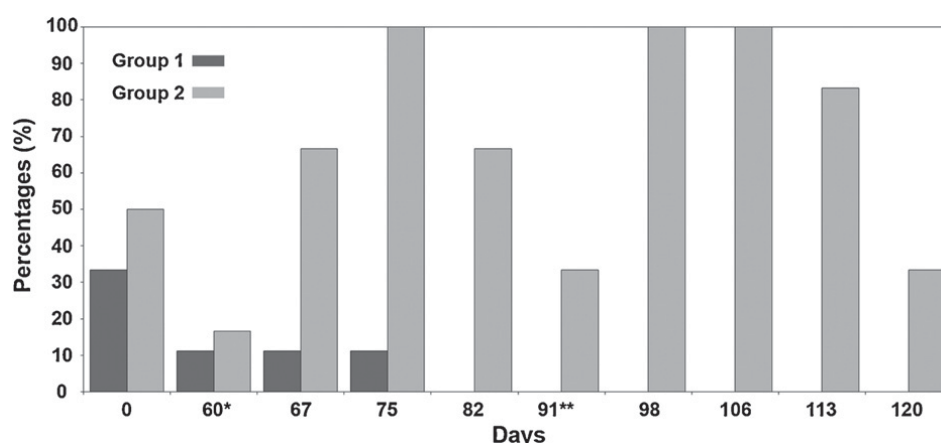


Fig. 1. Percentages of dogs of groups 1 (low parasite burden) and group 2 (high parasite burden) with elevated levels of D-dimer during the treatment. There are statistically significant differences between both groups during all the treatment ($P < 0.05$). The asterisk (*) refers to the first intramuscular injection of melarsomine and the two asterisks (**) refers to second (day 90) and third (day 91) intramuscular injections of melarsomine.

Table 2

Mean values of platelets for all dogs, and groups of dogs with elevated ($>0.2 \mu\text{g/ml}$) and normal ($<0.2 \mu\text{g/ml}$) levels of D-dimer, during the treatment. Data are shown as the mean $\pm$ standard deviation ($\times 10^3$ platelets/ μl). The black triangle ($\blacktriangle$) designates significant ($P < 0.05$) differences. The asterisk (*) refers to the first intramuscular injection of melarsomine and the two asterisks (**) refers to second (day 90) and third (day 91) intramuscular injections of melarsomine.

Day of treatment	Total dogs (n = 15)	Elevated D-dimer	Normal D-dimer
Day 0 $\blacktriangle$	226.80 $\pm$ 149.29	299.16 $\pm$ 116.42 (n = 6)	178.55 $\pm$ 154.87 (n = 9)
Day 60*	297.46 $\pm$ 74.07	385.00 $\pm$ 63.64 (n = 2)	284.00 $\pm$ 67.75 (n = 13)
Day 67 $\blacktriangle$	259.73 $\pm$ 80.47	208.16 $\pm$ 28.82 (n = 6)	294.11 $\pm$ 86.54 (n = 9)
Day 75	201.40 $\pm$ 74.36	181.00 $\pm$ 56.42 (n = 7)	219.25 $\pm$ 86.90 (n = 8)
Day 82	217.46 $\pm$ 66.11	195.50 $\pm$ 38.44 (n = 4)	225.45 $\pm$ 73.57 (n = 11)
Day 91**	270.66 $\pm$ 66.40	266.50 $\pm$ 61.52 (n = 2)	271.30 $\pm$ 69.46 (n = 13)
Day 98	212.33 $\pm$ 74.82	193.16 $\pm$ 49.95 (n = 6)	225.11 $\pm$ 88.20 (n = 9)
Day 106	253.93 $\pm$ 88.38	223.50 $\pm$ 65.51 (n = 6)	274.22 $\pm$ 99.14 (n = 9)
Day 113	260.73 $\pm$ 65.45	239.80 $\pm$ 48.48 (n = 5)	271.20 $\pm$ 72.49 (n = 10)
Day 120	324.73 $\pm$ 63.23	368.00 $\pm$ 67.88 (n = 2)	318.07 $\pm$ 62.61 (n = 13)
Day 271	324.93 $\pm$ 47.98	None	324.93 $\pm$ 47.98 (n = 15)

significant differences in mean values of platelets between dogs with elevated and with normal levels of D-dimer during the treatment, except on days 0 and 67 ($P < 0.01$). No correlation was detected between thrombocytopenia and elevated levels of D-dimer ($P = 0.46$, $r = -0.20$).

On day 271, all dogs had a negative result in the heartworm antigen test and there was no evidence of heartworms in the echocardiographic examination. There was not any adverse reaction during the treatment and all the dogs completed it.

Only two dogs from group 2 showed clinical signs suggesting thromboembolism (cough, dyspnea) at the time of blood sampling on day 75 (D-dimer: $1.2 \mu\text{g/ml}$) and day 98 (D-dimer: $0.58 \mu\text{g/ml}$), respectively.

4. Discussion

During canine HWD, PTE is present: intimal proliferation occurs in arteries occupied by living worms and embolic worm fragments from dead worms trigger thrombosis, both which may completely obstruct segments of the pulmonary arteries; moreover, as worms die following administration of adulticidal drugs, they decompose and small worm fragments lodge in the distal pulmonary arterioles and capillary beds in the caudal lung lobes blocking blood flow. These worm fragments, along with the elicited inflammation and platelet aggregation, result in thromboembolisms. Significant pulmonary vascular occlusion leads to pulmonary arterial hypertension and increased right ventricular afterload. Severe, acute changes in right ventricle afterload result in debilitation and dysfunction (McCall et al., 2008; Goggs et al., 2009).

Clinical signs of PTE are highly variable, inconsistent and non-specific, and many small animals with PTE will have normal thoracic radiographs (Goggs et al., 2009). Therefore, the diagnosis of this disorder is often difficult to obtain and is frequently missed. In most cases, the consequences of misdiagnosis are serious. There are a lack of non-invasive tests that are sensitive and specific for the diagnosis of PTE. D-Dimer is a product of degradation of fibrin, thus high plasma concentrations indicate the presence of thrombi and their degradation. Although numerous laboratory biomarkers of coagulation have been studied, the D-dimer assay is considered the marker of choice for dogs with

a suspicion of PTE (Nelson and Andreasen, 2003; Stokol, 2003). Furthermore, negative D-dimer concentrations may exclude PTE in a suspicious patient (Nelson and Andreasen, 2003).

In the present study, 40% of dogs showed pathological concentrations of D-dimer before beginning the treatment protocol. Previous studies reported levels of D-dimer significantly higher compared to those of healthy dogs in 47% and 34.8% of HWD-infected dogs (Carretón et al., 2011, 2012). Furthermore, the authors reported that D-dimer levels were above the normal range most notably in microfilaremic dogs and suggested that the presence of microfilariae could increase the tendency to develop PTE. Likewise, in the present study microfilaremic dogs showed elevated levels of D-dimer more frequently, which is in accordance with these findings.

Recently, an immunohistochemical study reported that the presence of PTE was consistently associated with positive staining for D-dimer (Carretón et al., 2012). Moreover, all dogs with pathological levels of plasma D-dimer were associated with positive staining for D-dimer in pulmonary tissue and some cases affected by thromboembolisms as well, leading to the conclusion that the monitoring of D-dimer levels in infected dogs is useful in evaluating the presence of pulmonary thromboembolic episodes in the lungs of dogs with heartworm disease. Furthermore, in that study positive staining for D-dimer associated with aggregates of microfilariae was observed in many cases. The findings of our study agree with those reported by Carretón et al. (2012), since 50% of dogs with high burden of *D. immitis* showed elevated levels of D-dimer, compared to 33.3% of dogs with low parasite burden, furthermore 42.85% of microfilaremic dogs showed elevated levels of D-dimer, compared to 37.5% of amicrofilaremic dogs.

40% of the studied dogs showed slight or mild thrombocytopenia on day 0. This finding probably represents the dramatic consumptive process of thromboembolism. Previously, thrombocytopenia was reported in dogs infected by *D. immitis* (Rawlings, 1982; Boudreaux et al., 1989; Anuchai et al., 2007). Thrombocytopenia, as marker of disseminated intravascular coagulation, may increase the index of suspicion for PTE (Feldman et al., 2000). No correlation was detected between elevated levels of D-dimer and thrombocytopenia in the studied dogs.

Nelson and Andreasen (2003) found similar results, who reported incidence of platelet number abnormalities (thrombocytopenia or thrombocytosis) in 65% of dogs with thromboembolic processes, although they found no correlation between thrombocytopenia and high D-dimer concentrations in dogs with thromboembolic disease.

We found that the levels of D-dimer decreased on day 60, as well as the medium levels of platelets increase, being within normal ranges in all dogs. This could be due to the joint action of the ivermectin, doxycycline and (moderate) exercise restriction. It has been reported that the use of a macrocyclic lactone prior to adulticide treatment reduce, if not eliminate, circulating microfilariae and reduce female worm mass; the resulting reduction in antigenic mass may be likely to reduce the severity of PTE (Kramer et al., 2011). Furthermore, specific antibiotic therapy given to infected dogs reduces the endosymbiotic bacterial population of *Wolbachia* within all life stages of *D. immitis*, which greatly reduces pro-inflammatory reactions to dying worms. The elimination of *Wolbachia* and reduction of microfilariae may reduce the vascular inflammation and, therefore, reduce thromboembolic processes or its severity. Several studies have shown that dogs that received the combined doxycycline/ivermectin protocol prior to treatment with adulticide, showed less severe arterial lesions (Bazzocchi et al., 2008; Kramer et al., 2008, 2011). Likewise, an immunohistochemical study showed that lung tissues from heartworm-infected dogs treated with ivermectin and doxycycline were rarely positive to D-dimer (Carretón et al., 2012). Therefore, the elimination of worms through adulticide therapy should be carried out according to specific guidelines that are aimed at limiting further pathology associated with dying worms.

All dogs with high parasite burden (group 2) showed elevated values of D-dimer on several occasions during the treatment. The highest values were found on day 75 (second week after the first injection of melarsomine) and days 98 and 106 (first and second week after the third injection of melarsomine). This may be due to embolization of the dead worms into the pulmonary vasculature, which justifies the importance of the parasite burden in the development of thromboembolic processes. PTE is an inevitable consequence of successful adulticide therapy and may be severe if infection is heavy and pulmonary arterial disease is extensive. If signs of embolism develop, they are usually evident within 7–10 days, but occasionally as late as 4 weeks after completion of adulticide administration (American Heartworm Society, 2012). On the other hand, only 33.3% of the dogs with low parasite burden showed elevated D-dimer levels at some point during the treatment, and all of them showed undetectable levels of D-dimer from day 82 of treatment (third week after the first injection of melarsomine), which indicates that significant thromboembolic processes only developed during the first two weeks after the first injection of adulticide in this group. There were not significant differences in mean values of platelets between groups 1 and 2 during the treatment, except on day 67 ($P=0.04$), when only a very weak significance was observed. Given the lack of non-invasive tests that are sensitive and specific for the diagnosis of PTE,

the evaluation of serum D-dimer may be considered a quick and valuable screening test.

During the treatment, there was not correlation between thrombocytopenia and high levels of D-dimer. A possible explanation may be that the D-dimer levels seems to keep significantly elevated from 30 min to 24 h post-embolism, as described by Ben et al. (2007) after inducing acute PTE in eighteen healthy dogs; on the other hand, Kitoh et al. (1994) observed that, after intravenous injection of heartworm extract in 50 dogs with and without heartworm disease, the platelet count decreased markedly at initial collapse and tended to recover 30 min after heartworm injection.

On day 120, 33.3% of the dogs with high parasite burden showed elevated levels of D-dimer, which indicates that one month after the last injection of adulticide, thromboembolic processes are still occurring, therefore the exercise restriction may continue in these dogs. On day 271, all dogs showed undetectable levels of D-dimer; none of them revealed presence of heartworm during echocardiographic examination, as well as all antigen tests being negative, confirming the success of the treatment.

All the microfilaremic dogs except one, showed no presence of circulating microfilariae on day 120, and all of them were amicrofilaremic on day 271. Bazzocchi et al. (2008) reported that, after weekly administration of ivermectin (6 µg/kg) and doxycycline (10 mg/kg/day) intermittently during 34 weeks in heartworm-infected dogs, there was a significant fall in circulating microfilariae beginning at week 6 of treatment, and all dogs were amicrofilaremic at week 12 (day 84), concluding that this dramatic drop could be due to the summation of the effects of both drugs. In our study, the administration of ivermectin was mensural, and the doxycycline was administrated only for 4 weeks, hence this could be the cause of a slower drop of circulating microfilariae.

The D-dimer appears to be a supportive test in the monitoring and evaluation of the dog during the adulticide treatment of *D. immitis*. D-dimer is a non-invasive, useful and quick screening test, and could be used as a supportive tool for assessment and monitoring of PTE in dogs with HWD during the adulticide treatment.

Acknowledgements

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

References

- American Heartworm Society, 2012. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs (2012). Available at: <http://www.heartwormsociety.org> (accessed 15.11.12).
- Anuchai, N., Morakot, K., Sonthaya, T., Somporn, T., Siram, S.A., 2007. Retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. Res. Vet. Sci. 82, 364–369.
- Bauer, N., Moritz, A., 2009. Evaluation of the cardiac reader (R) as a point-of-care instrument for measurement of fibrin D-dimers in dogs. Tierärztl. Prax. 37, 319–325.

- Bazzocchi, C., Mortarino, M., Grandi, G., Kramer, L.H., Genchi, C., Bandi, C., Genchi, M., Sacchi, L., McCall, J.W., 2008. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Int. J. Parasitol.* 38, 1401–1410.
- Ben, S.Q., Ni, S.S., Shen, H.H., Shi, Y.X., Huang, S.B., Xu, J.H., Huang, J.F., 2007. The dynamic changes of LDH isoenzyme 3 and D-dimer following pulmonary thromboembolism in canine. *Thromb. Res.* 120, 575–583.
- Boudreaux, M.K., Dillon, A.R., Spano, J.S., 1989. Enhanced platelet reactivity in heartworm-infected dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1544–1547.
- Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A., 2011. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels. *Vet. Parasitol.* 176, 313–316.
- Carretón, E., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., Simón, F., Passeri, B., Cantoni, A.M., Kramer, L., 2012. D-Dimer deposits in lungs and kidneys suggest its use as a marker in the clinical workup of dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease. *Vet. Parasitol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.008>.
- Dewhurst, E., Cue, S., Crawford, E., Pappasoulis, K., 2008. A retrospective study of canine D-dimer concentrations measured using an immunometric “Point-of-Care” test. *J. Small Anim. Pract.* 49, 344–348.
- Feldman, B.F., Kirby, R., Caldin, M., 2000. Recognition and treatment of disseminated intravascular coagulation. In: Bonagura, J.D. (Ed.), *Kirk’s Current Veterinary Therapy XIII: Small Animal Practice*, 13th ed. WB Saunders Co., Philadelphia, pp. 190–194.
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., Solano-Gallego, L., 2005. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet. Parasitol.* 134, 77–85.
- Goggs, R., Benigni, L., Fuentes, V.L., Chan, D.L., 2009. Pulmonary thromboembolism. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 19, 30–52.
- Kitoh, K., Watoh, K., Chaya, K., Kitagawa, H., Sasaki, Y., 1994. Clinical, hematologic, and biochemical findings in dogs after induction of shock by injection of heartworm extract. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1535–1541.
- Kramer, L., Grandi, G., Passeri, B., Gianelli, P., Genchi, M., Dzimirski, M.T., Supakorndej, P., Mansour, A.M., Supakorndej, N., McCall, S.D., McCall, J.W., 2011. Evaluation of lung pathology in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs treated with doxycycline or a combination of doxycycline and ivermectin before administration of melarsomine dihydrochloride. *Vet. Parasitol.* 176, 357–360.
- Kramer, L., Grandi, G., Leoni, M., Passeri, B., McCall, J., Genchi, C., Mortarino, M., Bazzocchi, C., 2008. *Wolbachia* and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Parasitol.* 158, 191–195.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* 66, 193–285.
- Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F., 2011. Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, cats and humans from the island of Gran Canaria, Spain. *Vet. Parasitol.* 176, 291–294.
- Neel, J.A., Snyder, L., Grindem, C.B., 2012. Thrombocytosis: a retrospective study of 165 dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 41, 216–222.
- Nelson, O.L., Andreasen, C., 2003. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 830–834.
- Rawlings, C.A., 1982. Clinical laboratory evaluations of seven heartworm infested beagles: during disease development and following treatment. *Cornell Vet.* 72, 49–56.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 507–544.
- Stokol, T., 2003. Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 1419–1435.
- Torbicki, A., Perrier, A., Konstantinides, S., Agnelli, G., Galie, N., Pruszczyk, P., Bengel, F., Brady, A.J., Ferreira, D., Janssens, U., Klepetko, W., Mayer, E., Remy-Jardin, M., Bassand, J.P., 2008. ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 29, 2276–2315.
- Venco, L., Genchi, C., Vigevari Colson, P., Kramer, L., 2003. Relative utility of echocardiography, radiography, serologic testing and microfilariae counts to predict adult worm burden in dogs naturally infected with heartworms. In: Seward, R.L., Knight, D.H. (Eds.), *Recent Advances in Heartworm Disease, Symposium’01*. American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 111–124.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

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



Short Communication

Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): Immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs

E. Carretón^a, G. Grandi^b, R. Morchón^c, F. Simón^c, B. Passeri^b, A.M. Cantoni^b, L. Kramer^{b,*}, J.A. Montoya-Alonso^a

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

^b Department of Animal Health, University of Parma, 43100 Parma, Italy

^c Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2011

Received in revised form 5 April 2012

Accepted 13 April 2012

Keywords:

Dirofilaria immitis

Myoglobin

Cardiac troponin I

Myocardium

Immunohistochemistry

ABSTRACT

It has recently been reported that dogs affected by canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) can show an increase in plasma levels of myoglobin and cardiac troponin I, two markers of muscle/myocardial injury. In order to determine if this increase is due to myocardial damage, the right ventricle of 24 naturally infected dogs was examined by routine histology and immunohistochemistry with anti-myoglobin and anti-cardiac troponin I antibodies. Microscopic lesions included necrosis and myocyte vacuolization, and were associated with loss of staining for one or both proteins. Results confirm that increased levels of myoglobin and cardiac troponin I are indicative of myocardial damage in dogs affected by heartworm disease.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Canine heartworm disease (CHWD) is caused by the filarial nematode *Dirofilaria immitis*, that resides in the pulmonary arteries, and occasionally right heart chambers, of dogs, cats, ferrets and wild canids (McCall et al., 2008). Infection is characterized by endothelial proliferation, perivascular inflammation and thrombo-embolism, all leading to chronic pulmonary hypertension and right-side congestive heart disease. Myoglobin, an oxygen-binding protein found in cardiac and striated muscle, is used as an early diagnostic tool for myocardial infarction (Collinson et al., 2003). Cardiac troponin I is a striated-muscle structural protein, myocardial-specific isoform, whose release

into the bloodstream is due to damage to cardiac myocytes (Boswood, 2009).

It has recently been reported that a significant number of dogs with naturally acquired CHWD show an increase in plasma concentrations of myoglobin and cardiac troponin I (Carretón et al., 2011). The authors hypothesized that these elevated concentrations are due to damage to the myocardium as a result of pulmonary hypertension and consequent right-side congestive heart disease. In order to confirm the myocardial origin of increased plasma levels of these two proteins, the hearts of 24 naturally infected dogs were examined by routine histology and immunohistochemistry with anti-myoglobin and anti-cardiac troponin I antibodies.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Dogs from a local dog shelter in Las Palmas, Spain, were used in the study. The study was approved by the Ethics

* Corresponding author at: Dipt. Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma, via del Taglio 10, 43126 Parma, Italy. Tel.: +39 0521 032715; fax: +39 0521 032770.

E-mail address: kramerlh@unipr.it (L. Kramer).

Committee of the Veterinary Service of Las Palmas de Gran Canaria University and was carried out in accordance to current European legislation on animal protection.

Inclusion in the study was based on a positive result for circulating *D. immitis* antigens (PetChek1 HW PF, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA). Levels of plasma myoglobin and cardiac troponin I were measured according to Carretón et al. (2011). Recruited dogs were humanely euthanized.

Hearts were examined for the presence of macroscopic lesions. Nematodes were counted and parasite loads were divided into “low” (≤ 10 worms) and “high” (≥ 10 worms). The myocardium was sampled in the same position for all dogs, i.e. along the midline of the right ventricle free wall. Samples were fixed in 10% buffered formalin until processing.

2.2. Histology and immunohistochemistry

Tissues were embedded in paraffin and processed for histology and immunohistochemistry. Six-micron thick sections were placed on polylysine pre-treated slides. Tissue sections were stained with haematoxylin/eosin for routine histological examination. For immunohistochemistry, sections were incubated with an anti-human/canine myoglobin monoclonal antibody (product # M7773, Sigma–Aldrich, Madrid, SP) and an anti-human troponin I polyclonal antibody (product #PA1-86820, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Briefly, sections were pre-treated in a microwave oven for three 5 min cycles at 400 W; tissues for myoglobin immunohistochemistry were pre-treated in 0.1 M citrate buffer and tissues for cardiac troponin I immunohistochemistry were treated in 10 mM EDTA buffer. Endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation in 2% H₂O₂ for 10 min. Sections were incubated for 20 min with 10% swine serum and then incubated at room temperature for 60 min with primary antibodies diluted at 1:300 in 10% phosphate buffer solution (PBS). Slides were then treated with a secondary anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat Ig-biotinylated complex, rinsed and incubated with a Streptavidin–HRP complex (LSAB+System–HRP kit, Dako, Denmark). Washes were performed with PBS after each incubation step. Reactivity was revealed with 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution kit (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako, Denmark) and stopped with rinses of distilled water. Slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated with graded ethanol, cleared in xylene and then coverslipped. Negative controls were carried out by omitting the primary antibody.

3. Results

A total of 24 infected dogs were recruited for the study. All had detectable plasma levels of cardiac troponin I, while 13 of them showed levels of cardiac troponin I above the reference ranges for healthy dogs. 10 had detectable levels of myoglobin, being considered pathological in 5 of them according to Carretón et al. (2011). Table 1 summarizes the results of the measured biomarkers. Twelve dogs had low worm burdens, while 12 had more than

Table 1

Mean values of cardiac biomarkers in dogs with heartworm infection.

Cardiac biomarker	Results (mean $\pm$ standard deviation)
Myoglobin (n = 24)	<30 ng/ml (n = 14) ^a 54 ng/ml $\pm$ 2 ng/ml (n = 5) ^b 180.2 $\pm$ 205.2 ng/ml (n = 5) ^c
Cardiac troponin I (n = 24)	0.6 $\pm$ 0.3 ng/ml (n = 11) [*] 1.4 $\pm$ 0.2 ng/ml (n = 13) ^{**}

^a Dogs with undetectable levels of myoglobin.

^b Dogs with detectable non pathological levels of myoglobin.

^c Dogs with pathological values of myoglobin.

^{*} Dogs with normal values of cardiac troponin I.

^{**} Dogs with elevated values of cardiac troponin I.

10 adult worms in the pulmonary artery and right ventricle. None of the hearts showed macroscopic lesions at necropsy. The main histological feature in myocardial tissue from the right ventricle was focal necrosis. Patches of hypereosinophilic, necrotic myocardium were frequently observed (Fig. 1a, c and e), even though they were not present in all tissue samples from all dogs. Occasionally, neutrophilic inflammatory infiltrates could also be observed. Where necrosis was present, there was a consistent loss of staining for myoglobin (Fig. 1b) and cardiac troponin I (Fig. 1d and f). The loss was usually non-uniform in that some fibres showed complete loss with other fibres having varying degrees of incomplete loss. Some fibres clearly within the necrotic zone stained normally. There was no apparent association between worm burden and the presence of myocardial lesions; there was not a correlation in all the studied cases between the plasma levels of cardiac biomarkers and the presence of myocardial lesions either.

4. Discussion

CHWD is primarily a disease of the lungs. However, pulmonary hypertension, if not cured, inevitably leads to right-side congestive heart disease (McCall et al., 2008). The effects of pulmonary hypertension on the myocardium during HWD have not been widely studied in the dog. Wang et al. (2005) described changes in the extracellular matrix (ECM) of the right ventricle in *D. immitis*-infected dogs and reported that the ECM content of the heart was significantly reduced in and became fragmented and dissociated and suggested that the decreased collagen matrix may be an important factor contributes to the dilatation of the ventricle. No studies on myocardial proteins has been carried out, to the authors' knowledge.

A recent review in humans has reported that myocardial injury due to acute pulmonary embolism is characterized by myocyte lysis and inflammation. Chronic hypertension, on the other hand, features the release of components that may trigger apoptosis of cardiac myocytes and remodelling of the myocardium (Watts et al., 2010). During CHWD, both pulmonary embolism and chronic hypertension are present: intimal proliferation occurs in arteries occupied by living worms and embolic worm fragments from dead worms trigger thrombosis, both of which may completely obstruct segments of the pulmonary

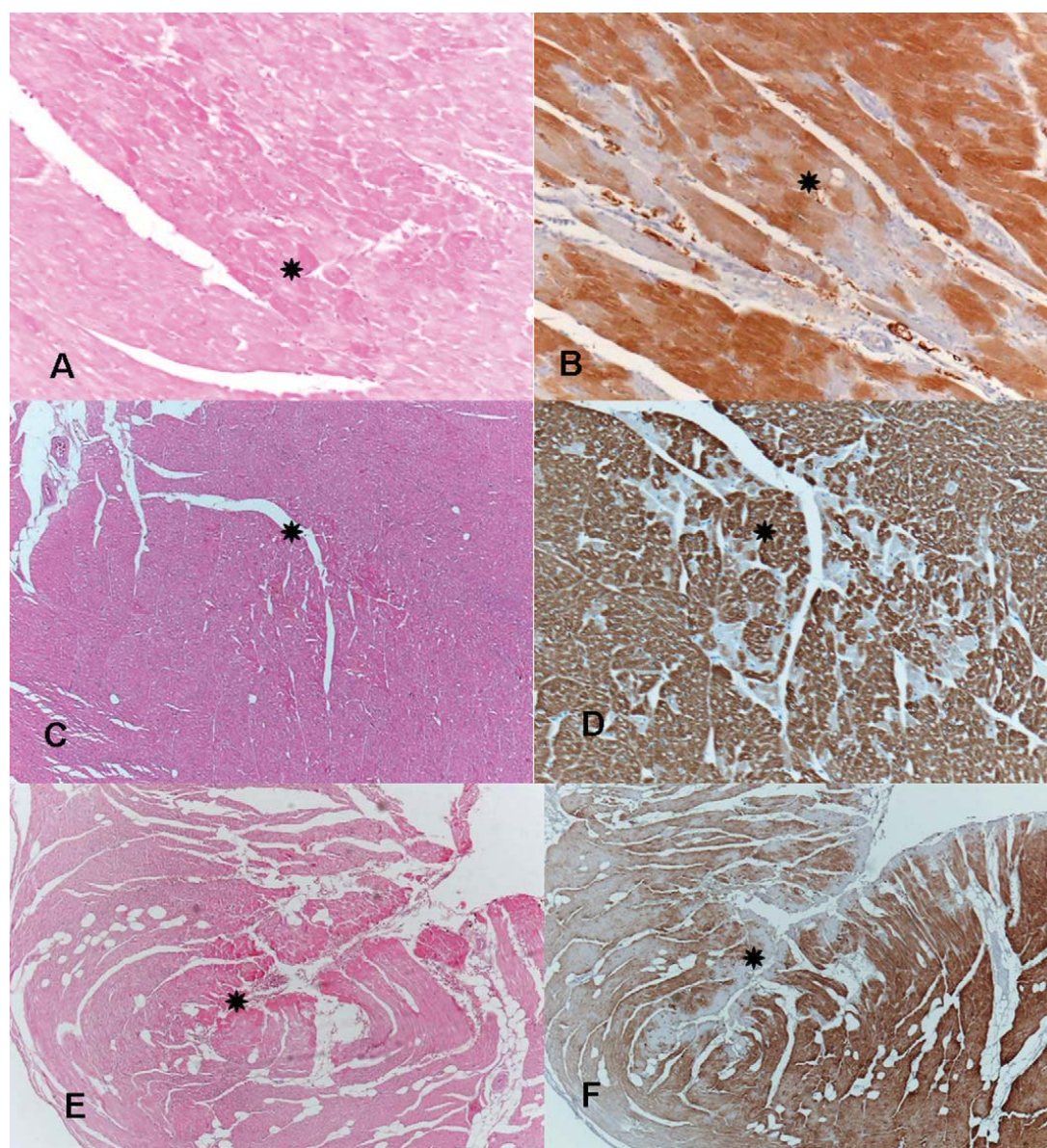


Fig. 1. (a–f) Sections of right ventricle from a dog with naturally acquired heartworm disease (HWD). (a) Note oedema and hyper eosinophilia of myocytes in zone of necrosis (asterisk) (H&E, 20 $\times$); (b) immunostaining for myoglobin in the same area, showing decreased staining of necrotic myocardium (40 $\times$); (c) note hyper eosinophilia of myocytes in the zone of necrosis (asterisk) (H&E, 10 $\times$); (d) immunostaining for myoglobin showing cell to cell variation in staining intensity for myoglobin (20 $\times$); (e) note hyper eosinophilia of myocytes in the zone of necrosis (asterisk) (H&E, 10 $\times$); (f) immunostaining for cardiac troponin T showing loss of staining intensity (10 $\times$).

arteries, thus giving rise to an increase in pulmonary pressure.

The use of markers of myocardial injury is widely used in human medicine (Singh et al., 2010). Even though the presence of cardiac troponins in plasma is highly specific for injury to cardiac myocytes, myoglobin is less specific and can also indicate skeletal muscle damage. Carretón et al. (2011) reported that approximately 40% of dogs with naturally acquired HWD showed plasma levels of circulating cardiac troponin I, while approximately 23% had increased concentrations of circulating myoglobin. Here, we wanted to verify the cardiac origin of these two proteins in order

to confirm their use during clinical workup in naturally infected dogs. Interestingly, loss of staining for myoglobin and cardiac troponin I was almost always associated with a necrotic lesion of the myocardium. This has also been reported by Fishbein et al. (2003) in a canine model of myocardial ischemia.

In the present study, 20.8% of dogs showed pathological plasma levels of myoglobin, while 54.1% showed values of cardiac troponin I above the reference ranges for healthy dogs (Carretón et al., 2011). The loss of staining for myoglobin and cardiac troponin I in the myocardial tissue was not correlated in all the cases with the

presence of high plasma levels of cardiac biomarkers. We did not find loss of staining of myoglobin or cardiac troponin I in 37.5% of the cardiac tissues from dogs with detectable and/or pathological values of myoglobin or elevated values of cardiac troponin I. This could be due to the fact that, because only a small fragment of myocardial tissue was processed for immunohistochemistry, the lesions that caused the increase of the biomarkers in plasma were not in the sampled tissue. Although levels of cardiac troponin I and myoglobin can rise in non-cardiac pathologies, such as renal failure or skeletal disorders (Haider and Stimson, 1999; Porciello et al., 2008; Sharkey et al., 2009), the dogs in our study did not show any evidence of any other pathology and, therefore, we attribute these alterations to the presence of *D. immitis*.

On the other hand, we observed several cases (16.6%) of loss of staining of myoglobin and/or cardiac troponin I in which the plasma levels of the cardiac biomarkers were within normal ranges. This could be due to inappropriate blood sampling; sampling was either too early or too late to detect the serum abnormality. Myoglobin increases within 1–3 h in the setting of myocardial necrosis, usually peaks within 6–9 h, and may become normal in <24 h (Sallach et al., 2004) while the cardiac troponin I appear later at 3–6 h after symptom onset and remain increased for 7–10 days (McCord et al., 2003).

There was no apparent association between worm burden and the presence of myocardial lesions. This could be limited by the fact that, because only a small fragment of myocardial tissue was processed for immunohistochemistry, the lesions could not be found in the sampled tissue. Besides, the severity of the pulmonary artery changes and the increase in pulmonary artery pressure is thought to be correlated mainly to the immune response that an individual dog has to the worms, more than the number of worms itself. One study found no relationship between worm number and pulmonary vascular resistance in a group of naturally infected dogs (Dillon et al., 1995). The amount of exercise a dog receives is also a factor. One study has shown that dogs that exercise develop more severe disease than do caged dogs (Dillon et al., 1995). Finally, the relative parasite load (number of worms/kg of body weight) might be more significant factor than the absolute parasite load in dogs of small size.

The results of the present study would confirm the use of this marker in the initial clinical evaluation and in the follow-up of dogs with CHWD.

Acknowledgements

The authors wish to thank Paola Gianelli and Chiara Cattabiani for excellent technical assistance. This research was partially supported by Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información, Gobierno de Canarias, Spain (co-financed by FSE funds).

References

- Boswood, A., 2009. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. *J. Vet. Cardiol. Suppl.* 1, S23–S32.
- Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A., 2011. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels. *Vet. Parasitol.* 176, 313–316.
- Collinson, P.O., Stubbs, P.J., Kessler, A.C., 2003. Multicentre Evaluation of Routine Immunoassay of Troponin T Study. Multicentre evaluation of the diagnostic value of cardiac troponin T CK-MB mass, and myoglobin for assessing patients with suspected acute coronary syndromes in routine clinical practice. *Heart* 89, 280–286.
- Dillon, A.R., Brawner, W.R., Hanrahan, L., 1995. Influence of number of parasites and exercise on the severity of heartworm disease in dogs. In: Soll, M.D., Knight, D.H. (Eds.), *Proceedings of the Heartworm Symposium '95*. American Heartworm Society, Batavia, IL, p. 113.
- Fishbein, M.C., Wang, T., Matijasevic, M., Hong, L., Apple, F.S., 2003. Myocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc. Pathol.* 12, 65–71.
- Haider, K.H., Stimson, W.H., 1999. Cardiac myofibrillar proteins: biochemical markers to estimate myocardial injury. *Mol. Cell. Biochem.* 194, 31–39.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* 66, 193–285.
- McCord, J., Nowak, R.M., Hudson, M.P., McCullough, P.A., Tomlanovich, M.C., Jacobsen, G., Tokarski, G., Khoury, N., Weaver, W.D., 2003. The prognostic significance of serial myoglobin, troponin I, and creatine kinase-MB measurements in patients evaluated in the emergency department for acute coronary syndrome. *Ann. Emerg. Med.* 42, 343–350.
- Porciello, F., Rishniw, M., Herndon, W.E., Biretoni, F., Antognoni, M.T., Simpson, K.W., 2008. Cardiac troponin I is elevated in dogs and cats with azotaemia renal failure and in dogs with non-cardiac systemic disease. *Aust. Vet. J.* 86, 390–394.
- Sallach, S.M., Nowak, R., Hudson, M.P., Tokarski, G., Khoury, N., Tomlanovich, M.C., Jacobsen, G., de Lemos, J.A., McCord, J., 2004. A change in serum myoglobin to detect acute myocardial infarction in patients with normal troponin I levels. *Am. J. Cardiol.* 94, 864–867.
- Sharkey, L.C., Berzina, I., Ferasin, L., Tobias, A.H., Lulich, J.P., Hegstad-Davies, R.L., 2009. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in dogs with renal failure. *JAVMA* 234, 767–770.
- Singh, V., Martinezclark, P., Pascual, M., Shaw, E.S., O'Neill, W.W., 2010. Cardiac biomarkers – the old and the new: a review. *Coronary Artery Dis.* 21, 244–256.
- Wang, J.S., Tung, K.C., Huang, C.C., Lai, C.H., 2005. Alteration of extracellular collagen matrix in the myocardium of canines infected with *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* 131, 261–265.
- Watts, J.A., Marchick, M.R., Kline, J.A., 2010. Right ventricular heart failure from pulmonary embolism: key distinctions from chronic pulmonary hypertension. *J. Card. Fail.* 16, 250–259.

Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs

E. Carretón^{a*}, R. Morchón^b, J. González-Miguel^b, M. C. Juste^a, F. Simón^b, J. A. Montoya-Alonso^a

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

^b Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy and Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, 37007, Salamanca, Spain.

*corresponding author

Elena Carretón

Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine

University of Las Palmas de Gran Canaria

35413 Arucas, Las Palmas, Spain

tel. +34 636024279

e-mail: ecarreton@becarios.ulpgc.es

Abstract

Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) is a parasitic disease of dogs and other carnivores, characterized by the presence of adult worms in the pulmonary arteries and right ventricle, leading to pulmonary hypertension which may progress to congestive heart failure. Cardiac biomarkers are biological parameters that can be objectively measured as indicators of pathological processes, or to assess the response to therapeutic interventions. To evaluate the myocardial damage during the adulticide treatment in 15 heartworm-infected dogs with ivermectin, doxycycline and melarsomine, measurements of cardiac troponin I (cTnI), myoglobin, MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB) and aspartate aminotransferase (AST) were carried out on days 0, 60 and afterwards weekly on days 67, 75, 82, 91, 106, 113 and 120. Dogs were divided by low parasite burden (n=9) and high parasite burden (n=6). On day 0, dogs with high worm burden showed increased cTnI concentrations (3.62 ± 4.78 ng/ml) while dogs with low worm burden had concentrations similar to those of healthy dogs (0.78 ± 0.22 ng/ml), CK-MB concentrations were increased only in dogs with high parasite burden as well (54.4 ± 54.2 U/l) and 26.6% (4/15) of the dogs showed pathological concentrations of myoglobin. On day 91, most dogs showed pathological concentrations of myoglobin, CK-MB and AST, probably due to the myositis associated to the intramuscular injection of melarsomine. The rest of the measurements made in the study, the biomarkers concentrations were within normal values, except for cTnI in dogs with high parasite burden, which remained above reference concentrations for healthy dogs during all the study. The evaluation of cardiac biomarkers seems to be a helpful test in the assessment of the myocardium in dogs with heartworm disease during the adulticide treatment.

Keywords

Dirofilaria immitis; heartworm disease; cardiac troponin I; CK-MB; myoglobin; myocardium

Introduction

Heartworm disease (HWD) is a zoonotic vector-borne disease caused by the filarial nematode *Dirofilaria immitis* and potentially life-threatening disease of dogs, cats and other carnivores, with an increasing worldwide distribution (Simón et al., 2012). The pathophysiologic response to heartworm infection is mainly due to the presence of adult worms in the pulmonary arteries, as well as the presence of microfilariae and the endosymbiotic bacteria *Wolbachia pipientis*. The infection is characterized by endoarteritis with intimal proliferation and thickening of the wall vessels, embolization of the smaller pulmonary arterioles-branches and pulmonary thromboembolisms caused by dead worms, all leading to pulmonary hypertension which, if not treated, may progress to congestive heart failure (McCall et al., 2008; Simón et al., 2012).

Cardiac-specific blood-based biomarkers are useful and routinely used in human and veterinary medicine. Biomarkers are defined as biological parameters that can be objectively measured and evaluated as indicators of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention (Vasan, 2006; Wells and Sleeper, 2008). In veterinary medicine, these biomarkers allow early detection of several cardiopulmonary diseases, confirmation of doubtful processes, and contribute to the establishment of prognosis and the decision on a specific treatment (Oyama and Sisson, 2004; Boswood, 2009).

Troponins are regulatory proteins that are part of the contractile apparatus of skeletal and cardiac muscle tissue. They are part of the thin filaments within the myofibrils and are essential for the calcium-mediated regulation of muscle contraction. The cardiac isoform of troponin I (cTnI) is uniquely expressed in the myocardium and has been widely recognized as highly sensitive and specific serum marker for the noninvasive diagnosis of increased myocyte permeability or necrosis in humans and animals (Wells and Sleeper, 2008).

Myoglobin is an oxygen-binding hemoglobin-like protein, present in the cardiac and skeletal muscle. Cell injury caused by inadequate tissue perfusion or trauma may lead to the release of myoglobin into the circulation and, due to its fast rise in serum, in human medicine it is used as an early diagnostic tool for acute myocardial infarction (Wright et al., 2011).

CK-MB, an isoenzyme of creatine kinase (CK), is a marker of myocardial cell

damage in humans and animals. Together with aspartate aminotransferase (AST), an enzyme released from necrotic cardiac myocytes, both were used for evaluating cardiac injury, although nowadays they have been replaced by more cardio-specific biomarkers (Schober et al., 1999; Dolci and Panteghini, 2006).

Recently, it has been reported that a significant number of dogs with naturally acquired HWD show an increase in plasma concentrations of myoglobin and cTnI (Carretón et al., 2011, 2012). The authors hypothesized that these elevated concentrations were due to damage to the myocardium as a result of right-side congestive heart disease caused by chronic pulmonary hypertension. However, this injury has never been evaluated during the adulticide treatment of HWD to the author's knowledge. The purpose of the present study was to assess the myocardial damage by the evaluation of biomarkers of myocardial integrity (cTnI, myoglobin, CK-MB, AST) in dogs infected by *D. immitis* during the adulticide treatment with ivermectin, doxycycline and melarsomine, following the American Heartworm Society's recommended protocol.

Material and Methods

15 client-owned dogs brought to the Veterinary Medicine Service of Las Palmas de Gran Canaria University were included in the study; ten were male and 5 were female and the age ranged from 2 to 7 years. All the owners gave their consent to participate in this study. The dogs lived on the island of Gran Canaria, a hyperendemic area of HWD (Montoya et al., 2011). Inclusion in the study was based on a positive result for circulating *D. immitis* antigens (PetChek® HW PF, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA). Dogs were further evaluated for the presence or absence of microfilariae using a modified Knott test.

Clinical examination, electrocardiogram (ECG), echocardiographic exam and thoracic radiographies were carried out in all dogs at the beginning and at the end of the study. Measurement of the heart size in the thoracic radiographs was determined using the vertebral heart score (VHS) according to Buchanan and Bücheler (1995); VHS reference ranges for healthy dogs are established as 9.7 ± 0.5 (Buchanan and Bücheler, 1995). As stated by Venco et al. (2003), echocardiographic findings and levels of circulating antigens were evaluated to estimate the worm burden, and according to the results the dogs were divided into two groups (divided by low or high parasite burden). The study was approved by the Ethics Committee of the Veterinary Medicine Service of Las Palmas de Gran Canaria University and was carried out in accordance to current European legislation on animal protection.

The dogs received adulticide treatment following the American Heartworm Society recommended management protocol (American Heartworm Society, 2012). Briefly, on

day 0 the dogs were diagnosed and verified as heartworm positive, started with monthly heartworm preventative based on ivermectin (6 µg/kg) and the administration of doxycycline (10 mg/kg BID) for 4 weeks. On day 60 the dogs were treated with the first intramuscular injection of melarsomine (2.5 mg/kg), followed on day 90 by a second injection, and a third injection on day 91. On day 120 the dogs were tested for presence of microfilariae and discharged. Moderate exercise restriction was recommended since the day 0 until day 60 and significant since day 60 until at least one month after the last melarsomine injection. No other medication was administrated during the treatment.

The blood sampling and measurements of cTnI, myoglobin, CK-MB and AST were done on day 0, day 60 and afterwards weekly the day 67, day 75, day 82, day 91, day 98, day 106, day 113 and day 120. Finally, the day 271 (6 months after completion), a test for detection of circulating antigens (PetChek® HW PF, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) and detection of microfilariae were done.

Measurement of cTnI was performed using heparinized blood, within 4 h of venipuncture, using the test Troponina I Easy Reader ® immunoassay system (Gernon Laboratories; Germany) and was processed using Vedalab Easy Reader ® (Veda.Lab diagnostics; Alençon, France) according to manufacturer instructions. The reference ranges established by our laboratory for healthy dogs were 0.71 ± 0.25 ng/ml.

Measurement of circulating myoglobin was performed using heparinized blood, within 4 h of venipuncture, using specific CARDIAC M ® immunoassay system (Cardiac Reader ® system, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to manufacturer instructions. The measuring range was 30–700 ng/ml; values below and above these ranges were displayed as negative and high, respectively. Reference ranges of myoglobin in healthy dogs on Cardiac Reader ® were established as <74 ng/ml (Burgener et al., 2006).

Measurement of CK-MB and AST were made by the spectrophotometric system Clima Plus® RA133000 (RAL S.A., Barcelona, Spain). Reference ranges by our laboratory for healthy dogs were established in <17.5 U/l and 23–66 U/l, respectively.

Statistical analysis

For data statistical analysis the IBM® SPSS® Statistics (version 19) was used throughout. Descriptive analyses of the variables were carried out using the test of proportions for qualitative variables and measurements of central tendency (mean), measures of dispersion (standard deviation; SD) for quantitative variables. For continuous variables we used the Kolmogorov–Smirnov test to check that the variables were normally distributed. The comparisons of absolute means between groups were

made with the T of Student test for normally distributed variables. Bivariate analyses of proportionality of distribution of categorical variables were estimated using the χ^2 test. A P value < 0.05 was determined as indicating significance.

Finally, the correlation between cTnI, myoglobin, CK-MB and AST concentrations in the different groups, by means of a Spearman rank correlation, was evaluated.

Results

Based on the modified Knott test results on day zero, 7 dogs (47%) showed microfilaremia and 8 (53%) were amicrofilaremic. On day 120, only one dog showed microfilaremia. On day 271, all dogs were negative to the antigen test and none of them revealed presence of microfilariae. On day zero, echocardiographic findings and analysis of the levels of circulating antigens suggest that 9 dogs (60%) were considered as having a low burden of heartworms (group 1) while 6 were considered to have a high burden (group 2).

On day zero, the mean concentration of cTnI in the heartworm-infected dogs was 1.92 ± 3.20 ng/ml. By groups, cTnI mean concentration was noticeably higher in the group 2 dogs (table 1). ECG exam was normal for all dogs from group 1, while 50% (3/6) of dogs from group 2 showed right branch bundle block and 16.6% (1/6) showed ST-segment elevation. VHS was 9.95 ± 0.4 for group 1 and 11.36 ± 0.9 for group 2. At the end of the treatment (day 120), no statistically significant differences were found between the concentrations of cTnI of group 1 and healthy dogs, while statistically significant differences were found between the concentrations of cTnI of dogs from group 2 and healthy dogs ($p < 0.05$) (Figure 1). The ECG exam showed persistence of the right branch bundle block in the 3 affected dogs. Vertebral heart score was 9.87 ± 0.47 for group 1 and 11.22 ± 0.83 for group 2. No statistically significant differences were found between VHS on day 0 and day 120 in each group.

On day 0, 26.6% (4/15) of dogs showed pathological levels of myoglobin with a mean concentration of 93.9 ± 13.5 ng/ml; of them, 42.8% (3/7) were microfilaremic and 12.5% (1/8) were amicrofilaremic dogs. Regarding the worm burden, 22.2% (2/9) of dogs with low parasite burden showed pathological concentrations of myoglobin versus 33.3% (2/6) of dogs with high burden. Afterwards, measurements were within normal ranges for all dogs during the rest of the treatment, except the day 91, when 73.3% (11/15) of dogs showed pathological levels of myoglobin, with a mean concentration of 194.6 ± 144.9 ng/ml.

The mean concentrations of cTnI, CK-MB and AST in all studied dogs are summarized in table 1. No correlation was found between cTnI and CK-MB, nor between cTnI and myoglobin, while there was a correlation between myoglobin and AST.

Discussion

In HWD, primary lesions occur in pulmonary arteries and lung parenchyma, causing pulmonary hypertension that can progress to right-sided heart failure (McCall et al., 2008). Rawlings and Lewis (1977) demonstrated that the right ventricle of dogs appears to dilate in response to *D. immitis* infestation. Furthermore, a decrease in extracellular collagen matrix has been observed in the myocardium of heartworm-infected dogs that may contribute to ventricle dilatation, thereby markedly affecting the systolic and diastolic functions of the heart (Wang et al., 2005).

Cardiac troponin I is a sensitive and specific marker of myocardial injury and has been measured in a multitude of different situations in veterinary medicine to evaluate the effects of both cardiac and extracardiac diseases on myocardial integrity (Oyama and Sisson, 2004; Wells and Sleeper, 2008; Boswood, 2009). Humans and small animals with chronic heart failure have mild increases of troponin consistent with chronic, low-level and persistent myocardial damage, which can be used to monitor progression and provide prognosis information (Ricchiuti et al., 1998, Oyama and Sisson, 2004, Newby et al., 2012). Likewise, dog and human patients with pulmonary hypertension can show increased concentrations of cTnI, while it has been demonstrated that troponin is more likely to be elevated in those with right ventricular dysfunction (Logeart et al., 2007; Guglielmini et al., 2010; Andersen et al., 2012; Newby et al., 2012). Recently, a few studies showed increased concentrations of cTnI in dogs with HWD, suggestive of myocardial damage (Carretón et al., 2011, 2012; Gazyagci et al., 2011) and an immunohistochemical study showed that pathological levels of cTnI were associated with loss of cTnI along with focal necrosis and inflammatory infiltrates in myocardial tissue from dogs with HWD, concluding that increased concentrations of cTnI was indicative of myocardial damage in these dogs (Carretón et al., 2012). In this study, the dogs from group 2 (high worm burden) showed increased concentrations of cTnI, when compared to reference values for healthy dogs. These results, along with the presence of ECG alterations and VHS larger than normal ranges, may indicate presence of myocardial injury. On the other hand, dogs with low worm burden showed concentrations of cTnI similar to that of healthy dogs. Also, lack of ECG alterations and normal VHS suggest an absence of significant myocardial damage. Oddly, Carretón et al., (2012) found no apparent association between worm burden and the presence of myocardial lesions; the authors hypothesized that because only a small fragment of myocardial tissue was processed for immunohistochemistry, the lesions may not be found in the sampled tissue, or that the severity of the pulmonary artery changes and the increase in pulmonary artery pressure may be correlated mainly to the immune response that an individual dog has to the worms, more than the number of worms itself.

Although there is little evidence in the veterinary literature of changes in troponin

concentrations as indicators of response to therapy, in humans with heart failure troponin concentrations often return to normal after successful treatment of the acute episode, suggesting that troponins can be used to monitor the clinical course of disease (Horwich et al., 2003; Newby et al., 2012). In this study, from day 60 of treatment, concentrations of cTnI decreased in all dogs, especially in those with high worm burden. In these dogs, the levels of cTnI remain above the reference ranges for healthy dogs in all measurements, although at the end of the treatment (day 120), got to their lowest concentrations. Apparently, as the pathology disappears, there is an improvement in the concentrations of cTnI, although the myocardial damage appears to persist. On the other hand, the dogs with low worm burden showed normal concentrations of cTnI at all the time points, which indicates that there was no significant myocardial damage during the adulticide treatment within this group.

On day 91, 24 hours after the second intramuscular injection of melarsomine, there was a slight increase in the concentrations of cTnI in dogs from group 2 (high worm burden). Cardiac troponin I is highly specific for myocardial damage and cardiac troponin concentrations are generally not affected by nonspecific types of skeletal muscle damage, including trauma, intramuscular injections, or strenuous exercise, except when evidence of cardiac injury is present (Adams et al., 1993; Shelton, 2010). Apparently, cardiomyopathy and, therefore, elevations of cTnI are usually concurrent with muscle disease in veterinary patients (Valentine et al., 1989; Gaschen et al., 1999; Warman et al., 2008; Wells et al., 2009). According to this, the cTnI concentrations measured on day 91 may become from damaged myocardium in this dogs.

On day zero, serum concentrations of CK-MB of dogs from group 2 were pathologically increased; afterwards the concentrations decreased and remained in levels close to normal ranges. Dogs from group 1 showed normal concentrations of CK-MB during the entire time of the treatment. Kitagawa et al. (1991) reported high levels of CK-MB in heartworm-infected dogs, observing that the concentrations were higher in dogs which showed more severe disease. Cury et al. (2005) also reported elevations in CK-MB concentrations in dogs with *Angiostrongylus vasorum*, whose adult worms lodge in pulmonary arteries and right ventricle as well.

There is an exception on day 91, when CK-MB concentrations rise dramatically in both groups. CK-MB is a marker of myocardial cell damage; however, skeletal muscle injury can also result in increased CK-MB (Schober et al., 1999; Dolci and Panteghini, 2006). Therefore, the myositis caused by the injection of melarsomine administered 24 hours before, could have affected CK-MB concentrations in these cases. Due to the lack of biological specificity of this marker, no conclusion could be reached about what may have caused the release of this enzyme.

No correlation was found between cTnI and CK-MB concentrations during the treatment. This could be due to the different kinetics of each biomarker. Although the release and peak kinetics of cTnI and CK-MB are similar in myocardial infarction (Apple and Murakami, 2005), CK-MB and cTnI fall to the reference interval within 48–72 hours and 7 to 10 days, respectively. As in humans, in veterinary medicine the diagnostic sensitivity of CK-MB is lower when compared with cTnI, as reported by different authors (Diniz et al. 2007; Bakirel and Gunes, 2009). Furthermore, CK-MB is also expressed in intestines, spleen and lungs; therefore the cardiac specificity of this biomarker is lower than cTnI (Aktas et al., 1993; Dolci and Panteghini, 2006).

Myoglobin may come from both cardiac and skeletal muscle. Detection of elevated plasma myoglobin in dogs is not considered clinically useful due to its low specificity and rapid elimination. This is why an increase in myoglobin plasma values is not specific for cardiac damage in the dog. In veterinary medicine, there are several studies that show elevated levels of myoglobin in dogs with cardiac damage in a range of pathologies, such as gastric dilatation-volvulus, blunt chest trauma, and systemic hypotension (Spangenthal and Ellis, 1995; Burgener et al., 2006; Adamik et al., 2009). In a previous study, 23% of dogs with HWD showed pathological concentrations of myoglobin, especially the microfilaremic dogs. Similar results are found in the present study, in which 26.6% of the dogs showed pathological concentrations of myoglobin, being more frequently observed in those with microfilaremia. The previously cited immunohistochemical study by Carretón et al. (2012) showed that increased levels of myoglobin matched with loss of staining for myoglobin and areas of necrosis in myocardial tissue of dogs with HWD.

The myoglobin values were within the normal range in all dogs during the rest of the treatment, except on day 91, when 73.3% of the dogs show pathological concentrations of myoglobin. This may probably be due to the myositis caused by the intramuscular injection of melarsomine administered 24 hours before. The rise of myoglobin by muscular damage caused by the melarsomine may be supported by the pathological elevations of AST observed on day 91 as well.

AST is released from necrotic cardiac myocytes, but is ubiquitously found in liver, skeletal muscle and other tissues, so it could be released after the myositis caused by the injection of melarsomine (Dolci and Panteghini, 2006). The rest of the treatment remains within normal values, being only slightly increased on day 0 in dogs from group 2. Other authors have reported increased levels of AST in heartworm-infected dogs (Kitoh et al., 1994; Niwetpathomwat et al., 2007; Aslan et al., 2010).

Finally, we would like to remark the fact that all measured biomarkers decrease

on day 60, after treatment with doxycycline and ivermectin. This could be due to the elimination of *Wolbachia* and reduction of microfilariae, which may reduce the vascular inflammation and, therefore, reduce the severity of the disease. Data exist to support the potential role of *Wolbachia* spp in the development of the inflammatory reaction associated with heartworm disease in dogs and cats (Kramer et al., 2005, 2008). Similar results were found in other studies in dogs with HWD, where reduction of AST levels after treatment with ivermectin were found (Aslan et al., 2010), and reduction of D-dimer concentrations after treatment with doxycycline and ivermectin (Carretón et al., in press).

In conclusion, the evaluation of cardiac biomarkers appears to be a supportive test in the monitoring and evaluation of the myocardial integrity during adulticide treatment of HWD. These are preliminary results and further studies should be carried out to obtain more reliable data on the monitoring, assessment of the therapy and prognostic capacity of these molecules.

Acknowledgements

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

References

- Adamik, K.N., Burgener, I.A., Kovacevic, A., Schulze, S.P., Kohn, B., 2009. Myoglobin as a prognostic indicator for outcome in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 19, 247-53.
- Adams, J.E., Bodor, G.S., Dávila-Román, V.G., Delmez, J.A., Apple, F.S., Ladenson, J.H., Jaffe, A.S., 1993. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation.* 88, 101-106.
- Aktas, M., Auguste, D., Lefebvre, H.P., Toutain, P.L., Braun, J.P., 1993. Creatine kinase in the dog: a review. *Vet. Res. Commun.* 17, 353-369.
- American Heartworm Society, 2012. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs (2012). Available at: <http://www.heartwormsociety.org> (accessed 29.01.13)
- Andersen, C.U., Mellekjær, S., Nielsen-Kudsk, J.E., Bendstrup, E., Simonsen, U., Hilberg, O., 2012. Diagnostic and prognostic role of biomarkers for pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *Respir. Med.* 106, 1749-1755.

Apple, F.S., Murakami, M.M., 2005. Cardiac troponin and creatine kinase MB monitoring during in-hospital myocardial reinfarction. Clin. Chem. 51, 460–463.

Aslan, O., Yildirim, A., Kanbur, M., Altinordu, S., 2010. Detection of some biochemical and lipid peroxidation parameters in *Dirofilaria immitis* infected dogs. J. Anim. Vet. Adv. 9, 954-957.

Bakirel, U., Gunes, S., 2009. Value of cardiac markers in dogs with chronic mitral valve disease. Acta Vet-Beograd. 59, 223-229.

Boswood, A., 2009. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. J. Vet. Cardiol. 11 (Suppl 1), S23-32.

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

Burgener, I.A., Kovacevic, A., Mauldin, G.N., Lombard, C.W., 2006. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. J. Vet. Intern. Med. 20, 277-283.

Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Morchón, R., Simón, F., Montoya- Alonso, J.A., 2011. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels. Vet. Parasitol. 176, 313–316.

Carretón, E., Grandi, G., Morchón, R., Simón, F., Passeri, B., Cantoni, A.M., Kramer, L., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs. Vet. Parasitol. 189, 390-393.

Carretón, E., Morchón, R., González-Miguel, J., Simón, F., Juste, M.C., Montoya-Alonso, J.A. Variation of D-dimer values as assessment of pulmonary thromboembolism during adulticide treatment of heartworm disease in dogs. Vet Paras. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.005>

Cury, M.C., Guimarães, M.P., Lima, W.S., Caldeira, M.C., Couto, T.R., Murta, K., Carvalho, M.G., Baptista, J.M., 2005. Biochemical serum profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). Vet. Parasitol. 128, 121-127.

Diniz, P.P.V.P., Schwartz, D.S., Collicchio-Zuanaze, R.C., 2007. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dogs: two case reports. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 85-89.

Dolci, A., Panteghini, M., 2006. The exciting story of cardiac biomarkers: from retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more. *Clin. Chim. Acta.* 369, 179-187.

Gaschen, L., Lang, J., Lin, S., Adé-Damilano, M., Busato, A., Lombard, C.W., Gaschen, F.P., 1999. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 346-356.

Gazyagci, S., Dogru, M.T., Yagci, B.B., 2011. Cardiac troponin I levels in dogs with dirofilariosis and without dirofilariosis. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 6, 738-743.

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

Horwich, T.B., Patel, J., MacLellan, W.R., Fonarow, G.C., 2003. Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure. *Circulation* 108, 833–838.

Kitagawa, H., Kano, M., Sasaki, Y., Hirano, Y., 1991. Serum creatine kinase activities in dogs with dirofilariasis. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 569-575.

Kitoh, K., Watoh, K., Chaya, K., Kitagawa, H., Sasaki, Y., 1994. Clinical, hematologic, and biochemical findings in dogs after induction of shock by injection of heartworm extract. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1535-1541.

Kramer, L., Grandi, G., Leoni, M., Passeri, B., McCall, J., Genchi, C., Mortarino, M., Bazzocchi, C., 2008. *Wolbachia* and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Parasitol.* 158, 191-195.

Kramer, L., Simon, F., Tamarozzi, F., Genchi, M., Bazzocchi, C., 2005. Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? *Vet. Parasitol.* 133, 133–136.

Logeart, D., Lecuyer, L., Thabut, G., Tabet, J.Y., Tartièrre, J.M., Chavelas, C., Bonnin, F., Stievenart, J.L., Solal, A.C., 2007. Biomarker-based strategy for screening right ventricular dysfunction in patients with non-massive pulmonary embolism. *Intensive Care Med.* 33, 286-292.

McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm

disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.* 66, 193-285.

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

Newby, L.K., Jesse, R.L., Babb, J.D., Christenson, R.H., De Fer, T.M., Diamond, G.A., Fesmire, F.M., Geraci, S.A., Gersh, B.J., Larsen, G.C., Kaul, S., McKay, C.R., Philippides, G.J., Weintraub, W.S., 2012. ACCF 2012 expert consensus document on practical clinical considerations in the interpretation of troponin elevations: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on clinical expert consensus documents. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 2427-2463.

Niwetpathomwat, A., Kaewthamasorn, M., Tiawsirisup, S., Techangamsuwan, S., Suvarnvibhaja, S., 2007. A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. *Res. Vet. Sci.* 82, 364-369.

Oyama, M.A., Sisson, D.D., 2004. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 831-839.

Rawlings, C.A., Lewis, R.E., 1977. Right ventricular enlargement in heartworm disease. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1801-1805.

Ricchiuti, V., Sharkey, S.W., Murakami, M.M., Voss, M.M., Apple, F.S., 1998. Cardiac troponin I and T alteration in dogs hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. *Am. J. Clin. Pathol.* 110, 241–247.

Schober, K.E., Kirbach, B., Oechtering, G., 1999. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. *J. Vet. Cardiol.* 1, 17-25.

Shelton, G.D., 2010. Routine and specialized laboratory testing for the diagnosis of neuromuscular diseases in dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 39, 278-295.

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

Spangenthal, E.J., Ellis, A.K., 1995. Cardiac and skeletal muscle myoglobin release after reperfusion of injured myocardium in dogs with systemic hypotension. *Circulation.* 91,

2635-2641.

Valentine, B.A., Cummings, J.F., Cooper, B.J., 1989. Development of Duchenne-type cardiomyopathy. Morphologic studies in a canine model. *Am. J. Pathol.* 135, 671-678.

Vasan, R.S., 2006. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 113, 2335-2362.

Venco, L., Genchi, C., Vigevani Colson, P., Kramer, L., 2003. Relative utility of echocardiography, radiography, serologic testing and microfilariae counts to predict adult worm burden in dogs naturally infected with heartworms. In: Seward, R.L., Knight, D.H. (Eds.), *Recent Advances in Heartworm Disease, Symposium '01*. American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 111– 124.

Wang, J.S., Tung, K.C., Huang, C.C., Lai, C.H., 2005. Alteration of extracellular collagen matrix in the myocardium of canines infected with *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* 131, 261-265.

Warman, S., Pearson, G., Barrett, E., Shelton, G.D., 2008. Dilatation of the right atrium in a dog with polymyositis and myocarditis. *J. Small Anim. Pract.* 49, 302-305.

Wells, R.J., Sedacca, C.D., Aman, A.M., Hackett, T.B., Twedt, D.C., Shelton, G.D., 2009. Successful management of a dog that had severe rhabdomyolysis with myocardial and respiratory failure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 1049-1054.

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

Wright, R.S., Anderson, J.L., Adams, C.D., Bridges, C.R., Casey, D.E., Ettinger, S.M., Fesmire, F.M., Ganiats, T.G., Jneid, H., Lincoff, A.M., Peterson, E.D., Philippides, G.J., Theroux, P., Wenger, N.K., Zidar, J.P., Anderson, J.L., Adams, C.D., Antman, E.M., Bridges, C.R., Califf, R.M., Casey, D.E., Chavey, W.E., Fesmire, F.M., Hochman, J.S., Levin, T.N., Lincoff, A.M., Peterson, E.D., Theroux, P., Wenger, N.K., Zidar, J.P., 2011. 2011 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients with Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in collaboration with the American Academy of Family Physicians, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, 215-367.

Tables

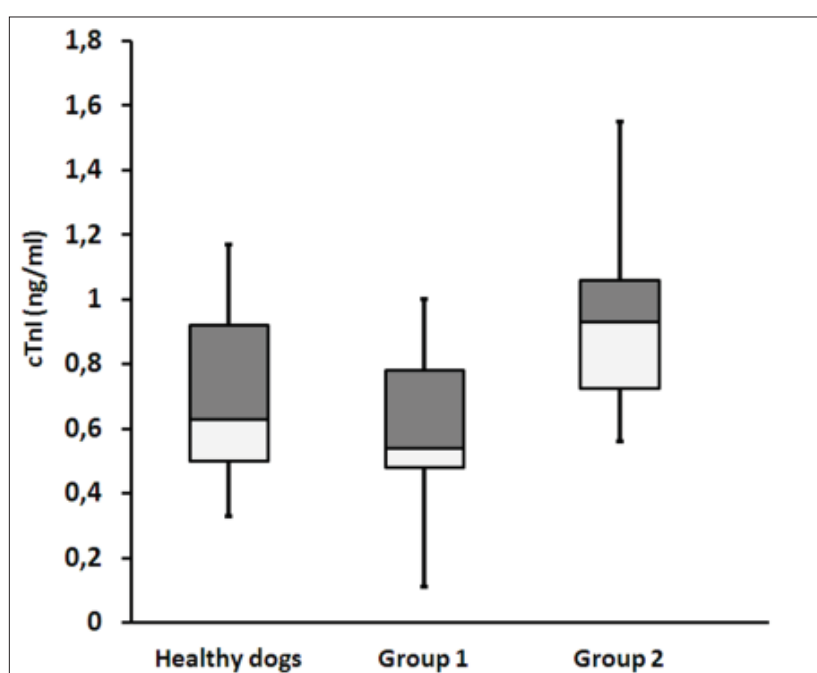
Table 1.

Mean values of cTnI, CK-MB and AST for group 1 (low worm burden) and group 2 (high worm burden) during the treatment. Data are shown as the mean±standard deviation. The asterisk (*) refers to the first intramuscular injection of melarsomine and the two asterisks (**) refers to the second (day 90) and third (day 91) intramuscular injections of melarsomine. Significant differences between dogs with high and low worm burden are designates with a black triangle (▲) ($p<0.001$) and a black square (■) ($p<0.05$).

	High Burden	Low Burden	High Burden	Low Burden	High Burden	Low Burden
	cTnI (ng/ml)		CK-MB (U/l)		AST (U/l)	
Day 0	3.62±4.78	0.78±0.22▲	54.4±54.2	18.1±6.7▲	62.3±53.7	27.0±12.7■
Day 60*	1.62±1.11	0.56±0.22▲	22.0±21.7	13.9±5.0	22.8±11.5	20.5±9.4
Day 67	1.00±0.23	0.65±0.25	17.9±8.3	14.9±4.3	23.5±9.9	26.5±11.0
Day 75	1.48±0.82	0.73±0.45■	19.7±7.7	19.1±6.4	25.6±13.8	28.5±8.4
Day 82	1.22±0.65	0.59±0.35■	15.6±6.1	17.2±8.7	31.3±14.8	28.4±7.4
Day 91**	1.89±1.48	0.78±0.76▲	84.5±57.1	61.8±40.2■	293.3±395.1	191.8±179.8▲
Day 98	1.20±0.63	0.73±0.24	20.0±10.3	16.2±7.1	49.6±13.1	36.6±25.6
Day 106	1.22±0.62	0.70±0.42■	16.1±5.1	14.8±4.8	35.8±22.4	31.5±18.6
Day 113	0.98±0.59	0.72±0.28	19.1±4.1	15.3±8.3	21.6±7.8	23.0±8.4
Day 120	0.95±0.35	0.58±0.28	21.9±6.7	18.7±8.5	19.8±9.0	22.4±9.4

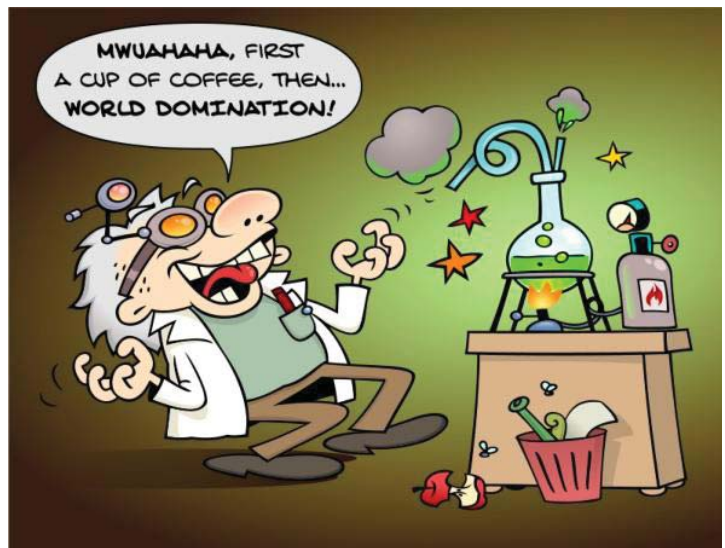
Figure captions**Figure 1.**

Box-and-wisker plot of cardiac troponin I (cTnI) concentrations in healthy dogs, group 1 (low worm burden) and group 2 (high worm burden) on day 120 of the study (end of treatment). The boxplots represent median (solid vertical lines within boxes) and distribution of the cTnI in each group. Significant differences between healthy dogs and dogs from group 2 ($p<0.05$) were found, but not between healthy dogs and dogs from group 1.





CONCLUSIONES CONCLUSIONS



Conclusiones

1. Se observaron elevaciones patológicas de los valores serológicos de los biomarcadores de daño cardiopulmonar estudiados en perros con dirofilariosis y se comprobó su utilidad para establecer el estado clínico de la enfermedad y emitir un pronóstico preciso.
2. Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se evidenció la presencia de depósitos de dímero-D en tejido pulmonar y renal de perros infestados por *Dirofilaria immitis*, asociado a tromboembolismo pulmonar y a la presencia de microfilarias. Estos depósitos se asociaron a valores serológicos elevados de esta proteína.
3. La medición serológica de dímero-D es una herramienta válida para la determinación de tromboembolismo pulmonar en perros con dirofilariosis durante el tratamiento adulticida siguiendo el protocolo recomendado por la American Heartworm Society.
4. Mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas, se evidenció la pérdida intracelular de troponina I cardíaca y mioglobina en tejido miocárdico, que se correlacionó con elevaciones serológicas de ambas proteínas, en perros afectados por dirofilariosis cardiopulmonar.
5. La medición serológica de troponina I cardíaca y mioglobina es útil para monitorizar la integridad miocárdica en perros con *D. immitis* durante el tratamiento adulticida recomendado por la American Heartworm Society.

Conclusions

1. Pathological elevations of serum levels of the studied cardiopulmonary biomarkers were observed in dogs with heartworm disease, and its utility in the establishment of the clinical condition and the prognosis of the disease was proved.
2. By using immunohistochemical techniques, deposits of D-dimer in lungs and kidneys of dogs affected by *Dirofilaria immitis* were observed, associated with pulmonary thromboembolisms and microfilaremic status. Furthermore, there was an association between increased serum values of D-dimer and positive staining in immunohistochemistry.
3. The measurement of serum D-dimer appears to be a supportive test to assess and monitor the presence of pulmonary thromboembolism in dogs with heartworm disease during the adulticide treatment of heartworm disease, following the American Heartworm Society recommended management protocol.
4. By immunohistochemical techniques, it was observed a loss of staining of intracellular cardiac troponin I and myoglobin in the myocardium of heartworm-infected dogs, which was associated with serum elevations of both proteins, in dogs with heartworm disease.
5. The determination of serum cardiac troponin I and myoglobin appears to be a helpful test in the monitoring and evaluation of the myocardial integrity of dogs infected by *D. immitis*, during the adulticide treatment following the American Heartworm Society recommended management protocol.

VI

RESUMEN SUMMARY



I'm a doctor, I'm not a scientist or a physicist, Mr. Spock..."
(Leonard McCoy, Star Trek)

Resumen

La dirofilariosis cardiopulmonar canina es una enfermedad parasitaria producida por *Dirofilaria immitis*. La respuesta fisiopatológica a la enfermedad se debe principalmente a la presencia de los parásitos adultos en las arterias pulmonares y ventrículo derecho; los parásitos vivos en contacto con la arteria producen endoarteritis pulmonar proliferativa y rigidez arterial con disminución de la luz, mientras que los parásitos muertos provocan tromboembolismo pulmonar. Estos procesos conducen al desarrollo de hipertensión pulmonar; ésta, si no se corrige, provocará insuficiencia cardíaca congestiva derecha. Además, durante el tratamiento adulticida, es inevitable la formación de tromboembolismos pulmonares por la muerte de los parásitos. Los marcadores de daño cardiopulmonar son parámetros biológicos que pueden ser medidos de forma objetiva, como indicadores de procesos patológicos o para evaluar la respuesta a un determinado tratamiento terapéutico. En medicina humana se emplean de forma rutinaria para la detección y el pronóstico de patologías cardiorrespiratorias. En medicina veterinaria, permiten la detección temprana de enfermedades cardiovasculares, confirmar casos dudosos o difíciles de diagnosticar, y contribuyen al establecimiento del pronóstico y a la hora de escoger un determinado tratamiento, así como evaluar la eficacia del mismo. El objetivo de esta tesis fue evaluar serológicamente e inmunohistoquímicamente los biomarcadores de daño cardiopulmonar troponina T cardíaca, troponina I cardíaca, mioglobina y dímero-D en el diagnóstico, evaluación y pronóstico de la dirofilariosis cardiopulmonar canina, así como valorar su utilidad en la monitorización del paciente durante el tratamiento adulticida empleando el protocolo recomendado por la American Heartworm Society. Para ello, se hicieron mediciones iniciales de estos marcadores en suero de 75 perros con dirofilariosis. Además, se tomaron muestras de tejido pulmonar y renal de 45 perros, y muestras de tejido miocárdico del ventrículo derecho de 24 perros infectados por *Dirofilaria immitis*, para realizar estudios de inmunohistoquímica. Finalmente, se evaluaron 15 perros (9 con baja carga parasitaria y 6 con elevada carga parasitaria) durante el tratamiento adulticida con ivermectina, doxiciclina y melarsomina, haciendo mediciones semanales de biomarcadores hasta la finalización del mismo.

Como resultado, se observó que los perros infectados por *D.immitis* mostraron valores normales de troponina T (<0.1 ng/ml), mientras que los valores de troponina I

estaban ligeramente elevados en perros con dirofilariosis (1.23 ± 0.8 ng/ml y 1.2 ± 0.4 ng/ml en amicrofilarémicos y filarémicos, respectivamente) respecto a los perros sanos (0.9 ± 0.3 ng/ml), lo que indica la posible presencia de daño miocárdico menor en perros con dirofilariosis. Igualmente, 23% de los perros presentaban elevaciones de mioglobina (>74 ng/ml), cuyo origen podría ser esquelético o cardíaco. El 47% de los perros presentaban valores patológicos de dímero-D (>0.2 µg/ml), probablemente debido a complicaciones tromboembólicas derivadas de la muerte natural de las filarias. En los estudios de inmunohistoquímica, se pudo observar pérdidas intracelulares focales de troponina I y mioglobina en el miocardio de perros con dirofilariosis en áreas con signos histológicos de inflamación y/o necrosis, junto con elevaciones serológicas de estas proteínas en la mayoría de los casos, confirmando la presencia de daño miocárdico en esta enfermedad. Por otro lado, se observaron depósitos de dímero-D en tejido pulmonar y glomerulos renales de perros con dirofilariosis, coincidiendo con valores elevados serológicos del mismo, lo que confirma la utilidad del dímero-D para evaluar la presencia de fenómenos tromboembólicos en esta patología.

Por último, durante el tratamiento adulticida, se observó que los valores de troponina I, mioglobina y dímero-D se normalizaban en casi todos los casos tras el tratamiento previo con ivermectina y doxiciclina (día 60). Una vez iniciado el tratamiento con melarsamina, los valores de dímero-D se elevan coincidiendo con la muerte de los parásitos, especialmente los perros con elevada carga parasitaria, para normalizarse en todos los perros al final del tratamiento. Los valores de troponina I permanecieron en valores normales durante todo el tratamiento en perros con baja carga parasitaria, mientras que en perros con elevada carga parasitaria permanecieron por encima de los valores de referencia para perros sanos durante todo el estudio. Los valores de mioglobina permanecieron normales a partir del día 60, excepto el día 91 (3ª dosis de melarsamina), donde presentaba elevaciones patológicas en la mayoría de los perros, probablemente debido a la miositis provocada por la inyección intramuscular de melarsomina el día anterior.

En conclusión, los biomarcadores de daño cardiopulmonar troponina I cardíaca, mioglobina y dímero-D, son herramientas complementarias, no invasivas, rápidas y fáciles de determinar, útiles a la hora de evaluar el estado clínico del perro con dirofilariosis, establecer un pronóstico y monitorizar el tratamiento adulticida en perros infectados por *Dirofilaria immitis*.

Palabras clave:

Dirofilaria immitis, dirofilariosis canina, biomarcadores cardiopulmonares, troponinas cardíacas, mioglobina, dímero-D

Summary

Canine cardiopulmonary dirofilariasis is a parasitic disease caused by *D.immitis*. The pathophysiological response is mainly due to the presence of adult worms in the pulmonary arteries and right ventricle. The contact between the live worms and the intima of the pulmonary arteries leads to proliferative endoarteritis and thickening of the walls of these vessels causing obliterative endarteritis of small peripheral branches, while the arteries become stiffer; moreover, dead parasites cause pulmonary thromboembolism. These processes lead to pulmonary hypertension, that if not treated progresses to congestive right heart failure. Furthermore, during the adulticide treatment, pulmonary thromboembolism is an inevitable consequence of successful adulticide therapy. Cardiopulmonary biomarkers are biological parameters that can be objectively measured and quantified as indicators of pathogenic processes or as indicators of response to therapeutic intervention. The use of these biomarkers is a regular practice in human medicine for detection and prognosis of cardiovascular diseases. In veterinary medicine, they allow early detection of cardiopulmonary diseases, confirm doubtful cases and processes, and contribute to the establishment of prognosis and the decision on a specific treatment, as well as evaluate its effectiveness. The aim of this thesis was to determine the serum levels and immunohistochemical evaluation of the cardiopulmonary biomarkers cardiac troponin T, cardiac troponin I, myoglobin and D-dimer in the diagnosis, evaluation and prognosis of canine cardiopulmonary dirofilariasis, as well as assess its utility in the monitoring and evaluation of the dog during the adulticide treatment of *D.immitis* following the protocol recommended by the American Heartworm Society. For this purpose, initial measurements of circulating biomarkers were performed in serum of heartworm-infected dogs. Moreover, samples of pulmonary and renal tissues of 45 dogs were taken, as well as samples of myocardial tissue from the right ventricle of 24 dogs, infected by *D.immitis*, to perform immunohistochemical studies. Finally, 15 dogs were evaluated (9 dogs with low parasite burden and 6 with high burden) during the adulticide treatment with ivermectin, doxycycline and melarsomine, carrying out weekly measurements of biomarkers until completion of the treatment.

As result, heartworm-infected dogs showed normal levels of cardiac troponin T (<0.1 ng/ml), while levels of cardiac troponin I were slightly higher in heartworm-infected dogs (1.23 ± 0.8 ng/ml and 1.2 ± 0.4 ng/ml in amicrofilaremic and microfilaremic

dogs, respectively) when compared to healthy dogs (0.9 ± 0.3 ng/ml), which may indicate the presence of minor myocardial damage in dogs positive for heartworm antigen. Likewise, elevated circulating myoglobin (>74 ng/ml) was found in 23% of dogs, which may come from both cardiac and skeletal muscle. Elevated D-dimer levels (>0.2 μ g/ml) were detected in 47% of heartworm-infected dogs, probably due to the thromboembolic complications caused by the *D. immitis* infection and natural death of the worms. The immunohistochemical studies showed intracellular loss of staining for myoglobin and cardiac troponin I in the myocardium of dogs infected by *D. immitis*, together with areas of focal necrosis and/or inflammatory infiltrates, and serum biomarkers above the reference ranges for healthy dogs in most cases, which confirmed myocardial damage in dogs affected by heartworm disease. On the other hand, deposits of D-dimer in pulmonary and renal tissue of heartworm-infected dogs were observed, concurring with elevated serum levels of this marker, which confirms the utility of D-dimer to evaluate the presence of thromboembolic events in this disease.

Finally, during the adulticide treatment, levels of cardiac troponin I, myoglobin and D-dimer decreased, being within normal ranges in almost all dogs after treatment with ivermectine and doxycycline (day 60). Once the treatment with melarsomine started, the levels of D-dimer raised concurring with the death of the adult worms, especially in those dogs with high parasite burden, normalizing afterwards at the end of the treatment. Levels of cardiac troponin I remained within normal ranges during the treatment in dogs with low parasite burden, while dogs with high parasite burden presented levels of troponin I above the reference ranges for healthy dogs during all the study. Myoglobin levels remained within normal ranges from day 60 until the end of the treatment, except on day 91 (3rd dose of melarsomine), when most of the dogs showed pathological elevations, probably due to the myositis caused by the intramuscular injection of melarsomine the day before.

In conclusion, the cardiopulmonary biomarkers cardiac troponin I, myoglobin and D-dimer constitute as a supportive tool, non-invasive, useful and quick screening tests, for the assessment of the clinical status, to establish a prognosis and monitoring of dogs with heartworm disease during the adulticide treatment.

Key words:

Dirofilaria immitis, canine dirofilariasis, cardiopulmonary biomarkers, cardiac troponins, myoglobin, D-dimer

VII

BIBLIOGRAFÍA



“Contrary to what Asimov says, the most exciting phrase in science, the one that heralds new discoveries, is not ‘Eureka!’ or ‘That’s funny...,’ it’s ‘Your research grant has been approved.’”
(John Alejandro King)

Bibliografía

Abbas, N.A., John, R.I., Webb, M.C., Kempson, M.E., Potter, A.N., Price, C.P., Vickery, S., Lamb, E.J., 2005. Cardiac troponins and renal function in nondialysis patients with chronic kidney disease. *Clin. Chem.* 51, 2059-2066.

Abcarian, P.W., Sweet, J.D., Watabe, J.T., Yoon, H.C., 2004. Role of a quantitative D-dimer assay in determining the need for CT angiography of acute pulmonary embolism. *AJR Am. J. Roentgenol.* 182, 1377-1381.

Abraham, D., 1988. Biology of *Dirofilaria immitis*. En: Boreham, P.F.L., Atwell, R.B. (Eds.), *Dirofilariasis*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 29-46.

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

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

Adam, S.S., Key, N.S., Greenberg, C.S., 2009. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood* 113, 2878-2887.

Adamik, K.N., Burgener, I.A., Kovacevic, A., Schulze, S.P., Kohn, B., 2009. Myoglobin as a prognostic indicator for outcome in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 19, 247-253.

Adams, J.E.^{3rd}, Bodor, G.S., Davila-Roman, V.G., Delmez, J.A., Apple, F.S., Ladenson, J.H., Jaffe, A.S., 1993. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 88, 101-106.

Adams, J.E. ^{3rd}, Schechtman, K.B., Landt, Y., Ladenson, J.H., Jaffe, A.S., 1994. Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. *Clin. Chem.* 40, 1291-1295.

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

Adin, D.B., Milner, R.J., Berger, K.D., Engel, C., Salute, M., 2005. Cardiac troponin I concentrations in normal dogs and cats using a bedside analyzer. J. Vet. Cardiol. 7, 27-32.

Adin, D.B., Oyama, M.A., Sleeper, M.M., Milner, R.J., 2006. Comparison of canine cardiac troponin I concentrations as determined by 3 analyzers. J. Vet. Intern. Med. 20, 1136-1142.

Aguilar, C., 2010. ¿Qué es y cómo se mide el Dímero D? En: Páramo, J.A. (Ed.), Manual práctico para el empleo del Dímero-D. Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH), pp. 7-20.

Altman, N.H., 1972. Laboratory diagnosis of *Dirofilaria immitis*. En: Bradley, R.E. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium'71. American Heartworm Society. Gainesville, FL, University of Florida, pp 87-93.

American Heartworm Society, 2012. Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs. Disponible en: <http://www.heartwormsociety.org>. Último acceso: Abril 1, 2013.

Andersen, C.U., Mellekjær, S., Nielsen-Kudsk, J.E., Bendstrup, E., Simonsen, U., Hilberg, O., 2012. Diagnostic and prognostic role of biomarkers for pulmonary hypertension in interstitial lung disease. Respir. Med. 106, 1749-1755.

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

Anderson, D.R., Wells, P.S., 2000. D-dimer for the diagnosis of venous thromboembolism. Curr. Opin. Hematol. 7, 296-301.

Antman, E.M., 2002. Decision making with cardiac troponin tests. N. Engl. J. Med. 346, 2079-2082.

Antman, E., Bassand, J.P., Klein, W., Ohman, M., Lopez-Sendon, J.L., Rydén, L., Simoons, M., Tendera, M., 2000. Myocardial infarction redefined – a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction: the Joint European Society of Cardiology/

American College of Cardiology Committee. J. Am. Coll. Cardiol. 36, 959-969.

Antman, E.M., Tanasijevic, M.J., Thompson, B., Schactman, M., McCabe, C.H., Cannon, C.P., Fischer, G.A., Fung, A.Y., Thompson, C., Wybenga, D., Braunwald, E., 1996. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. N. Engl. J. Med. 335, 1342-1349.

Apple, F.S., 1999. Clinical and analytical standardization issues confronting cardiac troponin I. Clin. Chem. 45, 18-20.

Apple, F.S., Murakami, M.M., Ler, R., Walker, D., York, M., HESI Technical Committee of Biomarkers Working Group on Cardiac Troponins, 2008. Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. Clin. Chem. 54, 1982-1989.

Apple, F.S., Murakami, M.M., Pearce, L.A., Herzog, C.A., 2002a. Predictive value of cardiac troponin I and T for subsequent death in end-stage renal disease. Circulation 106, 2941-2945.

Apple, F.S., Wu, A.H., Jaffe, A.S., 2002b. European society of cardiology and American college of cardiology guidelines for redefinition of myocardial infarction: how to use existing assays clinically and for clinical trials. Am. Heart J. 144, 981-986.

Arlati, S., Brenna, S., Prencipe, L., Marocchi, A., Casella, G.P., Lanzani, M., Gandini C., 2000. Myocardial necrosis in ICU patients with acute non-cardiac disease: a prospective study. Intensive Care Med. 26, 31-37.

Atkins, C.E., 1987. Heartworm caval syndrome. Semin. Vet. Med. Surg. 2, 64-71.

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

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

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

Atkins, C.E., Miller, M.W., 2003. Is there a better way to administer heartworm

adulticidal therapy? Vet. Med. 98, 310-317.

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

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

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

Baadsgaard, O., Schmidt, J.F., 1984. Myoglobin concentration, creatine kinase and creatine kinase subunit B activity in serum after myocardial ischaemia. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, 679-682.

Babuín, L., Jaffe, A.S., 2005. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. Can. Med. Assoc. J. 173, 1191-1202.

Badertscher, R.R., Losonsky, J.M., Paul, A.J., Kneller, S.K., 1988. Two dimensional echocardiography for diagnosis of dirofilariasis in nine dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 7, 843-846.

Baker, J.O., Reinhold J, Redwood S, Marber MS., 2011. Troponins: redefining their limits. Heart 97, 447-52.

Bakirel, U., Gunes, S., 2009. Value of cardiac markers in dogs with chronic mitral valve disease. Acta Vet-Beograd. 59, 223-229.

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

Barr, S.C., Warner, K.L., Kornreic, B.G., Piscitelli, J., Wolfe, A., Benet, L., McKerrow, J.H., 2005. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 5160-5161.

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

Basso, C., Fox, P.R., Meurs, K.M., Towbin, J.A., Spier, A.W., Calabrese, F., Maron, B.J., Thiene, G., 2004. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy causing sudden cardiac death in Boxer dogs. *Circulation* 109, 1180-1185.

Bateman, S.W., Mathews, K.A., Abrams-Ogg, A.C.G., 1998. Disseminated intravascular coagulation in dogs: Review of the literature. *Vet. Emerg. and Crit. Care* 8, 29-45.

Bates, S.M., 2012. D-dimer assays in diagnosis and management of thrombotic and bleeding disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 38, 673-682.

Bauer, K.A., 2002. Selective inhibition of coagulation factors: advances in antithrombotic therapy. *Semin. Thromb. Hemost.* 28, 15-24.

Bauer, N., Eralp, O., Moritz, A., 2009. Reference intervals and method optimization for variables reflecting hypocoagulatory and hypercoagulatory states in dogs using the STA Compact automated analyzer. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 803-814.

Bauer, N., Moritz, A., 2009. Evaluation of the Cardiac reader (R) as a point-of-care instrument for measurement of fibrin D-dimers in dogs. *Tierärztl. Prax.* 37, 319-325.

Baumwart, R.D., Orvalho, J., Meurs, K.M., 2007. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am. J. Vet. Res.* 68, 524-528.

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

Ben, S.Q., Ni, S.S., Shen, H.H., Shi, Y.X., Huang, S.B., Xu, J.H., Huang, J.F., 2007. The dynamic changes of LDH isoenzyme 3 and D-dimer following pulmonary thromboembolism in canine. *Thromb. Res.* 120, 575-583.

Bertinchant, J.P., Polge, A., Mohty, D., Nguyen-Ngoc-Lam, R., Estorc, J., Cohendy, R., Joubert, P., Poupard, P., Fabbro-Peray, P., Monpeyroux, F., Poirey, S., Ledermann, B., Raczka, F., Brunet, J., Nigond, J., de la Coussaye, J.E., 2000. Evaluation of incidence,

clinical significance, and value of circulating cardiac troponins I and T elevation in hemodynamically stable patients with suspected myocardial contusion after blunt chest trauma, *J. Trauma* 48, 924-931.

Bhayana, V., Henderson, A.R., 1995. Biochemical markers of myocardial damage. *Clin. Biochem.* 28, 1-29.

Bick, R.L., Baker, W.F., 1992. Diagnostic efficacy of the D-dimer assay in disseminated intravascular coagulation (DIC). *Thromb. Res.* 65, 785-790.

Biomarkers Definitions Working Group, 2001. Biomarkers and surrogate end-points: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89-95.

Blagburn, B.L., Dillon, A.R., Arther, R.G., Butler, J.M., Newton, J.C., 2011. Comparative efficacy of four commercially available heartworm preventive products against the MP3 laboratory strain of *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* 176, 189-194.

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

Block, M.I., Said, J.W., Siegel, R.J., Fishbein, M.C., 1983. Myocardial myoglobin following coronary artery occlusion. An immunohistochemical study. *Am. J. Pathol.* 111, 374-379.

Bockenstedt, P., 2003. D-dimer in venous thromboembolism. *N. Engl. J. Med.* 349, 1203-1204.

Boswood, A., 2009. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. *J. Vet. Cardiol.* 11, S23-32.

Boswood, A., Lamb, C.R., White, R.N., 2000. Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *J. Small Anim. Pract.* 41, 109-114.

Boudreaux, M.K., Dillon, A.R., 1991a. Platelet function, antithrombin-III activity, and fibrinogen concentration in heartworm-infected and heartworm-negative dogs treated with thiacetarsamide. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1986-1991.

Boudreaux, M.K., Dillon, A.R., Ravis, W.R., Sartin, E.A., Spano, J.S., 1991b. Effects of

Treatment with Aspirin or Aspirin/dipyridamole combination in Heartworm-negative, Heartworm-infected, and Embolized Heartworm-infected Dogs. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1992-1999.

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

Bourguinat, C., Keller, K., Blagburn, B., Schenker, R., Geary, T.G., Prichard, R.K., 2011. Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype. *Vet. Parasitol.* 176, 374-381.

Boutet, P., Heath, F., Archer, J., Villiers, E., 2009. Comparison of quantitative immunoturbidimetric and semiquantitative latex-agglutination assays for D-dimer measurement in canine plasma. *Vet. Clin. Pathol.* 38, 78-82.

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

Bowman, D.D., 2012. Heartworms, macrocyclic lactones, and the specter of resistance to prevention in the United States. *Parasit. Vectors* 5, 138.

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

Brandt, R.R., Filzmaier, K., Hanrath, P., 2001. Circulating cardiac troponin I in acute pericarditis. *Am. J. Cardiol.* 87, 1326-1328.

Brazzell, J.L., Borjesson, D.L., 2007. Evaluation of plasma antithrombin activity and D-dimer concentration in populations of healthy cats, clinically ill cats, and cats with cardiomyopathy. *Vet. Clin. Pathol.* 36, 79-84.

Breen, M.E., Dorfman, M., Chan, S.B., 2009. Pulmonary embolism despite negative ELISA D-dimer: a case report. *J. Emerg. Med.* 37, 290-292.

Brianzoni, E., Centioni, G., Berbellini, A., Spaccesi, E., D'Amico, F., Nittoli, C.A., 1981. Serum myoglobin behaviour in athletes. *Eur. J. Nucl. Med.* 6, 23.

Brogan, G.X.Jr., Friedman, S., McCuskey, C., Cooling, D.S., Berrutti, L., Thode, H.C.Jr., Bock, J.L., 1994. Evaluation of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus CK-MB for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department. *Ann. Emerg. Med.* 24, 665-671.

Bruchim, Y., Aroch, I., Saragusty, J., 2008. Disseminated Intravascular Coagulation. *Comp. Cont. Educ. Pract.* 30, e1-16.

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

Burgener, I.A., Kovacevic, A., Mauldin, N., Lombard, C.W., 2006. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 277-283.

Bussadori, R., Tamborini, A., Locatelli, C., Palermo, V., Brambilla, P.G., 2008. Troponin I perioperative trend in dogs undergoing the correction of patent ductus arteriosus: preliminary investigations. *Vet. Res. Commun.* 32, S255-258.

Caldin, M., Furlanello, T., Berto, D., Lubas, G., 1997. Preliminary investigations of D-dimer concentrations in normal dogs and in dogs with Disseminated Intravascular Coagulation (DIC). En: *Proceedings of the 15th American College of Veterinary Internal Medicine Forum*, Lake Buena Vista, FL, USA, p. 677.

Caldin, M., Furlanello, T., Lubas, G., 1998. Sensitivity and specificity of citrated plasma FDPs and D-dimer in the diagnosis of Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 12, 236.

Caldin, M., Furlanello, T., Lubas, G., 2000. Validation of an immunoturbidimetric D-dimer assay in canine citrated plasma. *Vet. Clin. Pathol.* 29, 51-54.

Calvert, C.A., 1987. The best ways for evaluating the heartworm infected dog. *Vet. Med-US*, 244.

Calvert, C.A., Losonsky, J.M., 1985. Occult heartworm-disease associated allergic pneumonitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186, 1096-1098.

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

Camplesi, A.C., Sakate, M., Simão, N.M.B., Moya C.F., 2009. [Dosing cardiac markers CK-MB and TnIc and electrolytes in experimental toad envenoming in dogs.] *Pesquisa Vet. Brasil.* 29, 632-636.

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

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

Cancrini, G., Sun Yanchang, S., della Torre A., Coluzzi M., 1988. Influenza Della temperatura sullo sviluppo larvale di *Dirofilaria repens* in diverse specie di zanzare. *Parasitologia* 30: 38.

Carastro, S.M., Dugan, S.J., Paul, A.J., 1992. Intraocular dirofilariasis in dogs. *Comp. Cont. Educ. Pract.* 14, 209-217.

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

Chalmers, J.D., Singanayagam, A., Scally, C., Hill, A.T., 2009. Admission D-dimer can identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *Ann. Emerg. Med.* 53, 633-638.

Chen, Y., Serfass, R.C., Mackey-Bojack, S.M., Kelly, K.L., Titus, J.L., Apple, F.S., 2000. Cardiac troponin T alterations in myocardium and serum of rats after stressful, prolonged intense exercise. *J. Appl. Physiol.* 88, 1749-1755.

Christ, M., Bertsch, T., Popp, S., Bahrmann, P., Heppner, H.J., Müller, C., 2011. High-sensitivity troponin assays in the evaluation of patients with acute chest pain in the emergency department. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49, 1955-1963.

Chun, R., Kellihan, H.B., Henik, R.A., Stepien, R.L., 2010. Comparison of plasma cardiac troponin I concentrations among dogs with cardiac hemangiosarcoma, noncardiac hemangiosarcoma, other neoplasms, and pericardial effusion of nonhemangiosarcoma origin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 237, 806-811.

Church, W.M., Oyama, M.A., Sisson, D.D., Bulmer, B.J., Owens, D., 2006. Troponin I

elevations in dogs with third degree atrioventricular block. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 778.

Church, W.M., Sisson, D.D., Oyama, M.A., Zachary, J.F., 2007. Third degree atrioventricular block and sudden death secondary to acute myocarditis in a dog. *J. Vet. Cardiol.* 9, 53-57.

Cilli, F., Alibhai, H.I., Armitage-Chan, E., Boswood, A., Hammond, R.A., Jasani, S., Brodbelt, D.C., 2010. Incidence of elevation of cardiac troponin I prior to and following routine general anaesthesia in dogs. *Vet. Anaesth. Analg.* 37, 409-416.

Cogo, A., Lensing, A.W., Koopman, M.M., Piovela, F., Siragusa, S., Wells, P.S., Villalta, S., Büller, H.R., Turpie, A.G., Prandoni, P., 1998. Compression ultrasonography for diagnostic management of patients with clinically suspected deep vein thrombosis: prospective cohort study. *BMJ* 316, 17-20.

Collins, J.N., Cole, F.J., Weireter, L.J., Riblet, J.L., Britt, L.D., 2001. The usefulness of serum troponin levels in evaluating cardiac injury. *Am. Surg.* 67, 821-825.

Collinson, P.O., Stubbs, P.J., 2003. Are troponins confusing? *Heart* 89, 1285-1287.

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

Connolly, D.J., Cannata, J., Boswood, A., Archer, J., Groves, E.A., Neiger, R., 2003. Cardiac troponin I in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Feline Med. Surg.* 5, 209-216.

Connolly, D.J., Guitian, J., Neiger, R., 2005. Serum troponin I levels in hyperthyroid cats before and after treatment with radioactive iodine. *J. Feline Med. Surg.* 7, 289-300.

Courtney, C.H., 1989. Detection and differentiation of microfilariae. En: *Proceedings of the Heartworm Symposium*, California Veterinary Medical Association, Sacramento, California, pp. 9-11.

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

Courtney, C.H., Zeng, Q.Y., 2001b. Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariasis. *Vet. Parasitol.* 94, 199-204.

Cugno, M., Mari, D., Meroni, P.L., Gronda, E., Vicari, F., Frigerio, M., Coppola, R., Bottasso, B., Borghi, M.O., Gregorini, L., 2004. Haemostatic and inflammatory biomarkers in advanced chronic heart failure: Role of oral anticoagulants and successful heart transplantation. *Br. J. Haematol.* 126, 85-92.

Cummins, B., Aukland, M.L., Cummins, P., 1987. Cardiac specific troponin radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. Heart. J.* 113, 1333-1344.

Cummins, B., Cummins, P., 1987. Cardiac specific troponin-I release in canine experimental myocardial infarction: development of a sensitive enzyme-linked immunoassay. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19, 999-1010.

Dameron, G.W., Beck, M.L., Brandt, M., O'Brien, P.J., 1997. Tissue species specificity of two generations of cardiac troponin T immunoassays. *Clin. Chem.* 43, S192.

DeFrancesco, T.C., Atkins, C.E., Keene, B.W., Coats, J.R., Hauck, M.L., 2002. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin T in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. *J. Vet. Intern. Med.* 16, 553-557.

De Lemos, J.A., Morrow, D.A., Gibson, C.M., Murphy, S.A., Sabatine, M.S., Rifai, N., McCabe, C.H., Antman, E.M., Cannon, C.P., Braunwald, E., 2002. The prognostic value of serum myoglobin in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. Results from the TIMI 11B and TACTICS-TIMI 18 studies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 238-244.

Dewhurst, E., Cue, S., Crawford, E., Papasouliotis, K., 2008. A retrospective study of canine D-dimer concentrations measured using an immunometric "Point-of-Care" test. *J. Small Anim. Pract.* 49, 344-348.

De Winter, R.J., Lijmer, J.G., Koster, R.W., Hoek, F.J., Sanders, G.T., 2000. Diagnostic accuracy of myoglobin concentration for the early diagnosis of acute myocardial infarction, *Ann. Emerg. Med.* 35, 113-120.

De Zoysa, J.R., 2004. Cardiac troponins and renal disease. *Nephrology (Carlton)* 9, 83-88.

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

Batavia, IL, p. 113.

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. *Vet. Parasitol.* 170, 50-60.

Diniz, P.P., de Moraes, H., Breitschwerdt, E.B., Schwartz, D., 2008. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 1136-1143.

Diniz, P.P.V.P., Schwartz, D.S., Collicchio-Zuanaze, R.C., 2007. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dogs: two case reports. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59, 85-89.

Diris, J.H., Hackeng, C.M., Kooman, J.P., Pinto, Y.M., Hermens, W.T., van Dieijen-Visser, M.P., 2004. Impaired renal clearance explains elevated troponin T fragments in hemodialysis patients. *Circulation* 109, 23-25.

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

Dolci, A., Panteghini, M., 2006. The exciting story of cardiac biomarkers: from retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more. *Clin. Chim. Acta* 369, 179-187.

Donahue, S.M., Brooks, M., Otto, C.M., 2011. Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein-losing nephropathy. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 21, 346-355.

Douketis, J.D., Crowther, M.A., Stanton, E.B., Ginsberg, J.S., 2002. Elevated cardiac troponin levels in patients with submassive pulmonary embolism. *Arch. Intern. Med.* 162, 79-81.

Douma, R.A., le Gal, G., Söhne, M., Righini, M., Kamphuisen, P.W., Perrier, A., Kruip, M.J., Bounameaux, H., Büller, H.R., Roy, P.M., 2010. Potential of an age adjusted D-dimer cut-off value to improve the exclusion of pulmonary embolism in older patients: a retrospective analysis of three large cohorts. *BMJ* 340, C1475.

Dreyfus, J.C., Schapira, G., Rasnais, J., Scebat, L., 1960. La creatine-kinase sérique

dans le diagnostic de l'infarctus myocardique. *Rev. Fran. Etud. Clin. Biol.* 5, 386-389.

Dunn, R.J., Siegel, A.L., 1965. Serum creatine phosphokinase in acute myocardial infarction. *Arch. Intern. Med.* 115, 443-451.

Dzimianski, M.T., McCall, J.W., Steffens, W.L., Supakorndej, N., Mansour, A.E., Ard, M.B., McCall, S.D., Hack, R., 2001. The safety of selamectin in heartworm infected dogs and its effect on adult worms and microfilariae. En: Seward, R.L. (Eds.), *Proceedings of the American Heartworm Symposium'01*, American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 135-140.

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

Eggers, K.M., Oldgren, J., Nordenskjöld, A., Lindahl, B., 2004. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. *Am. Heart J.* 148, 574-581.

Eggers, K.M., Oldgren, J., Nordenskjöld, A., Lindahl, B., 2005. Combining different biochemical markers of myocardial ischemia does not improve risk stratification in chest pain patients compared to troponin I alone. *Coron. Artery Dis.* 16, 315-319.

Ellis, A.K., Saran, B.R., 1989. Kinetics of myoglobin release and prediction of myocardial myoglobin depletion after coronary artery reperfusion. *Circulation* 80, 676-683.

Feng, Y.J., Chen, C., Fallon, J.T., Lai, T., Chen, L., Knibbs, D.R., Waters, D.D., Wu, A.H., 1998. Comparison of cardiac troponin I, creatine kinase-MB, and myoglobin for detection of acute myocardial necrosis in a swine myocardial ischemia model. *Am. J. Clin. Pathol.* 110, 70-77.

Ferjani, M., Droc, G., Dreux, S., Arthaud, M., Goarin, J.P., Riou, B., Coriat, P., 1997. Circulating cardiac troponin T in myocardial contusion. *Chest* 111, 427-433.

Fernandes, C.J., Akamine, N., Knobel, E., 1999. Cardiac troponin: a new serum marker of myocardial injury in sepsis. *Intens. Care Med.* 25, 1165-1168.

Fishbein, M.C., Wang, T., Matijasevic, M., Hong, L., Apple, F.S., 2003. Myocardial tissue troponins T and I: an immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc. Pathol.* 12, 65-71.

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

Fonfara, S., Loureiro, J.F., Swift, S., James, R.A., Pereira, Y.M., Lopez-Alvarez, J., Summerfield, N., Dukes-McEwan, J., 2010b. English springer spaniels with significant bradyarrhythmias--presentation, troponin I and follow-up after pacemaker implantation. *J. Small Anim. Pract.* 51, 155-161.

Frank, J.R., Nutter, F.B., Kyles, A.E., Atkins, C.E., Sellon, R.L., 1997. Systemic arterial dirofilariasis in five dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 11, 189-194.

Freda, B.J., Tang, W.H., Van Lente, F., Peacock, W.F., Francis, G.S., 2002. Cardiac troponins in renal insufficiency: review and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 2065-2071.

Fredericks, S., Merton, G.K., Lerena, M.J., Heining, P., Carter, N.D., Holt, D.W., 2001. Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. *Clin. Chim. Acta* 304, 65-74.

Fujiwara, H., Fujiwara, T., Tanaka, M., Onodera, T., Miyazaki, S., Wu, D.J., Matsuda, M., Sasayama, S., Kawai, C., 1988. Detection of early myocardial infarction in formalin-fix, paraffin-embedded tissue. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* 2, 57-61.

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

Fuster, V., Badimon, L., Cohen, M., Ambrose, J.A., Badimon, J.J., Chesebro, J., 1988. Insights into the pathogenesis of acute ischemic syndromes. *Circulation* 77, 1213-1220.

Gaffney, P.J., 2001. Fibrin degradation products. A review of structures found in vitro and in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 594-610.

Gallegos, R.P., Swingen, C., Xu, X.J., Wang, X., Bianco, R., Jerosch-Herold, M., Bolman, R.M.3rd., 2004. Infarct extent by MRI correlates with peak serum troponin

level in the canine model. J. Surg. Res. 120, 266-271.

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

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

Genchi, C., Venco, L., Genchi, M., 2007. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. En: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), Mappe Parassitologiche 8. Rolando Editore, Naples, pp. 137-144.

Giannitsis, E., Muller-Bardorff, M., Kurowski, V., Weidtmann, B., Wiegand, U., Kampmann, M., Katus, H.A., 2000. Independent prognostic value of cardiac troponin T in patients with confirmed pulmonary embolism. Circulation 102, 211-217.

Gilbert, J., Nfon, C.K., Makepeace, B.L., Njongmeta, L.M., Hastings, I.M., Pfarr, K.M., Renz, A., Tanya, V.N., Trees, A.J., 2005. Antibiotic chemotherapy of onchocerciasis: in a bovine model, killing of adult parasites requires a sustained depletion of endosymbiotic bacteria (*Wolbachia* species). J. Infect. Dis. 192, 1483-1493.

Ginsberg, J.S., Brill-Edwards, P.A., Demers, C., Donovan, D., Panju, A., 1993. D-dimer in patients with clinically suspected pulmonary embolism. Chest 104, 1679-1684.

Goggs, R., Benigni, L., Fuentes, V.L., Chan, D.L., 2009. Pulmonary thromboembolism. J. Vet. Emerg. Crit. Care. 19, 30-52.

Goldhaber, S.Z., Bounameaux, H., 2012. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. Lancet 379, 1835-1846.

Goldhaber, S.Z., Morpurgo, M., 1992. Diagnosis, treatment of pulmonary embolism. JAMA 268, 1727-1733.

Goldhaber, S.Z., Simons, G.R., Elliot, C.G., Haire, W.D., Toltzis, R., Blacklow, S.C., Doolittle, M.H., Weinberg, D.S., 1993. Quantitative plasma D-dimer levels among patients undergoing pulmonary angiography for suspected pulmonary embolism. JAMA 270, 2819-2822.

Goldmann, B.U., Christenson, R.H., Hamm, C.W., Meinertz, T., Ohman, E.M., 2001.

Implications of troponin testing in clinical medicine. *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med.* 2, 75-84.

Goodwin, J.C., 1998. The serologic diagnosis of heartworm infection in dogs and cats. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 13, 83-87.

Gow, D.J., Gow, A.G., Bell, R., Spratt, D., Cash, R., Ricketts, S., Archer, J., Mellanby, R.J., 2011. Serum cardiac troponin I in dogs with primary immune-mediated haemolytic anaemia. *J. Small Anim. Pract.* 52, 259-264.

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

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

Grauer, G.F., Culham, C.A., Dubielzig, R.R., Presto, S.K., 1988. Effects of a specific thromboxane synthetase inhibitor on development of experimental *Dirofilaria immitis* immune complex glomerulonephritis in the dog. *J. Vet. Intern. Med.* 2, 192-200.

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

Griffin, A., Callan, M.B., Giger, U., 2002. Clinical experience with a point-of-care D-dimer test in dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolism, and internal hemorrhage. *J. Vet. Intern. Med.* 16, 376.

Griffin, A., Callan, M.B., Shofer, F.S., Giger, U., 2003. Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. *Am. J. Vet. Res.* 64, 1562-1569.

Guan, D.W., Zhang, X.G., Zhao, R., Lu, B., Han, Y., Hou, Z.H., Jia, J.T., 2007. Diverse morphological lesions and serious arrhythmias with hemodynamic insults occur in the early myocardial contusion due to blunt impact in dogs. *Forensic Sci. Int.* 166, 49-57.

- Guglielmini, C., Civitella, C., Diana, A., Di Tommaso, M., Cipone, M., Luciani, A., 2010. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with precapillary and postcapillary pulmonary hypertension. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 145-152.
- Guglielmini, C., Diana, A., Civitella, C., Diana, D., Luciani, A., Cipone, M., 2006. Accelerated idioventricular rhythm in 9 dogs. *Vet. Res. Commun.* 30, 305-307.
- Hagman, R., Lagerstedt, A.S., Fransson, B.A., Bergström, A., Häggström, J., 2007. Cardiac troponin I levels in canine pyometra. *Acta Vet. Scand.* 28:1-8.
- Hamm, C.W., Goldmann, B.U., Heeschen, C., Kreyman, G., Berger, J., Meinertz, T., 1997. Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I. *N. Engl. J. Med.* 337, 1648-1653.
- Hamm, C.W., Ravkilde, J., Gerhardt, W., Jørgensen, P., Peheim, E., Ljungdahl, L., Goldmann, B., Katus, H.A., 1992. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. *N. Engl. J. Med.* 327, 146-150.
- Hargett, C.W., Tapson, V.F., 2008. Clinical probability and D-dimer testing: how should we use them in clinical practice? *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 29, 15-24.
- Hasdemir, C., Shah, N., Rao, A.P., Acosta, H., Matsudaira, K., Neas, B.R., Reynolds, D.W., Po, S., Lazzara, R., Beckman, K.J., 2002. Analysis of troponin I levels after spontaneous implantable cardioverter defibrillator shocks. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 13, 144-150.
- Hayasaki, M., 1996. Re-Migration of Fifth-Stage Juvenile *Dirofilaria immitis* into pulmonary arteries after subcutaneous transplantation in dogs, cats and rabbits. *J. Parasitol.* 82, 835-837.
- Heijboer, H., Buller, H.R., Lensing, A.W., Turpie, A.G., Colly, L.P., ten Cate, J.W., 1993. A comparison of real-time compression ultrasonography with impedance plethysmography for the diagnosis of deep-vein thrombosis in symptomatic outpatients. *N. Engl. J. Med.* 329, 1365-1369.
- Henry, C.J., 1992. Salivary mucocele associated with dirofilariasis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200, 1965-1966.
- Herndon, W.E., Kittleson, M.D., Sanderson, K., Drobatz, K.J., Clifford, C.A., Gelzer, A., Summerfield, N.J., Linde, A., Sleeper, M.M., 2002. Cardiac troponin I in feline

hypertrophic cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 16, 558-564.

Herndon, W.E., Rishniw, M., Schroppe, D., Sammarco, C.D., Boddy, K.N., Sleeper, M.M., 2008. Assessment of plasma cardiac troponin I concentration as a means to differentiate cardiac and noncardiac causes of dyspnea in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 233, 1261-1264.

Herndon, W.E., Sammarco, C.D., Schroppe, D., 2004a. Prospective evaluation of plasma cardiac troponin I concentration in cats with mild hypertrophic cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 404.

Herndon, W.E., Schroppe, D., Drobatz, K.J., Sammarco, C.D., Boddy, K.N., Sleeper, M.M., 2004b. Plasma cardiac troponin I concentration in cats with cardiac and noncardiac causes of respiratory distress. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 404.

Hezzell, M.J., Boswood, A., Chang, Y.M., Moonarmart, W., Souttar, K., Elliott, J., 2012. The combined prognostic potential of serum high-sensitivity cardiac troponin I and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 302-311.

Hirano, Y., Kitagawa, H., Sasaki, Y., 1992. Relationship between pulmonary arterial pressure and pulmonary thromboembolism associated with dead worms in canine heartworm disease. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 897-904.

Hirschberger, J., Regel, A., Krieger, S., Küchenhoff, H., 2004. D-dimers and optimized prothrombin test for diagnosis of DIC in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 440.

Ho, C.H., 2011. Can very high level of D-dimer exclusively predict the presence of thromboembolic diseases? *J. Chin. Med. Assoc.* 74, 151-154.

Horan, J.T., Francis, C.W., 2001. Fibrin degradation products, fibrin monomer and soluble fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Semin. Thromb. Hemost.* 27, 657-666.

Hori, Y., Ohshima, N., Chikazawa, S., Kanai, K., Hoshi, F., Itoh, N., Higuchi, S., 2012. Myocardial injury-related changes in plasma NT-proBNP and ANP concentrations in a canine model of ischemic myocardial injury. *Vet. J.* 191, 46-51.

Hull, R.D., Hirsh, J., Carter, C.J., Raskos, G.E., Gill, G.J., Jay, R.M., Leclerc, J.R., David, M., Coates, G., 1985. Diagnostic value of ventilation/perfusion lung scanning in

patients with suspected pulmonary embolism. *Chest* 88, 819-828.

Hyers, T.M., 1995. Diagnosis of pulmonary embolism. *Thorax* 50, 930-932.

ISACHC, 1995. Recommendations for the diagnosis of the heart disease and the treatment of heart failure in Small Animals. En: Miller, M.S., Tilley, L.P. (Eds.), *Manual of Canine and Feline Cardiology* 2nd ed. WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 469-502.

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

Jackson, R.F., Otto, G.F., 1975. Detection and differentiation of microfilariae. En: Morgan, H.C., et al (Eds.), *Proceedings of the heartworm symposium* '74. V.M. Publishing Inc., Bonner Springs, Kansas pp. 21-25.

Jackson, R.F., Seymour, W.G., Growney, R.J., Otto, G.F., 1966. Surgical treatment of caval syndrome of canine heartworm disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171, 1065-1069.

Jaffe, A.S., Landt, Y., Parvin, C.A., Abendschein, D.R., Geltman, E.M., Ladenson, J.H., 1996. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* 42, 1770-1776.

Jaffery, Z., Nowak, R., Khoury, N., Tokarski, G., Lanfear, D.E., Jacobsen, G., McCord, J., 2008. Myoglobin and troponin I elevation predict 5-year mortality in patients with undifferentiated chest pain in the emergency department. *Am. Heart J.* 156, 939-945.

Jafri, S.M., Ozawa, T., Mammen, E., Levine, T.B., Johnson, C., Goldstein, S., 1993. Platelet function, thrombin and fibrinolytic activity in patients with heart failure. *Eur. Heart J.* 14, 205-212.

Januzzi, J.L.Jr., Filippatos, G., Nieminen, M., Gheorghiade, M., 2012. Troponin elevation in patients with heart failure: on behalf of the third Universal Definition of Myocardial Infarction Global Task Force: Heart Failure Section. *Eur. Heart J.* 33, 2265-2271.

Jeremiah, Z.A., Adias, T.C., Opiah, M., George, S.P., Mgbere, O., Essien, E.J., 2012. Elevation in D-dimer concentrations is positively correlated with gestation in normal uncomplicated pregnancy. *Int. J. Womens Health.* 4, 437-443.

Jeremias, A., Gibson, C.M., 2005. Narrative review: alternative causes for elevated cardiac troponin levels when acute coronary syndromes are excluded. *Ann. Intern. Med.* 142, 786-791.

Jockers-Wretou, E., Pfeleiderer, G., 1975. Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method. *Clin. Chim. Acta* 58, 223-232.

Johnson, L.R., Lappin, M.R., Baker, D.C., 1999. Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 338-345.

Jurado-Gámez, B., Gutiérrez-Solís, M.A., Ceballos-García, P., Gutiérrez- Jodas, J., Gutiérrez-Cañones, R., García-de-Lucas, M.D., 2000. Valor del dímero-D para el diagnóstico de tromboembolismo pulmonar en el servicio de urgencias. *Emergencias* 12, 6-11.

Kagen, L., Scheidt, S., Roberts, L., Porter, A., Pau, H., 1975. Myoglobinaemia following myocardial infarction. *Am. J. Med.* 58, 177-182.

Kamga, C., Krishnamurthy, S., Shiva, S., 2012. Myoglobin and mitochondria: a relationship bound by oxygen and nitric oxide. *Nitric Oxide*. 26, 251-258.

Karmen, A., Wroblewski, F., La Due, J.S., 1954. Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.* 34, 126-133.

Katrunkha, A.G., Bereznikova, A.V., Filatov, V.L., Esakova, T.V., Kolosova, O.V., Pettersson, K., Lövgren, T., Bulargina, T.V., Trifonov, I.R., Gratsiansky, N.A., Pulkki, K., Voipio-Pulkki, L.M., Gusev, N.B., 1998. Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin. Chem.* 44, 2433-2440.

Katus, H.A., Looser, S., Hallermayer, K., Remppis, A., Scheffold, T., Borgya, A., Essig, U., Geuss, U., 1992. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin. Chem.* 38, 386-393.

Katus, H.A., Remppis, A., Looser, S., Hallermeier, K., Scheffold, T., Kubler, W., 1989. Enzyme linked immunoassay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21, 1349-1353.

Katus, H.A., Remppis, A., Scheffold, T., Diederich, K.W., Kuebler, W., 1991. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 67, 1360-1367.

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

Keller, K.D., Shatney, C.H., 1988. Creatine phosphokinase-MB assays in patients with suspected myocardial contusion: diagnostic test or test of diagnosis. J. Trauma 28, 58-63.

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

Kelly, J., Rudd, A., Lewis, R.R., Hunt, B.J., 2002. Plasma D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism. Arch. Intern. Med. 162, 747-756.

Kendrew, J.C., Parrish, R.G., Marrack, J.R., Orlans, E.S., 1954. The species specificity of myoglobin. Nature 174, 946-949.

Keyes, M.L., Rush, J.E., Knowles, K.E., 1993. Pulmonary Thromboembolism in Dogs. J. Vet. Emerg. Crit. Care 3, 23-32.

Kiessling, W.R., Ricker, K., Pflughaupt, K.W., Mertens, H.G., Haubitz, I., 1981. Serum myoglobin in primary and secondary skeletal muscle disorders. J. Neurol. 224, 229-233.

Kirback, B., Schober, K., Oechtering, G., Aupperle, H., 2000. Diagnosis of myocardial cell injuries in cats with blunt thoracic trauma using circulating biochemical markers. Tierärztl Prax 28, 30-33.

Kittleson, M.D., 1998. Heartworm infestation and disease (dirofilariasis). En: Kittleson, M.D., Kienle, R.D. (Eds.), Small Animal Cardiovascular Medicine. 1st ed. Mosby, St Louis, pp. 370-401.

Kline, J.A., Williams, G.W., Hernandez-Nino, J., 2005. D-dimer concentrations in normal pregnancy: new diagnostic thresholds are needed. Clin. Chem. 51, 825-829.

Klocke, F.J., Copley, D.P., Krawczyk, J.A., Reichlin, M., 1982. Rapid renal clearance of immunoreactive canine plasma myoglobin. Circulation 65, 1522-1528.

Knight, D.H., 1987. Heartworm infection. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 17,

1463-1518.

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

Knott, J., 1939. A method for making microfilaria surveys on dog blood. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 33, 191-196.

Kocaturk, M., Martinez, S., Eralp, O., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J., Yilmaz, Z., 2012. Tei index (myocardial performance index) and cardiac biomarkers in dogs with parvoviral enteritis. Res. Vet. Sci. 92, 24-29.

Konstantinides, S., Geibel, A., Olschewski, M., Kasper W, Hruska, N., Jäckle, S., Binder, L., 2002. Importance of cardiac troponins I and T in risk stratification of patients with acute pulmonary embolism. Circulation 106, 1263-1268.

Kontos, M.C., Fritz, L.M., Anderson, F.P., Tatum, J.L., Ornato, J.P., Jesse, R.L., 2003. Impact of the troponin standard on the prevalence of acute myocardial infarction. Am. Heart J. 146, 446-452.

Kontos, M.C., Garg, R., Anderson, F.P., Roberts, C.S., Ornato, J.P., Tatum, J.L., Jesse, R.L., 2007. Ability of myoglobin to predict mortality in patients admitted for exclusion of myocardial infarction. Am. J. Emerg. Med. 25, 873-879.

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

Koutinas, C.K., Mylonakis, M.E., O'Brien, P.J., Leontides, L., Siarkou, V.I., Breitschwerdt, E.B., Koutinas, A.F., 2012. Serum cardiac troponin I concentrations in naturally occurring myelosuppressive and non-myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis. Vet. J. 194, 259-261.

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

Kozek, W.J., Gonzalez Jr, J.A., Amigo, L.A., 2007. *Wolbachia* of *Dirofilaria immitis*: an historical perspective and morphological characteristics. En: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), *Mappe Parassitologiche* 8. Rolando Editore, Naples, pp.209-210.

Kramer, L., Grandi, G., Leoni, M., Passeri, B., McCall, J., Genchi, C., Mortarino, M., Bazzocchi, C., 2008. *Wolbachia* and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. Vet. Parasitol. 158, 191-195.

Kramer, L.H., Passeri, B., Corona, S., Simoncini, L., Casiraghi, M., 2003. Immunohistochemical/ immunogold detection and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* of *D. immitis* and *Brugia pahangi* using a polyclonal antiserum raised against WSP (*Wolbachia* surface protein). Parasitol. Res. 89, 381-386.

Kramer, L., Simón, F., Tamarozzi, F., Genchi, M., Bazzocchi, C., 2005. Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? Vet. Parasitol. 133, 133-136.

Krams, R., Kofflard, M.J.M., Duncker, D.J., Von Birgelen, C., Carlier, S., Kliffen, M., ten Cate, F.J., Serruys, P.W., 1998. Decreased coronary flow reserve in hypertrophic cardiomyopathy is related to remodelling of the coronary microcirculation. Circulation 97, 230-233.

Kroneman, H., Nieuwenhuizen, W., Knot, E.A., 1990. Monoclonal antibody-based plasma assays for fibrin(ogen) and derivatives, and their clinical relevance. Blood Coagul. Fibrinolysis 1, 91-111.

Kume, S., Itagaki, S., 1955. On the life-cycle of *Dirofilaria immitis* in the dog as the final host. Br. Vet. J. 111, 16-24.

Ladenson, J.H., 2007. A personal history of markers of myocyte injury [myocardial infarction]. Clin. Chim. Acta 381, 3-8.

LaDue, J.S., Wroblewski, F., Karmen, A., 1954. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. Science 120, 497-499.

Lamb, E.J., Webb, M.C., Abbas, N.A., 2004. The significance of serum troponin T in patients with kidney disease: a review of the literature. Ann. Clin. Biochem. 41, 1-9.

Lanevski-Pietersma, A., Bédard, C., Kohlbrenner, L., 2003. D-dimer, thrombin-antithrombin complex and fibrinogen degradation product levels measured in dogs with different systemic diseases. Vet. Clin. Pathol. 32, 225.

Lang, K., Borner, A., Figulla, H.R., 2000. Comparison of biochemical markers for the detection of minimal myocardial injury: superior sensitivity of cardiac troponin-T

ELISA. J. Intern. Med. 247, 119-123.

Lang, I.M., Marsh, J.J., Konopka, R.G., Olman, M.A., Binder, B.R., Moser, K.M., Schleef, R.R., 1993. Factors contributing to increased vascular fibrinolytic-activity in mongrel dogs. Circulation 87, 1990-2000.

Langworthy, N.G., Renz, A., Mackenstedt, U., Henkle-Dührsen, K., de Bronsvort, M.B., Tanya, V.N., Donnelly, M.J., Trees, A.J., 2000. Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship. Proc. Biol. Sci. 267, 1063-1069.

Lappalainen, H., Tiula, E., Uotila, L., Mänttari, M., 2002. Elimination kinetics of myoglobin and creatine kinase in rhabdomyolysis: implications for follow-up. Crit. Care Med. 30, 2212-2215.

Larue, C., Defacque-Lacquement, H., Calzolari, C., Le Nguyen, D., Pau, B., 1992. New monoclonal antibodies as probes for human cardiac troponin I: epitopic analysis with synthetic peptides. Mol. Immunol. 29, 271-278.

Laurino, J.P., Bender, E.W., Kessimian, N., Chang, J., Pelletier, T., Usategui, M., 1996. Comparative sensitivities and specificities of the mass measurements of CK-MB2, Ck-MB, and myoglobin for diagnosing acute myocardial infarction. Clin. Chem. 42, 1454-1459.

LaVecchia, L., Mezzena, G., Zanolli, L., Paccanaro, M., Varotto, L., Bonanno, C., Ometto, R., 2000. Cardiac troponin I as diagnostic and prognostic marker in severe heart failure. J. Heart Lung. Transplant 19, 644-652.

LaVecchio, D., Marin, L.M., Baumwart, R., Iazbik, M.C., Westendorf, N., Couto, C.G., 2009. Serum cardiac troponin I concentration in retired racing greyhounds. J. Vet. Intern. Med. 23, 87-90.

Lee, S., Pak, S.-I., Hyun, C., 2009. Evaluation of changes in cardiac biomarker concentrations and enzyme activities in serum after short- and long-duration transcutaneous cardiac pacing in dogs. Am. J. Vet. Res. 70, 599-603.

Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., Kotani, T., Powers, K.G., 1985. Morphogenesis of developmental stages of *Dirofilaria immitis* (Nematoda) in dogs. Proc. Helm. Soc. Wash. 52, 98-113.

- Licka, M., Zimmermann, R., Zehelein, J., Dengler, T.J., Katus, H.A., Kübler, W., 2002. Troponin T concentrations 72 hours after myocardial infarction as a serological estimate of infarct size. *Heart* 87, 520-524.
- Linde, A., Summerfield, N.J., Clifford, C.A., Knight, D.H., Sleeper, M.M., 2003. Cardiac troponin I levels in pericardial effusion and peripheral blood from dogs with neoplastic versus non-neoplastic etiologies. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 441.
- Linde, A., Summerfield, N.J., Sleeper, M.M., Wright, F.B., Clifford, C.A., Melgarejo, T., Knight, D.H., 2006. Pilot study on cardiac troponin I levels in dogs with pericardial effusion. *J. Vet. Cardiol.* 8, 19-23.
- Linklater, A.K.J., Lichtenberger, M.K., Thamm, D.H., Tilley, L., Kirby, R., 2007. Serum concentrations of cardiac troponin I and cardiac troponin T in dogs with class IV congestive heart failure due to mitral valve disease. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 17, 243-249.
- Liu, S. K., Das, K. M., Tashjian, R. J., 1966. Adult *Dirofilaria immitis* in the arterial system of a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 148, 1501-1507.
- Ljungvall, I., Höglund, K., Tidholm, A., Olsen, L.H., Borgarelli, M., Venge, P., Häggström, J., 2010. Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 153-159.
- Lobetti, R., Dvir, E., Pearson, J., 2002. Cardiac troponins in canine babesiosis. *J. Vet. Intern. Med.* 16, 63-68.
- Lobetti, R., Kirberger, R., Keller, N., Kettner, F., Dvir, E., 2012. NT-ProBNP and cardiac troponin I in virulent canine babesiosis. *Vet. Parasitol.* 190, 333-339.
- Lombard, C.W., Ackerman, N., 1984. Right heart enlargement in heartworm infected dogs. A radiographic, electrocardiographic, and echocardiographic correlation. *Vet. Radiol.* 25, 210-217.
- Losonsky, J.M., Thrall, D.E., Lewis, R.E., 1983. Thoracic radiographic abnormalities in 200 dogs with heartworm infestation. *Vet. Radiol.* 24, 120-123.
- Ludders, J.W., Grauer, G.F., Dubielzig, R.R., Ribble, G.A., Wilson, J.W., 1988. Renal microcirculatory and correlated histologic changes associated with dirofilariasis in

dogs. Am. J. Vet. Res. 49, 826-830.

Machida, T., Kokubu, H., Matsuda, K., Miyoshi, K., Uchida, E., 2010. Clinical use of D-dimer measurement for the diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs. J. Vet. Med. Sci. 72, 1301-1306.

Mair, J., 1997. Progress in myocardial damage detection: new biochemical markers for clinicians. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 34, 1-66.

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

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

Maron, B.J., Wolfson, J.K., Epstein, S.E., Roberts WC., 1986. Intramural (“small vessel”) coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. J. Am. Coll. Cardiol. 8, 545-557.

Marquardt, W.C., Demaree, R.S., Grieve, R.B., 2000. Parasitology and Vector Biology. Harcourt Academic Press, USA, 702 pp.

Martini, M., Capelli, G., Poglayen, G., Bertotti, F., Turilli, C., 1996. The validity of some haematological and ELISA methods for the diagnosis of canine heartworm disease. Vet. Res. Commun. 20, 331-339.

Mass, H., Ali, I., Velez, W., Santiago, O., 1992. Hemodynamics of heartworm infection. Ann. N. Y. Acad. Sci. 653, 206-210.

Mastorilli, C., Dondi, F., Agnoli, C., Turba, M.E., Vezzali, E., Gentilini, F., 2007. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans* Australis serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004). J. Vet. Intern. Med. 21, 3-10.

Mavromatis, B.H., Kessler, C.M., 2001. D-dimer testing: the role of the clinical laboratory in the diagnosis of pulmonary embolism. J. Clin. Pathol. 54, 664-668.

McCall, J.W., 1992. A parallel between experimentally induced canine and feline heartworm disease. En: Proceedings of XVII World Small Animal Veterinary Association World Congress, Delfino Publisher, Rome, pp. 255–261.

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

McCall, J.W., 2005. The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventatives: A review, an update and recommendations. Vet. Parasitol. 133, 197-206.

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

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

McCall, J.W., Guerrero, J., Roberts, R.E., Supakorndej, N., Mansour, A.E., Dzimianski, M.T., McCall, S.D., 2001a. Further evidence of clinical prophylactic (reach-back) and adulticidal activity of monthly administration of ivermectin and pyrantel pamoate (Heartgard Plus) in dogs experimentally infected with heartworms. En: Seward, R.L. (Eds.), Proceedings of the American Heartworm Symposium'01, American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 189-200.

McCall, J.W., Hack, R., McCall, S.D., Mansour, A.E., Supakorndej, N., Supakorndej, P., Steffens, W.L., 2001b. Evaluation of repeated monthly dosing of selamectin against *Dirofilaria immitis* beginning at three months after experimental inoculation of heartworm larvae in dogs. En: Seward, R.L. (Eds.), Proceedings of the American Heartworm Symposium'01, American Heartworm Society, Batavia, IL.

McCall, J.W., McTier, T.L., Ryan, W.G., Gross, S.J., Soll, M.D., 1996. Evaluation of ivermectin and milbemycin oxime efficacy against *Dirofilaria immitis* infections of three and four months' duration in dogs. Am. J. Vet. Res. 57, 1189-1192.

McCall, J.W., Guerrero, J., Roberts, R.E., Suakornjej, N., Mansour, A.E., Dzimianski, M.T., McCall, S.D., 2003. Further evidence of clinical prophylactic (reach-back) and adulticidal activity of monthly administration of ivermectin and pyrantel pamoate in dogs experimentally infected with heartworms. En: Seward, R.L., Knight, D.H. (Eds.), Recent Advances in Heartworm Disease, Symposium'01. American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 189-200.

McCall JW, Ryan WG, Roberts RE, Dzimianski, M.T., 1998. Heartworm adulticidal activity of prophylactic doses of ivermectin (6 mg/kg) plus pyrantel administered

monthly to dogs. En: Soll, M.D., Knight, D.H. (Eds.), Proceedings of the American Heartworm Symposium'98. American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 209-215.

McCall, J.W., Supakorndej, N., Donoghue, A.R., Turnbull, R.K., 2000. Study to determine the performance of commercially available canine heartworm antigen test kits. En: Proceedings of the American Association of Veterinary Parasitologists, July 22th-25th, 2000, Salt Lake City, Utah.

McCall, J.W., Suprakorndej, P., Dzimianski, M.T., Supakorndej, N., Mansour, A.E., Jun, J.J., McCall, S.D., Wang, G.T., Sinha, A., Rulli, R.D., 2001c. Evaluation of retroactive and adulticidal activity of moxidectin canine SR (sustained release) injectable formulation against *Dirofilaria immitis* infections in beagles. En: Seward, R.L. (Eds.), Proceedings of the American Heartworm Symposium'01, American Heartworm Society, Batavia, IL.

McCord, J., Nowak, R.M., Hudson, M.P., McCullough, P.A., Tomlanovich, M.C., Jacobsen, G., Tokarski, G., Khoury, N., Weaver, W.D., 2003. The prognostic significance of serial myoglobin, troponin I, and creatine kinaseMB measurements in patients evaluated in the emergency department for acute coronary syndrome. Ann. Emerg. Med. 42, 343-350.

McCord, J., Nowak, R.M., McCullough, P.A., Foreback, C., Borzak, S., Tokarski, G., Tomlanovich, M.C., Jacobsen, G., Weaver, W.D., 2001. Ninety-minute exclusion of acute myocardial infarction by use of quantitative point-of-care testing of myoglobin and troponin I. Circulation 104, 1483-1488.

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

McHaffie, J., 2012. *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia pipientis*: a thorough investigation of the symbiosis responsible for canine heartworm disease. Parasitol. Res. 110, 499-502.

McKenzie, E.C., Jose-Cunilleras, E., Hinchcliff, K.W., Holbrook, T.C., Royer, C., Payton, M.E., Williamson, K., Nelson, S., Willard, M.D., Davis, M.S., 2007. Serum chemistry alterations in Alaskan sled dogs during five successive days of prolonged endurance exercise. J. Am. Vet. Med. Assoc. 230, 1486-1492.

McTier, T.L., McCall, J.W., Dzimianski, M.T., Mansour, A.E., Jernigan, A., Clark, J.N., Plue, R.E., Daurio, C.P., 1992. Prevention of heartworm infection in cats by treatment with ivermectin at one month post-infection. En: Soll, M.D. (Ed.), Proceedings of the

Heartworm Symposium '92, American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 111-116.

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

Melanson, S.E., Tanasijevic, M.J., Jarolim, P., 2007. Cardiac troponin assays: a view from the clinical chemistry laboratory. *Circulation* 116, e501-504.

Mellor, P.J., Mellanby, R.J., Baines, E.A., Villiers, E.J., Archer, J., Herrtage, M.E., 2006. High serum troponin I concentration as a marker of severe myocardial damage in a case of suspected exertional heatstroke in a dog. *J. Vet. Cardiol.* 8, 55-62.

Metzler, B., Hammerer-Lercher, A., Jehle, J., Dietrich, H., Pachinger, O., Xu, Q., Mair, J., 2002. Plasma cardiac troponin T closely correlates with infarct size in a mouse model of acute myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta.* 325, 87-90.

Meyer, T., Binder, L., Hruska, N., Luthe, H., Buchwald, A.B., 2000. Cardiac troponin I elevation in acute pulmonary embolism is associated with right ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 1632-1636.

Missov, E., Calzolari, C., Pau, B., 1997. Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure. *Circulation* 96, 2953-2958.

Moise, N.S., 1988. Echocardiography. En: Fox, P.R. (Ed.), *Canine and Feline Cardiology*, Churchill Livingstone, Inc., New York, pp. 113-156.

Montague, C., Kircher, T., 1995. Myoglobin in the early evaluation of acute chest pain. *Am. J. Clin. Pathol.* 104, 472-476.

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

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

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F., 2011. Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, cats and humans

from the island of Gran Canaria, Spain. Vet. Parasitol. 176, 291-294.

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

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

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

Morchón, R., 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. Vet. Parasitol. 125, 313-321.

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

Morini, S., Venco, L., Fagioli, P., Genchi, C., 1998. Surgical removal of heartworms versus melarsomine treatment of naturally-infected dogs with risk of thromboembolism. En: Soll, M.D., Knight, D.H. (Eds.), Proceedings of the American Heartworm Symposium'98. American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 235-240.

Morrow, D., 2003. Cardiac-specific troponins beyond ischemic heart disease, En: Wu, A.H.B. (Ed.), Cardiac Markers, 2nd ed, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 149-170.

Moser, K.M., Guisan, M., Bartimmo, E.E., Longo, A.M., Harsanyi, P.G., Chiorazzi, N., 1973. In vivo and post mortem dissolution rates of pulmonary emboli and venous thrombi in the dog. Circulation 48, 170-178.

Müller-Bardorff, M., Hallermayer, K., Schröder A., Ebert, C., Borgya, A., Gerhardt, W., Remppis, A., Zehelein, J., Katus, H.A., 1997. Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation.

Clin. Chem. 43, 458-466.

Müller-Bardorff, M., Weidtmann, B., Giannitsis, E., Kurowski, V., Katus, H.A., 2002. Release kinetics of cardiac troponin T in survivors of confirmed severe pulmonary embolism. Clin. Chem. 48, 673-675.

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

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

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

Nelson, O.L., Andreasen, C., 2002. The role of plasma D-dimer to detect thromboembolic disease in the dog. J. Vet. Intern. Med. 16, 375.

Nelson, O.L., Andreasen, C., 2003. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. J. Vet. Intern. Med. 17:830-834.

Neumayr, G., Gaenger, H., Pfister, R., Sturm W, Schwarzacher, S.P., Eibl, G., Mitterbauer, G., Hoertnagl, H., 2001. Plasma levels of cardiac troponin I after prolonged strenuous exercise. Am. J. Cardiol. 87, 369-371, A10.

Newby, L.K., Jesse, R.L., Babb, J.D., Christenson, R.H., De Fer, T.M., Diamond, G.A., Fesmire, F.M., Geraci, S.A., Gersh, B.J., Larsen, G.C., Kaul, S., McKay, C.R., Philippides, G.J., Weintraub, W.S., 2012. ACCF 2012 expert consensus document on practical clinical considerations in the interpretation of troponin elevations: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on clinical expert consensus documents. J. Am. Coll. Cardiol. 60, 2427-2463.

Newby, L.K., Storrow, A.B., Gibler, W.B., Garvey, J.L., Tucker, J.F., Kaplan, A.L., Schreiber, D.H., Tuttle, R.H., McNulty, S.E., Ohman, E.M., 2001. Bedside multimarker testing for risk stratification in chest pain units: the chest pain evaluation by creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I (CHECKMATE) study. Circulation 103, 1832-1837.

Nomoto, K., Mori, N., Shoji, T., Nakamura, K., 1987. Early loss of myocardial myoglobin detected immunohistochemically following occlusion of the coronary artery in rats. *Exp. Mol. Pathol.* 47, 390-402.

Noszczyk-Nowak, A., 2011. NT-pro-BNP and troponin I as predictors of mortality in dogs with heart failure. *Pol. J. Vet. Sci.* 14, 551-556.

O'Brien, P.J., 2008. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 245, 206-218.

O'Brien PJ, Dameron, G.W., Beck, M.L., Kang, Y.J., Erickson, B.K., Di Battista, T.H., Miller, K.E., Jackson, K.N., 1997a. Mittelstadt S. Cardiac troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab. Anim. Sci.* 47, 486-495.

O'Brien, P.J., Landt, Y., Ladenson, J.H., 1997b. Differential reactivity of cardiac and skeletal muscle from various species in a cardiac troponin I immunoassay. *Clin. Chem.* 43, 2333-2338.

O'Brien, P.J., Smith, D.E., Knechtel, T.J., Marchak, M.A., Pruimboom-Brees, I., Brees, D.J., Spratt, D.P., Archer, F.J., Butler, P., Potter, A.N., Provost, J.P., Richard, J., Snyder, P.A., Reagan, W.J., 2006. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab. Anim.* 40, 153-171.

Ohman, E.M., Armstrong, P.W., Christenson, R.H., Granger, C.B., Katus, H.A., Hamm, C.W., O'Hanesian, M.A., Wagner, G.S., Kleiman, N.S., Harrell, F.E.Jr., Califf, R.M., Topol, E.J., 1996. Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia. GUSTO IIA Investigators. *N. Engl. J. Med.* 335, 1333-1341.

Olson, N.C., Scott, J.B., Stoffs, W.V., Robinson, N.E., 1982. Central blood volume and lung extravascular thermal volume in dogs with dirofilariasis. *Am. J. Vet. Res.* 43, 1019-1022.

Organización Mundial de la Salud. Nota informativa. Septiembre 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>.

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

Otto, C.M., Rieser, T.M., Brooks, M.B., Russell, M.W., 2000. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 1500-1504.

Oyama, M.A., Sisson, D.D., 2004. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac

disease. J. Vet. Intern. Med. 18, 831-839.

Oyama, M.A., Sisson, D.D., Solter, P.F., 2007. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. Am. J. Vet. Res. 68, 42-47.

Oyama, M.A., Solter, P.F., 2004. Validation of an immunoassay for measurement of canine cardiac troponin I. J. Vet. Cardiol. 6, 17-24.

Paes-de-Almeida, E.C., Ferreira, A.M., Labarthe, N.V., Caldas, M.L., McCall, J.W., 2003. Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). Vet. Parasitol. 113, 157-168.

Palla, A., Petruzzelli, S., Donnamaria, V., Giuntini, C., 1995. The role of suspicion in the diagnosis of pulmonary embolism. Chest 105, 21S-24S.

Palmer, K.G., King, L.G., Van Winkle, T.J., 1998. Clinical manifestations and associated disease syndromes in dogs with cranial vena cava thrombosis: 17 cases (1989-1996). J. Am. Vet. Med. Assoc. 213, 220-224.

Panteghini, M., 2005. Standardization of cardiac troponin I measurements: the way forward? Clin. Chem. 51, 1594-1597.

Panteghini, M., Pagani, F., Yeo, K.T., Apple, F.S., Christenson, R.H., Dati, F., Mair, J., Ravkilde, J., Wu, A.H., Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC, 2004. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. Clin. Chem. 50, 327-332.

Páramo, J.A., 2010. Utilidad del Dímero D en el diagnóstico de CID. En: Páramo, J.A. (Ed.), Manual práctico para el empleo del Dímero-D. Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH), pp. 37-46.

Parker, M.M., Shelhamer, J.H., Bacharach, S.L., Green, M.V., Natanson, C., Frederick, T.M., Damske, B.A., Parrillo, J.E., 1984. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. Ann. Intern. Med. 100, 483-490.

Patton, O.S., Garner, F.M., 1970. Cerebral infarction caused by heartworm (*Dirofilaria immitis*) in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156, 600-605.

Payne, E.E., Roberts, B.K., Schroeder, N., Burk, R.L., Schermerhorn, T., 2011.

Assessment of a point-of-care cardiac troponin I test to differentiate cardiac from noncardiac causes of respiratory distress in dogs. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 21, 217-225.

Pearson, S.D., Polak, J.L., Cartwright, S., McCabe-Hassan, S., Lee, T.H., Goldhaber, S.Z., 1995. A critical pathway to evaluate suspected deep vein thrombosis. *Arch. Intern. Med.* 155, 1773-1778.

Pelander, L., Häggström, J., Jones, B., 2002. Troponin I- a posible marker of myocardial cell damage in the dog? *Europ. J. Comp. Anim. Pract.* 12, 66-71.

Pelander, L., Hagman, R., Häggström, J., 2008. Concentrations of cardiac Troponin I before and after ovariohysterectomy in 46 female dogs with pyometra. *Acta Vet. Scand.* 50, 35.

Pelander, L., Ljungvall, I., Häggström, J., 2010. Myocardial cell damage in 24 dogs bitten by the common European viper (*Vipera berus*). *Vet. Rec.* 166, 687-690.

Penaloza, A., Roy, P.M., Kline, J., Verschuren, F., LE Gal, G., Quentin-Georget, S., Delvau, N., Thys, F., 2012. Performance of age-adjusted D-dimer cut-off to rule out pulmonary embolism. *J. Thromb. Haemost.* 10, 1291-1296.

Peribáñez, M.A., Lucientes, J., Arce, S., Morales, M., Castello, J.A., Gracia, M.J., 2001. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Achantocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP. *Vet. Parasitol.* 102, 173-175.

Perrier, A., Desmarais, S., Goehring, C., de Moerloose, P., Morabia, A., Unger, P.F., Slosman, D., Junod, A., Bounameaux, H., 1997. D-dimer testing for suspected pulmonary embolism in outpatients. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 156, 492-496.

Phillips, W., Giguere, S., Franklin, R.P., Hernandez, J., Adin, D., Peloso, J.G., 2003. Cardiac troponin I in pastured and race-training thoroughbred horses. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 597-599.

Planellas, M., Cuenca, R., Tabar, M.D., Bertolani, C., Poncet, C., Closa, J.M., Lorente, J., Cerón, J.J., Pastor, J., 2012. Evaluation of C-reactive protein, Haptoglobin and cardiac troponin I levels in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome. *BMC Vet. Res.* 8, 152.

Porciello, F., Rishniw, M., Herndon, W.E., Biretoni, F., Antognoni, M.T., Simpson, K.W., 2008. Cardiac troponin I is elevated in dogs and cats with azotaemia renal failure and in dogs with non-cardiac systemic disease. *Aust. Vet. J.* 86, 390-394.

Prosek, R., Sisson, D.D., Oyama, M.A., Solter, P.F., 2007. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 238-242.

Qiu, Y., Sutton, L., Riggs, A.F., 1998. Identification of myoglobin in human smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 273, 23426-23432.

Quinn, D.A., Fogel, R.B., Smith, C.D., Laposata, M., Taylor Thompson, B., Johnson, S.M., Waltman, A.C., Hales, C.A., 1999. D-dimers in the diagnosis of pulmonary embolism. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1445-1449.

Quiroz-Romero, H., 1984. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Editorial Limusa, México. 876 pp.

Rajappa, M., Sharma, A., 2005. Biomarkers of cardiac injury: an update. *Angiology* 56, 677-691.

Ramachandran, S.V., 2006. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 113, 2335-2362.

Rawlings, C.A., 1982. Clinical laboratory evaluations of seven heartworm infected beagles: during disease development and following treatment. *Cornell Vet.* 72, 49-56.

Rawlings, C.A., 1986. *Heartworm disease in dogs and cats*. WB Saunders Co, Philadelphia, 325 pp.

Rawlings, C.A., 2002. Effect of monthly heartworm preventatives on dogs with young heartworm infections. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 38, 311-314.

Rawlings, C.A., Bowman, D.D., Howerth, E.W., Stansfield, D.G., Legg, W., Luempert, L.G., 2001. Response of dogs treated with ivermectin or milbemycin starting at various intervals after *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Ther.* 2, 193-207.

Rawlings, C.A., Dawe, D.L., McCall, J.W., Keith, J.C., Prestwood, A.K., 1982. Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 1323-1326.

Rawlings, C.A., Keith, J.C., Schaub, R.G., 1981. Development and resolution of pulmonary disease in heartworm infection: Illustrated review. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 17, 711-720

Rawlings, C.A., Keith, J.C., Schaub, R.G., Losonsky, J.M., Lewis, R.E., McCall, J.W., 1983. Post adulticide treatment pulmonary disease and its modification with prednisolone and Aspirin. En: Otto, G.F. (Ed.), Proceedings of the American Heartworm Symposium '83, Veterinary Medical Publishing Co, Edwardsville, KS, p. 122.

Rawlings, C.A., McCall, J.W., Lewis, R.E., 1978. The response of the canine's heart and lungs to *Dirofilaria immitis*. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 14, 17-32.

Rawlings, C.A., Prestwood, A.K., Beck, B.B., 1980. Eosinophilia and basophilia in *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 16, 699-704.

Rawlings, C.A., Tonelli, Q., Lewis, R., Duncan, J.R., 1993. Semiquantitative test for *Dirofilaria immitis* as a predictor of thromboembolic complications associated with heartworm treatment in dogs. Am. J. Vet. Res. 54, 914-919.

Reber, G., de Moerloose, P., 2000. D-dimer assays for the exclusion of venous thromboembolism. Semin. Thromb. Hemost. 26, 619-624.

Remppis, A., Ehlermann, P., Giannitsis, E., Greten, T., Most, P., Müller-Bardorff, M., Katus, H.A., 2000. Cardiac troponin T levels at 96 hours reflect myocardial infarct size: a pathoanatomical study. Cardiology 93, 249-253.

Ricchiuti, V., Sharkey, S.W., Murakami, M.M., Voss, E.M., Apple, F.S., 1998. Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. Am. J. Clin. Pathol. 110, 241-247.

Rifai, N., Douglas, P.S., O'Toole, M., Rimm, E., Ginsburg, G.S., 1999. Cardiac troponin T and I, echocardiographic wall motion analyses, and ejection fractions in athletes participating in the Hawaii Ironman Triathlon. Am. J. Cardiol. 83, 1085-1089.

Rishniw, M., Barr, S.C., Simpson, K.W., Winand, N.J., Wootton, J.A., 2004a. Cloning and sequencing of the canine and feline cardiac troponin I genes. Am. J. Vet. Res. 65, 53-58.

Rishniw, M., Porciello, F., Herndon, W.E., Birretoni, F., Antognoni, M.T., Simpson, K.W., Fruganti, G., 2004b. Cardiac troponin I concentrations in dogs and cats with

renal insufficiency. En: Proceedings of the European College of Veterinary Internal Medicine-Companion Animals, September 11th-14th, 2004, Barcelona, Spain, p. 197.

Rohn, D.A., Davis, K.L., Mehlhorn, U., Allen, S.J., Laine, G.A., 1995. Myocardial edema and compromised left ventricular function attributable to dirofilariasis and cardiopulmonary bypass in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 56, 221-226.

Rosser, E.J.Jr., 2009. Use of the D-dimer assay for diagnosing thrombosis in cases of canine cutaneous vasculitis. *Vet. Dermatol.* 20, 586-590.

Rumley, A., Emberson, J.R., Wannamethee, S.G., Lennon, L., Whincup, P.H., Lowe, G.D., 2006. Effects of older age on fibrin D-dimer, C-reactive protein, and other hemostatic and inflammatory variables in men aged 60-79 years. *J. Thromb. Haemost.* 4, 982-987.

Sacchi, L., Corona, S., Casiraghi, M., Bandi, C., 2002. Does fertilization in the filarial nematode *Dirofilaria immitis* occur through endocytosis of spermatozoa? *Parasitology* 124, 87-95.

Sasaki, Y., Kitagawa, H., Hirano, Y., 1992. Relationship between pulmonary arterial pressure and lesions in the pulmonary arteries and parenchyma, and cardiac valves in canine dirofilariasis. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 739-744.

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

Saunders, A.B., Hanzlicek, A.S., Martinez, E.A., Stickney, M.J., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., Fosgate, G.T., 2009a. Assessment of cardiac troponin I and C-reactive protein concentrations associated with anesthetic protocols using sevoflurane or a combination of fentanyl, midazolam, and sevoflurane in dogs. *Vet. Anaesth. Analg.* 36, 449-456.

Saunders, A.B., Smith, B.E., Fosgate, G.T., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M., 2009b. Cardiac troponin I and C-reactive protein concentrations in dogs with severe pulmonic stenosis before and after balloon valvuloplasty. *J. Vet. Cardiol.* 11, 9-16.

Sbarouni, E., Bradshaw, A., Andreotti, F., Tuddenham, E., Oakley, C.M., Cleland, J.G., 1994. Relationship between hemostatic abnormalities and neuroendocrine activity in

heart failure. Am. Heart J. 127, 607-612.

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

Schober, K.E., 2005. Biochemical markers of cardiovascular disease. En: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), Textbook of Veterinary Internal Medicine, 6th ed. Elsevier, St. Louis, pp. 940-948.

Schober, K.E., Cornand, C., Kirbach, B., Aupperle, H., Oechtering, G., 2002. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 221, 381-388.

Schober, K.E., Kirbach, B., Oechtering, G., 1999. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. J. Vet. Cardiol. 1, 17-25.

Schreier, T., Kedes, L., Gahlmann, R., 1990. Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene. J. Biol. Chem. 265, 47-53.

Scott-Moncrieff, J.C., Treadwell, N.G., McCullough, S.M., Brooks, M.B., 2001. Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 37, 220-227.

Selting, K.A., Lana, S.E., Ogilvie, G.K., Olmstead, A., Mykles, D.L., Bright, J., Richardson, K.L., Walton, J.A., Monnet, E., Fettman, M.J., 2004. Cardiac troponin I in canine patients with lymphoma and osteosarcoma receiving doxorubicin: comparison with clinical heart disease in a retrospective analysis. Vet. Comp. Oncol. 2, 142-156.

Segev, G., Ohad, D.G., Shipov, A., Kass, P.H., Aroch, I., 2008. Cardiac arrhythmias and serum cardiac troponins in vipera palaestinae envenomation in dogs. J. Vet. Intern. Med. 22, 106-113.

Serra, M., Papakonstantinou, S., Adamcova, M., O'Brien, P.J., 2010. Veterinary and toxicological applications for the detection of cardiac injury using cardiac troponin. Vet. J. 185, 50-57.

Sevimli, F.K., Kozan, E., Bülbül, A., Birdane, F.M., Köse, M., Sevimli, A., 2007. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: unusually located and unusual findings. Parasitol. Res. 101, 1487-1494.

Sharkey, L.C., Berzina, I., Ferasin, L., Tobias, A.H., Lulich, J.P., Hegstad-Davies, R.L., 2009. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in dogs with renal failure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 767-770.

Sharma, M.C., Pachauri, S.P., 1982. Blood cellular and biochemical studies in canine dirofilariasis. *Vet. Res. Commun.* 5, 295-300.

Shaw, S.P., Rozanski, E.A., Rush, J.E., 2004. Cardiac troponin I and T in dogs with pericardial effusion. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 322-324.

Shober, K.E., Kirback, B., Oechtering, G., 1999. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. *J. Vet. Cardiol.* 1, 17-25.

Sidelmann, J.J., Gram, J., Jespersen, J., Kluft, C., 2000. Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Semin. Thromb. Hemost.* 26, 605-618.

Silvestrini, P., Piviani, M., Alberola, J., Rodríguez-Cortés, A., Planellas, M., Roura, X., O'Brien, P.J., Pastor, J., 2012. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. *Vet. Clin. Pathol.* 41, 568-574.

Simón, F., Genchi, C., Prieto, G., Allende, E., 2001. Immunity in the vertebrate hosts. En: Simón, F., Genchi, C. (Eds.), *Heartworm infection in humans and animals*, Ediciones Universidad de Salamanca, España, pp. 83-101.

Simón, F., Kramer, L.H., Román, A., Blasini, W., Morchón, R., Marcos-Atxutegi, C., Grandi, G., Genchi, C., 2007. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Res. Commun.* 31, 161-171.

Simón, F., López-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Morchón, R., Martín-Pacho, J.R., 2005. What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? *Vet. Parasitol.* 132, 181-189.

Simón, F., Morchón, R., González, J., 2009. *Dirofilariosis canina en La Coruña*. *Argos* 106, 10-12.

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

Singh, V., Martinezclark, P., Pascual, M., Shaw, E.S., O'Neill, W.W., 2010. Cardiac biomarkers - the old and the new: a review. *Coron. Artery Dis.* 21, 244-256.

Singletary, G.E., Saunders, A.B., Saunders, W.B., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M., Fosgate, G.T., Hartsfield, S.M., 2010. Cardiac troponin I concentrations following medetomidine-butorphanol sedation in dogs. *Vet. Anaesth. Analg.* 37, 342-346.

Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Di Sacco, B., Damiani, G., Genchi, C., 1995. A close relative of the arthropods endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74, 223-227.

Sisson, D.D., 2004. Neuroendocrine evaluation. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pr.* 34, 1105-1126.

Sleeper, M.M., Clifford, C.A., Laster, L.L., 2001. Cardiac troponin I in the normal dog and cat. *J. Vet. Intern. Med.* 15, 501-503.

Slocombe, J.O.D., Surgeoner, G.A., Srivastava, B., 1989. Determination of the heartworm transmission period and its use in diagnosis and control. En: Otto, G.F. (Ed.), *Proceedings of the Heartworm Symposium '89*. American Heartworm Society, Washington DC, pp. 19-26.

Slonka, G.F., Castleman, W., Krum, S., 1977. Adult heartworms in arteries and veins of a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170, 717-719.

Smith, S.C., Ladenson, J.H., Mason, J.W., Jaffe, A.S., 1997. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. Experimental and clinical correlates. *Circulation* 95, 163-168.

Snyder, D.E., Wiseman, S., Cruthers, L.R., Slone, R.L., 2011. Ivermectin and milbemycin oxime in experimental adult heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection of dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 61-64.

Spangenthal, E.J., Ellis, A.K., 1995. Cardiac and skeletal muscle myoglobin release after reperfusion of injured myocardium in dogs with systemic hypotension. *Circulation* 91, 2635-2641.

Spratt, D.P., Mellanby, R.J., Drury, N., Archer, J., 2005. Cardiac troponin I: evaluation of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *J. Small Anim. Pract.* 46, 139-145.

Stein, P.D., Athanasoulis, C., Alavi, A., Greenspan, R.H., Hales, C.A., Saltzman, H.A., Vreim, C.E., Terrin, M.L., Weg, J.G., 1992. Complications and validity of pulmonary angiography in acute pulmonary embolism. *Circulation* 85, 462-468

St Louis, P., Grandhi, S., 1994. Cardiac contusion and creatine kinase-MB: a pertinent case history and brief review of the utility of CK-MB. *Clin. Chem.* 27, 105-111.

Stokol, T., 2003. Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 1419-1435.

Stokol, T., Brooks, M.B., Erb, H.N., Mauldin, G.E., 2000. D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. *Am. J. Vet. Res.* 61, 393-398.

Stolear, J.C., Georges, B., Shita, A., Verbeelen, D., 1999. The predictive value of cardiac troponin T measurements in subjects on regular haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant* 14, 1961-1967.

Stone, M.J., Willerson, J.T., Gomez-Sanchez, C.E., Waterman, M.R., 1975. Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. Results in patients with acute myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 56, 1334-1339.

Strickland, K.N., 1998. Canine and feline caval syndrome. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 13, 88-95.

Stubbs, P., Collinson, P., Moseley, D., Greenwood, T., Noble, M., 1996. Prognostic significance of admission troponin T concentrations in patients with myocardial infarction. *Circulation* 94, 1291-1297.

Sybrandy, K.C., Cramer, M.J.M., Burgerdijk, C., 2003. Diagnosing cardiac contusion: old wisdom and new insights. *Heart* 89, 485-489.

Tarducci, A., Abate, O., Borgarelli, M., Borrelli, A., Zanatta, R., Cagnasso, A., 2004. Serum values of cardiac troponin-T in normal and cardiomyopathic dogs. *Vet. Res. Comm.* 28, 385-388.

Tarnow, I., Falk, T., Tidholm, A., Martinussen, T., Jensen, A.L., Olsen, L.H., Pedersen, H.D., Kristensen, A.T., 2007. Hemostatic biomarkers in dogs with chronic congestive heart failure. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 451-457.

Taylor, A.E.R., 1960. The development of *Dirofilaria immitis* in the mosquitoes *Aedes aegypti*. J. Helminthol. 34, 27-38.

Taylor, M.J., Bandi, C., Hoerauf, A., 2005a. *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. Adv. Parasitol. 60, 248-286.

Taylor, M.J., Cross, H.F., Ford, L., Makunde, W.H., Prasad, G.B., Bilo, K., 2001. *Wolbachia* bacteria in filarial immunity and disease. Parasite Immunol. 23, 401-409.

Taylor, M.J., Makunde, W.H., McGarry, H.F., Turner, J.D., Mand, S., Hoerauf, A., 2005b. Macrofilaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: a double-blind, randomised placebo-controlled trial. Lancet 365, 2116-2121.

Tholen, I., Weingart, C., Kohn, B., 2009. Concentration of D-dimers in healthy cats and sick cats with and without disseminated intravascular coagulation (DIC). J. Feline Med. Surg. 11, 842-846.

Tita-Nwa, F., Bos, A., Adjei, A., Ershler, W.B., Longo, D.L., Ferrucci, L., 2010. Correlates of D-dimer in older persons. Aging Clin. Exp. Res. 22, 20-23.

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

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

Torbicki, A., Kurzyna, M., Kuca, P., Fijałkowska, A., Sikora, J., Florczyk, M., Pruszczyk, P., Burakowski J, Wawrzyńska L., 2003. Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. Circulation 108, 844-848.

Torbicki, A., Perrier, A., Konstantinides, S., Agnelli, G., Galiè, N., Pruszczyk, P., Bengel, F., Brady, A.J., Ferreira, D., Janssens, U., Klepetko, W., Mayer, E., Remy-Jardin, M., Bassand, J.P., ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), 2008. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). Eur. Heart J. 29, 2276-2315.

Trafny, D.J., Freeman, L.M., Bulmer, B.J., MacGregor, J.M., Rush, J.E., Meurs, K.M.,

Oyama, M.A., 2012. Auscultatory, echocardiographic, biochemical, nutritional, and environmental characteristics of mitral valve disease in Norfolk terriers. *J. Vet. Cardiol.* 14, 261-267.

Trafny, D.J., Oyama, M.A., Wormser, C., Reynolds, C.A., Singletary, G.E., Peddle, G.D., 2010. Cardiac troponin-I concentrations in dogs with bradyarrhythmias before and after artificial pacing. *J. Vet. Cardiol.* 12, 183-190.

Tsung, J.S., Tsung, S.S., 1986. Creatine kinase isoenzymes in extracts of various human skeletal muscles. *Clin. Chem.* 32, 1568-1570.

Tunstall-Pedoe, H., Kuulasmaa, K., Amouyel, P., Arveiler, D., Rajakangas, A.M., Pajak, A., 1994. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project: registration procedures, event rates, and casefatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 90, 583-612.

Vaidya, H.C., 1992. Myoglobin. *Lab. Med.* 23, 306-310.

Van Blerk, M., Maes, V., Huyghens, L., Derde, M.P., Meert, R., Gorus, F.K., 1992. Analytical and clinical evaluation of creatine kinase MBmass assay by IMx: comparison with MB isoenzyme activity and serum myoglobin for early diagnosis of myocardial infarction. *Clin. Chem.* 38, 2380-2386.

Varki, A.P., Roby, D.S., Watts, H., Zatuchni, J., 1978. Serum myoglobin in acute myocardial infarction: a clinical study and review of the literature. *Am. Heart J.* 96, 680-688.

Vasan, R.S., 2006. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 113, 2335-2362.

Velmahos, G.C., Karauskakis, M., Salim, A., Toutouzas, K.G., Murray, J., Asensio, J., Demetriades, D., 2003. Normal electrocardiography and serum troponin I levels preclude the presence of clinically significant blunt cardiac injury. *J. Trauma* 54, 45-51.

Venco, L., Genchi, C., Vigevani Colson, P., Kramer, L., 2003. Relative utility of echocardiography, radiography, serologic testing and microfilariae counts to predict adult worm burden in dogs naturally infected with heartworms. En: Seward, R.L., Knight, D.H. (Eds.), *Recent Advances in Heartworm Disease, Symposium'01*. American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 111-124.

Venco, L., McCall, J. W., Guerrero, J., Genchi, C., 2004. Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infection in dogs. *Vet. Parasitol.* 124, 259-268.

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

Ver Elst, K.M., Spapen, H.D., Nguyen, D.N., Garbar, C., Huyghens, L.P., Gorus, F.K., 2000. Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. *Clin. Chem.* 46, 650-657.

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

Wakabayashi, Y., Kikuno, T., Ohwada, R., Kikawada, R., 1994. Rapid fall in blood myoglobin in massive rhabdomyolysis and acute renal failure. *Intens. Care Med.* 20, 109-112.

Wakshlag, J.J., Kraus, M.S., Gelzer, A.R., Downey, R.L., Vacchani, P., 2010. The influence of high-intensity moderate duration exercise on cardiac troponin I and C-reactive protein in sled dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 1388-1392.

Walker, J.B., Nesheim, M.E., 1999. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. *J. Biol. Chem.* 274, 5201-5212.

Wang, J.S., Tung, K.C., Huang, C.C., Lai, C.H., 2005. Alteration of extracellular collagen matrix in the myocardium of canines infected with *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* 131, 261-265.

Warman, S., Pearson, G., Barrett, E., Shelton, G.D., 2008. Dilatation of the right atrium in a dog with polymyositis and myocarditis. *J. Small Anim. Pract.* 49, 302-305.

Warwick, G., Thomas, P.S., Yates, D.H., 2008. Biomarkers in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 32, 503-512.

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

Weiner, D.J., Aguirre, G., Dubielzig, R., 1980. Ectopic-site filariid infection with immunologic follow-up of the host. En: Otto, G.F. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium'80, American Heartworm Society, Bonner Springs, Kansas, pp. 51–54.

Wells, P.S., Anderson, D.R., Bormanis, J., Guy, F., Mitchell, M., Gray, L., Clement, C., Robinson, K.S., Lewandowski, B., 1997. Value of assessment of pretest probability of deep-vein thrombosis in clinical management. *Lancet* 350, 1795-1798.

Wells, R.J., Sedacca, C.D., Aman, A.M., Hackett, T.B., Twedt, D.C, Shelton, G.D., 2009. Successful management of a dog that had severe rhabdomyolysis with myocardial and respiratory failure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 1049-1054.

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

Wess, G., Simak, J., Mahling, M., Hartmann, K., 2010. Cardiac troponin I in Doberman Pinschers with cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 843-849.

Wittenberg, B.A., Wittenberg, J.B., 1989. Transport of oxygen in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 51, 857–878.

Wroblewski, F., LaDue, J.S., 1955. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90 210-213.

Wu, A.B.H., 1989. C-isoforms in ischaemic heart disease. *Clin. Chem.* 35, 7-13.

Wu, A.H., Ford, L., 1999. Release of cardiac troponin in acute coronary syndromes: ischemia or necrosis? *Clin. Chim. Acta* 294, 161-174.

Wu, C.C., Fan, P.C., Chang, G.N., 1995. Experimental infection and microfilarial periodicity of *Dirofilaria immitis* in dogs. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 23, 117-127.

Yaeger, M.J., Mullin, K., Ensley, S.M., Ware, W.A., Slavin, R.E., 2012. Myocardial toxicity in a group of greyhounds administered ractopamine. *Vet. Pathol.* 49, 569-573.

Zoia, A., Augusto, M., Drigo, M., Caldin, M., 2012. Evaluation of hemostatic and fibrinolytic markers in dogs with ascites attributable to right-sided congestive heart failure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 241, 1336-1343.

VIII CURRICULUM VITAE

En el siguiente *Curriculum vitae*, se enumeran los trabajos publicados y actividades realizadas en relación a esta tesis doctoral.



“So, after tonight I am in the Evil League of Evil if all goes according to plan, which it will, because I hold a PhD in horribleness”.
(Dr Horrible, Dr. Horrible’s Sing-Along Blog)

Formación académica

28-02-2007 - Licenciatura en Veterinaria (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).

11-12-2009 - Diploma de Estudios Superiores en el programa de Doctorado “Clínica e Investigación Terapéutica” (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).

31-12-2011 - Master en Clínica Veterinaria e Investigación Terapéutica (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).

Estancias

01-06-2011/ 31-07-2011 - Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Università degli Studi di Parma (Italia).

25-01-2011/ 5-02-2011 - Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola, Universidad de Salamanca (España).

20-06-2012/ 20-08-2012 - Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Università degli Studi di Parma (Italia).

Publicaciones

REVISTAS INTERNACIONALES INDEXADAS

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

Montoya-Alonso, J.A., Mellado, I., Carretón, E., Cabrera-Pedrero, E.D., Morchón, R., Simón, F., 2010. Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol. Res.* 107, 1265-1269.

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

Montoya-Alonso, J.A., Cabrera-Pedrero, E.D., Carretón, E., Méndez, J.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F., 2011. Seroprevalence of human dirofilariasis on the island of Gran Canaria, Canary Islands-Spain. *Trop. Med. Int. Health* 16, 229.

Morchón, R., Carretón, E., Grandi, G., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., Genchi, C., Kramer, L.H., 2011. Anti-*Wolbachia* surface protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 17-20.

González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., 2012. Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Mol Biochem. Parasitol.* 181, 134-140

García-Guasch, L., Caro-Vadillo, A., Manubens-Grau, J., Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Evaluation of pulmonary function variables by using plethysmography in cats with respiratory disease associated to *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.* 187, 254-258.

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

Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J., Mellado-Hernández, I., 2012. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe. New distribution trends. *Front. Physiol.* 3, 196.

García-Guasch, L., Caro-Vadillo, A., Manubens-Grau, J., Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Kramer, L.H., Montoya-Alonso, J.A., 2013. Is *Wolbachia* participating in the bronchial reactivity of cats with heartworm associated respiratory disease? *Vet. Parasitol.* doi:pii: S0304-4017(13)00111-8. 10.1016/j.vetpar.2013.01.060.

González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., 2013. Surface associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Vet. Parasitol.* doi:pii: S0304-4017(13)00053-8. 10.1016/j.vetpar.2013.01.028.

Beristain-Ruiz, D.M., Carretón, E., Rodríguez-Alarcón, C., Montoya-Alonso, J.A., Barrera, R., 2013. SDS-PAGE analysis of urinary proteins in dogs with heartworm disease.

Iran J. Vet. Res. (aceptado)

García-Guasch, L., Manubens, J., Laporta, M., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. First case reported of broncho-reactivity in feline aelurostrongylosis by using barometric whole-body plethysmography. Vet Parasitol. (enviado)

REVISTAS NO INDEXADAS

Simón-Martín, F., Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., González-Miguel, J., Méndez, J., Carretón, E., 2012. Dirofilariosis animal y humana: una enfermedad en expansión. Profesión veterinaria 17, 16-28.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

Montoya, J.A., Corbera, J.A., Morales, M., Juste, M.C., Carretón, E. *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria island (Spain): fifteen years of epidemiological changes. Second European Dirofilaria Days. 16-18 Septiembre 2009. Salamanca (España). Ponencia.

Caballero, J., Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Montoya, J.A. Actual seroprevalence of *D.immitis* in dogs in Gran Canaria, the canary islands, Spain. Second European Dirofilaria Days. 16-18 Septiembre 2009. Salamanca (España). Comunicación oral.

Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Morchón, R., Montoya, J.A. Cardiopulmonar biomarker levels in dogs infected by *Dirofilaria immitis*. Second European Dirofilaria Days. 16-18 Septiembre 2009. Salamanca (España). Comunicación oral.

Montoya, J.A., Juste, M.C., Carretón, E., Mellado, I., Morchón, R. Are canary hounds a reservoir of *D. immitis* in the canary islands?. Second European Dirofilaria Days. 16-18 Septiembre 2009. Salamanca (España). Poster.

Cabrera-Pedrero, E.D., Mellado, I., Carretón, E., Montoya, J.A., Simón, F. Seroepidemiologic study of *D. immitis* in humans living in Gran Canaria, canary islands, Spain. Second European Dirofilaria Days. 16-18 September 2009. Salamanca (Spain). Poster.

Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: biochemical cardio-pulmonary marker levels. 13th Triennial State of the Heartworm Symposium. 15-18 Abril 2010. Memphis (EEUU). Comunicación oral.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Corbera, J.A., Juste MC, Morchón R, Simón, F. Evolution of the prevalence of *Dirofilaria immitis* in the island of Gran Canaria, Spain. 13th Triennial State of the Heartworm Symposium. 15-18 Abril 2010. Memphis

(EEUU). Comunicación oral.

González-Miguel, J., Hernández-Mellado, I., Rosario, L., Rota, E., Bottari, R., Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Simón, F., Morchón, R. Identification of immunoreactive proteins from individuals with human dirofilariosis. 13th Triennial State of the Heartworm Symposium. 15-18 Abril 2010. Memphis (EEUU). Poster.

Morchón, R., Simón, F., González-Miguel, J., Mellado, I., Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E. *Dirofilaria immitis* antigens up-regulate the expression of prostaglandin e2 (pge2) and other anti-inflammatory mechanisms. 13th Triennial State of the Heartworm Symposium. 15-18 Abril 2010. Memphis (EEUU). Poster.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Simón, F. *Dirofilaria immitis* on the island of Gran Canaria (Spain): a model of epidemiological changes. Russian Veterinary Congress & XVIII International Moscow Veterinary Congress. 24-26 Abril 2010. Moscow (Rusia). Ponencia

Simón, F., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. Do control dogs and cats the energetic metabolism and the anti-oxidative stress capacity of *Dirofilaria immitis* during cardiopulmonary dirofilariosis?. Russian Veterinary Congress & XVIII International Moscow Veterinary Congress. 24-26 Abril 2010. Moscow (Rusia). Ponencia.

Carretón, E., García-Guasch, L., Caro-Vadillo, A., Manubens, J., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Barometric whole-body plethysmography in feline heartworm disease. 20th ECVIM-CA Annual Congress. 9-11 Septiembre 2010. Toulouse (Francia). Poster.

Carretón, E., Barrera, R., Beristain, D.M., Duque, F.J., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Proteinuria in dogs with *Dirofilaria immitis*. 20th ECVIM-CA Annual Congress. 9-11 Septiembre 2010. Toulouse (Francia). Poster.

Carretón Gómez, E., Corbera Sánchez, J.A., Juste de Santa Ana, M.C., Morchón García, R., Simón Martín, F., Montoya Alonso, J.A. Valores de Dímero-D en perros con dirofilariosis. Congreso internacional de la Sociedad Española de Cirugía Veterinaria (SECIVE). XV Congreso Internacional de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria (SEMIV): Congreso de Veterinarios de Canarias. 19-20 Noviembre 2010. Gran Canaria (España). Comunicación oral.

Barrera Chacón, R., Beristain Ruiz, D.M., Carretón Gómez, E., Duque Carrasco, F.J., Morchón García, R., Zaragoza Bayle, C., Simón Martín, F., Ruiz Tapia, P., Montoya

Alonso, J.A. Estudio comparativo de la proteinuria glomerular en el perro: ehrlichiosis, piometra y dirofilariosis. XVIII Congreso internacional de la Sociedad Española de Cirugía Veterinaria (SECIVE). XV Congreso Internacional de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria (SEMIV): Congreso de Veterinarios de Canarias. 19-20 Noviembre 2010. Gran Canaria (España). Poster.

Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Variations in levels of cardiopulmonary biomarkers during adulticide treatment of *Dirofilaria immitis* in dogs. 17th FECAVA Eurocongress. 7-10 Septiembre 2011. Estambul (Turquía). Comunicación oral.

Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Kramer, L.H., Montoya-Alonso, J.A. Heartworm disease: levels of proteinuria in dogs naturally infected. 17th FECAVA Eurocongress. 7-10 Septiembre 2011. Estambul (Turquía). Comunicación oral.

Vieira, L., Carretón, E., Morchón, R., Fontes-Sousa, A.P., Silvestre-Ferreira, A.C., Mellado, I., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia* in cats from the north and north centre of Portugal. 17th FECAVA Eurocongress. 7-10 Septiembre 2011. Estambul (Turquía). Poster.

García-Guasch, L., Caro-Vadillo, A., Manubens, J., Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Study of breathing patterns in heartworm associated respiratory disease cats. 21th Annual ECVIM Congress. 8-10 Septiembre 2011. Sevilla (España). Poster.

Vieira, L., Morchón, R., Fontes-Sousa, A.P., Silvestre-Ferreira, A.C., Carretón, E., Mellado, I., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Current seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in cats from the north and north center of Portugal. 21th Annual ECVIM Congress. 8-10 Septiembre 2011. Sevilla (España). Poster.

Montoya-Alonso, J.A., Cabrera-Pedrero, E.D., Carretón, E., Méndez, J.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F. Seroprevalence of human dirofilariasis on the island of Gran Canaria, canary islands, Spain. 7th European Congress on Tropical Medicine & International Health. 3-6 Octubre 2011. Barcelona (España). Poster.

Carretón, E. Biomarcadores: Nuevas herramientas diagnósticas en dirofilariosis canina. International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Ponencia.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Méndez, J.C., Juste, M.C. *Dirofilaria immitis* en

las islas Canarias (España). International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Ponencia.

Vieira, L., Morchón, R., Fontes-Sousa, A.P., Silvestre-Ferreira, A.C., Vilhena, H., Carretón, E., Mellado, I., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Epidemiological survey of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats on the North and North Centre of Portugal. International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

Balreira, A.C., Silvestre-Ferreira, A.C., Fontes-Sousa, A.P., Vieira, L., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. Epidemiological survey of *Dirofilaria immitis* infection in dogs on the North and North Centre of Portugal – Preliminary results. International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Méndez, J.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F. Evolución de la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en la población canina y felina en la isla de Gran Canaria (2008-2011). International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

Pou Barreto, M.C., Melero Alcibar, R., Gálvez, R., Guerrero, I., Morchón García, R., Carretón, E., González Martín, C., Del Castillo Remiro, A., Molina, R., Valladares, B. Environmental factors influencing on mosquito distribution in Canary Islands (Spain). International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

Morchón, R., Carretón, E., Grandi, G., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Kramer, L.H., Simón, F. *Wolbachia* participa en la glomerulopatía que se produce en los perros microfilarémicos infectados por *Dirofilaria immitis*. International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

Santana, A.J., López, B., Carretón, E. Valores ecocardiográficos de hipertensión pulmonar en perros con dirofilariosis. International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

Montoya-Alonso, J.A., Cabrera-Pedrero, E.D., Carretón, E., Méndez, J.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F. *Dirofilaria immitis* en los carnívoros, un factor de riesgo zoonótico en la isla de Gran Canaria. International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado Hernández, I., Carretón, E., Montoya-

Alonso, J.A. Interacción de los productos excretores/secretorios de *Dirofilaria immitis* con el sistema fibrinolítico de su hospedador e implicación del endotelio vascular. International Workshop of Dirofilariosis. 18-19 Noviembre 2011. Gran Canaria (España). Poster.

Carretón, E., Kramer, L.H., Morchón, R., Simón, F., Grandi, G., Montoya-Alonso, J.A. Feline dirofilariasis: a clinical case in a hyperendemic area. WSAVA / FECVA / BSAVA World Congress 2012. 12-15 Abril 2012. Birmingham (Reino Unido). Poster.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E. Dirofilariosis: zoonosis emergente. International Congress of Veterinary Medicine. 8-15 Mayo 2012.

García-Guasch, L., Caro-Vadillo, A., Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Kramer, L.H., Manubens, J. Worsening of breathing patterns in HW-infected cats with presence of *Wolbachia* antibodies. Third European Dirofilaria Days. 21-22 Junio 2012. Parma (Italia). Poster.

González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F. Surface antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system. Third European Dirofilaria Days. 21-22 Junio 2012. Parma (Italia). Poster.

Hormaeche, M., Carretón, E., Guzzoni, S., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., Morchón, R. *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia* proteins are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae. Third European Dirofilaria Days. 21-22 Junio 2012. Parma (Italia). Comunicación oral.

Simón, F., González-Miguel, J., Kartashev, V., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. Human dirofilariosis: what is changing? Third European Dirofilaria Days. 21-22 Junio 2012. Parma (Italia). Ponencia.

Morchón, R., García-Guasch, L., Manubens, J., Armario, B., Carretón, E., Simón, L., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Prevalence of canine and feline dirofilariosis in Barcelona province (northeastern Spain). Third European Dirofilaria Days. 21-22 Junio 2012. Parma (Italia). Poster.

Carretón, E., Méndez, J.C., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A. Variation of cardiopulmonary biomarkers and other metabolic parameters during adulticide treatment in dogs with heartworm disease. Third European Dirofilaria Days. 21-22 Junio 2012. Parma (Italia). Comunicación oral.

Carretón, E., Grandi, G., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., Simón, F., Kramer, L.H. Expression of D-Dimer in lungs and kidneys of heartworm-infected dogs. Third European *Dirofilaria* Days. 21-22 Junio 2012. Parma (Italia). Poster.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E. *Dirofilariosis*: emerging disease. II Simposio Internacional Bayer. 13 septiembre 2012. Lisboa (Portugal). Ponencia.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS NACIONALES

Pou Barreto, M.C., Melero, R., Morchón García, R., Carretón Gómez, E., González Martín, C., Molina Moreno, R., Valladares Hernández, B. Mapa de riesgo de enfermedades emergentes y/o re-emergentes transmitidas por culícidos: primeros datos de la densidad, distribución y determinación de los culícidos potenciales vectores de enfermedades emergentes y re-emergentes en Tenerife y Gran Canaria. XXXVI Jornadas Médicas y de Salud de las Islas Atlánticas. 20-23 Octubre 2010. Gran Canaria (España). Comunicación oral.

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E. *Dirofilariose*: evolução de uma zoma hiperendémica. II Congresso Medicina Veterinária Vasco de Gama. 27-28 Noviembre 2010. Coimbra (Portugal). Ponencia.

Pérez, S., Carretón, E., de León, T. Seroprevalencia actual de *Dirofilaria immitis* en animales de compañía en la isla de Gran Canaria. I Congreso Nacional Científico de Alumnos de Veterinaria. 17-19 Febrero 2011. Murcia (España). Comunicación oral.

Pérez, S., Carretón, E., De León, T., Montoya-Alonso, J.A. Valores de proteinuria en perros con *Dirofilaria immitis*. I Congreso Nacional Científico de Alumnos de Veterinaria. 17-19 Febrero 2011. Murcia (España). Poster.

Morchón, R., Carretón, E., Grandi, G., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Kramer, L.H., Simón, F. *Wolbachia* contribuye a la glomerulonefritis que se produce en infecciones canina microfilarémicas por *Dirofilaria immitis*. XII Congreso Ibérico de Parasitología. 5-8 Julio 2011. Zaragoza (España). Comunicación oral.

González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado Hernandez, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F. Interacción de los productos excretores/secretorios de *Dirofilaria immitis* con el sistema fibrinolítico de su hospedador. XII Congreso Ibérico de Parasitología. 5-8 Julio 2011. Zaragoza (España). Comunicación oral.

Morchón, R., Siles-Lucas, M., González-Miguel, J., Carretón, E., Kramer, L.H., Monto-

ya-Alonso, J.A., Simón, F. Análisis de los antígenos excretores/secretores, epicutícula y somático de vermes adultos de *D. immitis* mediante LC-MS/MS. XII Congreso Ibérico de Parasitología. 5-8 Julio 2011. Zaragoza (España). Comunicación oral.

Orts Soriano, M., Montoya Alonso, J.A., Carretón Gómez, E., Melero Alcívar, R., Mas Coma, S., Bargues, M.D. Caracterización molecular de culícidos procedentes de un área endémica de dirofilariosis en la isla de Gran Canaria, España. XII Congreso Ibérico de Parasitología. 5-8 Julio 2011. Zaragoza (España). Poster.

Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. Dirofilariosis: diagnostico laboratorial. XVI Simposio Anual AVEDILA. 24-25 Noviembre 2011. Tenerife (España).

Orts-Soriano, M., Montoya, J.A., Carretón, E., Melero, R., Mas-Coma, S., Bargues, M.D. Identificación morfo-anatómica y caracterización molecular de culícidos procedentes de un área endémica de dirofilariosis en la isla de Gran Canaria, España. 9th meeting of the Valencian Network for Genomics & Proteomics. 4 Noviembre 2012. Valencia (España). Poster.

Carretón Gómez, E., Losada Ortiz, J., González Calvo, M., Juste de Santa Ana, M.C., Montoya Alonso, J.A. Valores de NT-proBNP en perros con dirofilariosis cardiopulmonar. II Congreso de Veterinarios de Canarias. 30 Noviembre-1 Diciembre 2012. Gran Canaria (España). Comunicación oral.

Montoya Alonso, J.A., Carretón Gómez, E., Armario Rodríguez, B., Morchón García, R., González Miguel, J., Simón Martín, F. Evaluación del test comercial Uranotest Dirofilaria® para el diagnostico de la dirofilariosis en gatos. II Congreso de Veterinarios de Canarias. 30 Noviembre-1 Diciembre 2012. Gran Canaria (España). Comunicación oral.

Méndez Aimone, J.C., Pérez Acosta, P., Carretón Gómez, E., Montoya Alonso, J.A. Prevalencia de *D. immitis* en podenco canario en la isla de La Palma (islas canarias - España). II Congreso de Veterinarios de Canarias. 30 Noviembre-1 Diciembre 2012. Gran Canaria (España). Comunicación oral.

Carretón Gómez, E., Méndez Aimone, J.C., Juste de Santa Ana, M.C., Montoya Alonso, J.A. Valores de proteína C-reactiva en perros con dirofilariosis cardiopulmonar. II Congreso de Veterinarios de Canarias. 30 Noviembre-1 Diciembre 2012. Gran Canaria (España). Comunicación oral.

Carretón Gómez, E., Morchón García, R., Simón Martín, F., Juste de Santa Ana, M.C.,

Montoya Alonso, J.A. Utilidad de los biomarcadores cardiopulmonares en la evaluación de la dirofilariosis canina. VetMadrid, XXX Congreso anual de la Asociación Madrileña de Veterinarios de Animales de Compañía. 7-9 de Marzo 2013. Madrid (España). Comunicación oral.

CAPÍTULOS DE LIBROS Y MONOGRAFÍAS

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

Méndez, J., Carretón, E., Montoya Alonso, J.A., 2012. Dirofilariosis cardiopulmonar felina. En: Montoya-Alonso JA, Carretón E (Eds.), Dirofilariosis. Pautas de manejo clínico, Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, España, pp. 131-158.

Carretón, E., 2012. Dirofilariosis en hurones y otros hospedadores. En: Montoya-Alonso JA, Carretón E (Eds.), Dirofilariosis. Pautas de manejo clínico, Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, España, pp. 159-168.

Carretón, E., Morchón, R. 2012. Dirofilariosis cutánea. En: Montoya-Alonso JA, Carretón E (Eds.), Dirofilariosis. Pautas de manejo clínico, Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, España, pp. 169-172.

Montoya-Alonso, J.A., Mendez, J.C., García-Guasch, L., Carreton-Gomez, E, 2013. Dirofilariosis felina: enfermedad pulmonar asociada. Canis et Felis 120, 78-88.

OTRAS PUBLICACIONES

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., 2013. Datos actuales de prevalencia de Dirofilaria immitis en perros en España y Portugal. Servicio de Medicina Veterinaria de la ULPGC. Las Palmas de Gran Canaria.

Impartición de cursos/Seminarios

Diagnóstico de la dirofilariosis cardiopulmonar en pequeños animales. Curso de especialista en cardiología de animales de compañía. Sede del Ilustre Colegio de Veterinarios de Las Palmas. 13 Enero 2012.

Premios

PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN ORAL. Pérez, S., Carretón, E., De León, T., Montoya-Alonso, J.A. Seroprevalencia actual de *Dirofilaria immitis* en animales de compañía en la isla de Gran Canaria. I Congreso Nacional Científico de Alumnos de Veterinaria. 17-19 Febrero 2011. Murcia (España).

PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN ORAL. Carretón Gómez, E., Losada Ortiz, J., González Calvo, M., Juste de Santa Ana, M.C., Montoya Alonso, J.A. Valores de NT-proBNP en perros con dirofilariosis cardiopulmonar. II Congreso de Veterinarios de Canarias. 30 Noviembre-1 Diciembre 2012. Gran Canaria (España).

Actividades de divulgación

La filaria en perros y gatos. Organizado por Asociación ARYCAN. 13 de Abril, 2011. Gran Canaria (España).

Dirofilariosis Canina. Jornada de Dirofilariosis canina: situación en Gran Canaria. Organizado por Servicio de Medicina Interna Veterinaria. 10 de Diciembre 2012. Gran Canaria (España).

“Puede que olviden lo que has dicho, pero siempre recordarán cómo les has hecho sentir”.
(Carl W. Buechner)

