

Biomarcadores serológicos en perros infectados con *Dirofilaria immitis*

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

Medicina Veterinaria e Investigación Terapéutica, Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Palabras clave: *Dirofilaria immitis*, biomarcadores serológicos, perros, troponinas, dímero-d, péptidos natriuréticos, proteínas de fase aguda, endotelina, cortisol.

Keywords: *Dirofilaria immitis*, *cardiopulmonary biomarkers*, *dogs*, *cardiac troponin*, *D-dimer*, *natriuretic peptides*, *acute phase proteins*, *endothelin*, *cortisol*.

Resumen

La función cardíaca en perros infectados con *Dirofilaria immitis* es evaluada habitualmente a través de pruebas como la radiografía, la ecocardiografía y la electrocardiografía. Sin embargo, los biomarcadores serológicos demuestran que pueden ser una herramienta muy útil en la mayoría de los casos aportando información adicional al veterinario clínico. Los biomarcadores más utilizados en pequeños animales son la Troponina cardíaca I (cTnI) y las dos formas del péptido natriurético tipo B (C-BNP y NT-proBNP; fragmento terminal C y fragmento terminal N, respectivamente). La tendencia observada en esta revisión bibliográfica es llegar a establecer unos valores de referencia estandarizados con el fin de aportar al veterinario clínico un diagnóstico, una evolución y un pronóstico más certero para esta enfermedad. El uso de biomarcadores podría ser una buena herramienta diagnóstica si se dispusiera de unos valores estandarizados y de un protocolo de uso en función de los diferentes estadios de la enfermedad.

Abstract

Cardiac function in dogs infected with Dirofilaria immitis is routinely evaluated through tests such as radiography, echocardiography, and electrocardiography. However, serological biomarkers prove to be a very useful tool in most cases, providing additional information to the clinical veterinarian. The most widely used biomarkers in small animals are cardiac Troponin I (cTnI) and the two forms of B-type natriuretic peptide (C-BNP and NT-proBNP; C-terminal fragment and N-terminal fragment, respectively). The trend observed in this bibliographic review is to establish standardized reference values to provide the clinical veterinarian with a more accurate diagnosis, evolution, and prognosis for this disease.

Introducción

La dirofilariosis causada por el nematodo *Dirofilaria immitis*, más comúnmente llamada “enfermedad del gusano del corazón”, es una infección caracterizada por la presencia de gusanos adultos en las arterias pulmonares de perros y gatos, principalmente, donde generan una proliferación de la túnica íntima. Los cambios vasculares sufridos se manifiestan en forma de inflamación vascular, daño endotelial, proliferación vellosa de la íntima y en la activación y atracción de leucocitos y plaquetas. Estos efectos contribuyen al desarrollo de hipertensión pulmonar, responsable de gran parte de la sintomatología en animales infectados.

Los biomarcadores cardiopulmonares son parámetros biológicos capaces de ser medidos y cuantificados de manera objetiva para evaluar procesos patológicos, o bien para evaluar la respuesta frente a un tratamiento. El uso de estos biomarcadores a través de la historia es relativamente reciente para la profesión veterinaria, sin embargo, es una práctica consolidada en medicina humana para la detección y el pronóstico de enfermedades cardiovasculares. El término biomarcador fue usado por primera vez en 1989, sin embargo, no fue hasta 2001 cuando se estableció una definición como tal. Los biomarcadores cardiopulmonares tienen una sensibilidad adecuada para el diagnóstico asertivo de enfermedades cardíacas en veterinaria y centenares de estudios han sido publicados evaluando la utilidad de los biomarcadores cardiopulmonares; en particular, estudios que evalúan la detección de enfermedades cardiopulmonares en estadios precoces, que confirman casos dudosos o que ayudan a establecer un pronóstico y a decidir un tratamiento adecuado (**Imagen 1**).

En dirofilariosis canina, existen varios estudios que han valorado la utilidad de varios biomarcadores cardiopulmonares. En este artículo se ha realizado una revisión bibliográfica de la situación actual y futura del estudio de los biomarcadores cardiopulmonares en esta patología.

Troponinas

Las Troponinas son proteínas estructurales que forman parte de músculo cardíaco y el músculo esquelético; son las responsables de regular la

interacción de la actina y la miosina en el control de la contracción muscular. Las troponinas están divididas en tres subunidades: la troponina C, perteneciente a la subunidad de unión al calcio; troponina I, responsable del componente inhibitorio, y la troponina T, que pertenece a la subunidad de unión a la tropomiosina.

Las troponinas son proteínas exclusivamente intracelulares, no se encuentran en el torrente sanguíneo de forma habitual, por lo tanto, cuando estas proteínas aparecen en el torrente sanguíneo, reflejan la liberación de estas por las células musculares debido a un daño. Las troponinas I y T tienen isoformas cardioespecíficas, de manera que permiten la detección de lesiones exclusivamente de los miocardiocitos. Por lo tanto, las concentraciones de estas troponinas circulantes nos informan sobre el daño cardíaco de forma específica, valorando la integridad miocárdica. Los niveles de troponina en sangre pueden detectarse desde las primeras 4 horas tras la lesión miocárdica, alcanzando su nivel máximo a las 12-24 horas. Posteriormente, comienzan a disminuir pudiendo detectarse en niveles más bajos el 5º día, hasta incluso, a los 20 días. En perros con dirofilariosis, los diversos estudios han demostrado que la troponina de elección es la troponina I (24 kDa), que posee un tamaño molecular inferior a la troponina T (37kDa). Esto, junto a una unión más débil al aparato contráctil, permite la detección de lesiones de menor calibre a nivel miocárdico, siendo así la troponina I un biomarcador más sensible. Numerosos estudios indican que los perros con infecciones crónicas por *D. immitis* presentan valores de troponina I significativamente elevados cuando se comparan con perros con infecciones recientes. Además, los valores de este marcador disminuyen de forma progresiva a lo largo del tratamiento en la mayoría de los perros estudiados. Por lo tanto, su uso en la actualidad puede ser útil a la hora de evaluar la cronicidad, la respuesta al tratamiento y el daño miocárdico generado por este parásito.

Péptidos natriuréticos

Los péptidos natriuréticos son hormonas que se sintetizan principalmente en los cardiomiocitos auriculares y ventriculares. Son liberados frente a la sobre-estimulación crónica del sistema



Imagen 1: Suero obtenido para realizar la medición de biomarcadores serológicos en el Laboratorio de Patología General, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

renina-angiotensina-aldosterona, que provoca hipertrofia cardíaca, sobrecarga del volumen y congestión, contrarrestando estos efectos mediante la estimulación de la natriuresis, perfusión renal, diuresis y vasodilatación, así como mejorando la función cardíaca diastólica. Los niveles circulantes del péptido natriurético auricular (ANP) y del péptido natriurético de tipo B (BNP) fundamentalmente se incrementan en respuesta a un aumento de la tensión de la pared del miocardio. El ANP procede principalmente de las aurículas, mientras que el BNP procede de los cardiomiocitos auriculares y ventriculares.

El péptido natriurético de mayor relevancia clínica actualmente es el BNP. El péptido natriurético tipo B es liberado como prohormona (pro-BNP) a la circulación en respuesta a una variedad de estímulos como sobrecarga de volumen, hipertrofia ventricular e hipoxia. Durante la liberación, la prohormona es dividida en dos fragmentos de forma enzimática, el fragmento biológicamente activo (BNP) encargado de la natriuresis y la vasodilatación, y el fragmento inactivo (NT-proBNP). Ambos fragmentos son metabolizados por rutas metabólicas distintas obteniendo, como resultado, vidas medias distintas. En perros, el BNP tiene una vida media de aproximadamente 90 segundos, mientras que

la vida media del NT-proBNP no se conoce aún, aunque en humana, la vida media de referencia del NT-proBNP es de 120 minutos.

La utilidad del NT-proBNP ha sido puntera para el estudio de las enfermedades cardíacas de pequeños animales. Se ha demostrado que los péptidos natriuréticos son útiles para confirmar el diagnóstico de una enfermedad cardíaca, para evaluar la respuesta al tratamiento y para determinar la severidad de la enfermedad. Además, ha sido demostrado que altas concentraciones de este biomarcador están correlacionados con una supervivencia baja, presentando un valor pronóstico. En la dirofilariosis canina, se ha observado que los perros que muestran niveles más elevados de NT-proBNP en sangre son aquellos que presentan una enfermedad más severa, generalmente relacionado con la cronicidad. La endarteritis que se produce en las arterias pulmonares, provocando una reducción de la elasticidad y una disminución de la luz, precede al desarrollo de hipertensión pulmonar y, como consecuencia, a una sobrecarga de volumen del ventrículo derecho que desemboca en un fallo cardíaco congestivo derecho. Además, la disminución del colágeno de la matriz extracelular que se produce en el miocardio de los perros infectados con dirofilariosis predispone igualmente a una dilatación del ventrículo derecho.

Algunos autores, correlacionan los niveles elevados de ANP en plasma en respuesta al aumento de la presión atrial y a la hipertensión pulmonar en perros con dirofilariosis. Sin embargo, aún es necesario realizar estudios complementarios sobre este biomarcador.

Dímero-D

El dímero-D es una molécula de pequeño tamaño (182 kDa) que procede de la degradación de la fibrina estabilizada. El dímero-D se produce al degradarse la fibrina de un coágulo que se disuelve en el organismo. El término dímero-D hace referencia al hecho de que el fragmento consta de dos fragmentos D de fibrina entrecruzados. El dímero-D aparece en 1 hora desde que se disuelve el coágulo y se mantiene elevado durante 7 días. 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. Por esto, el dímero-D constituye un marcador muy específico de la actividad fibrinolítica.

El dímero-D ha sido uno de los parámetros de la hemostasia que más interés ha despertado durante los últimos 20 años en medicina humana, y más recientemente, en medicina veterinaria. En perros infectados por *D. immitis*, la formación de tromboembolismos pulmonares (TEP) supone el principal motivo de muerte aguda del paciente durante la infección y, especialmente, durante el tratamiento adulticida. Por ello, se ha estudiado la utilidad del dímero-D para la detección de estos procesos en perros infectados. Diversos estudios han demostrado que perros con dirofilariosis presentan elevaciones de este biomarcador, especialmente en aquellos con altas cargas parasitarias y en un elevado porcentaje de perros durante el tratamiento adulticida (**Imagen 2**).

Sin embargo, y al igual que sucede en medicina humana, aunque podemos utilizar este biomarcador para la detección de TEP, el dímero-D constituye un marcador específico de la actividad fibrinolítica en procesos que producen una excesiva formación de fibrina, aun sin ser de naturaleza trombótica. En veterinaria, otras patologías como una sepsis, insuficiencia cardíaca congestiva, fallo hepático, fallo renal agudo,



Imagen 2: Paciente con dirofilariosis, carga parasitaria elevada según valoración ecocardiográfica, sufriendo un tromboembolismo pulmonar posterior a 2ª dosis de tratamiento adulticida. Medida de dímero-D: 0.8 mcg/mL (valor de referencia: <0.2 mcg/mL). Hospitalizado en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).

una neoplasia o incluso los coágulos formados durante una cirugía o un traumatismo pueden aumentar los valores de dímero-D. Por ello, la obtención de valores alterados de dímero-D debe ir acompañada de una sospecha clínica, como la presentación de síntomas compatibles u otras alteraciones en pruebas clínicas. Un rápido reconocimiento de la patología seguido de la instauración de un tratamiento adecuado (antitrombótico) ayuda a reducir la mortalidad en estos pacientes.

El dímero-D, puede elevarse por distintas causas como las descritas anteriormente. Sin embargo, se reconoce que tiene un excelente valor predictivo negativo, de manera que la obtención de un valor fisiológico de dímero-D en un animal con sospecha de TEP descarta la existencia de esta condición con alta probabilidad.

En dirofilariosis canina, algunos autores han demostrado que pacientes con alta carga parasitaria y/o con presencia de microfilarias presentan incrementos de dímero-D con mayor frecuencia, mostrando valores medios más elevados. También se ha observado una asociación de concentraciones de este biomarcador con la gravedad,

de manera que pacientes en estadios más avanzados muestran incrementos mayores. Además, se ha demostrado muy versátil para monitorizar la evolución del tratamiento adulticida y la necesidad de administrar tratamiento coadyuvante en perros con incrementos marcados de este biomarcador. Por otro lado, ha mostrado su utilidad a la hora de dar el alta a un paciente tratado, demostrando la necesidad de alargar el tiempo de monitorización y restricción de ejercicio tras finalizar el tratamiento adulticida en pacientes que aún presentaban elevaciones de dímero-D (**Imágenes 3 y 4**).

Proteínas de fase aguda

La respuesta de fase aguda puede originarse por trauma, infección o inflamación con el propósito de restaurar la homeostasis del organismo. Es considerada parte innata del sistema defensivo del hospedador, por lo que se caracteriza por una variedad de síntomas de carácter general como fiebre, leucocitosis, aumento en los niveles de cortisol, cambios en el metabolismo y una disminución de hierro y zinc.

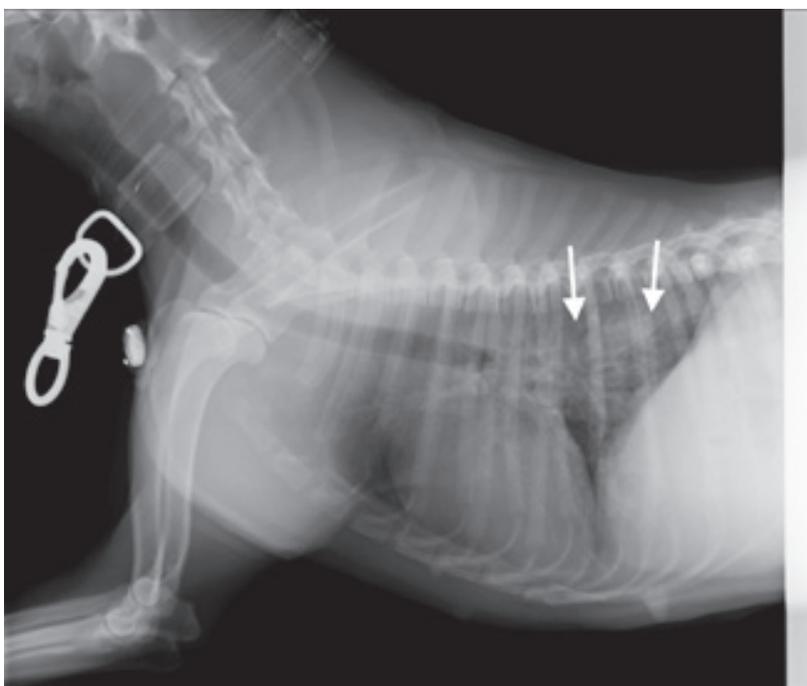


Imagen 3 y 4: Radiografías laterolateral y dorsoventral de un paciente con tromboembolismo pulmonar secundario a dirofilariosis en el Hospital Clínico Veterinario de la ULPGC. Se observa un patrón mixto alveolo-intersticial, con un aumento de opacidad de lóbulos pulmonares así como un marcado patrón vascular, con un aumento del calibre de las arterias pulmonares que además, presenta un recorrido tortuoso.

Durante esta respuesta, se produce una variación en la concentración de ciertas proteínas, denominadas proteínas de fase aguda (PFA), estas proteínas están clasificadas en dos grupos. Por un lado, las PFA negativas, son aquellas cuyos niveles disminuyen en respuesta al estímulo que la genera, por otro lado, las PFA positivas, son aquellas cuyos valores aumentan en respuesta al estímulo que las genera. La mayoría de las PFA positivas son sintetizadas mayormente por los hepatocitos tras la estimulación de citoquinas proinflamatorias. La proteína C reactiva (PCR) fue la primera PFA descrita en 1930 (Tillett WS., 1930). La fase aguda consiste en una respuesta muy rápida pero poco específica ya que puede producirse en base a diversas condiciones que generen una lesión tisular. Aparentemente, las PFA están involucradas en la regulación del sistema inmune, de la inflamación, protección frente a una infección y reparar el daño tisular. Dependiendo del tipo de lesión tisular, las PFA pueden tener efectos pro o anti-coagulantes.

Estudios publicados han mostrado la relación de la respuesta inmune inicial con la interacción con el parásito *D. immitis*, clasificándola como respuesta innata, y que consiste en la respuesta inmune frente a las formas adultas, microfilarias y *Wolbachia*. Hay estudios que han determinado las concentraciones de las PFA positivas y negativas en perros con dirofilariosis. Las PFA positivas evaluadas fueron la PCR, la haptoglobina y la ferritina, mientras que las PFA negativas evaluadas han sido la albúmina y la paraoxonasa-1 (PON-1). En perros con dirofilariosis se observaron mayores concentraciones de PCR, ferritina, y un descenso significativo de la albúmina y la PON-1 independientemente del estado microfilarémico del animal, mostrando una respuesta de fase aguda, probablemente debido a la existencia de daño tisular a nivel pulmonar y vascular asociado a la presencia de gusanos adultos. Por otro lado, se observaron bajas concentraciones de haptoglobina, especialmente en perros microfilarémicos, generando discrepancias entre el comportamiento de las PFA positivas. Sin embargo, esta discrepancia puede explicarse por la presencia de anemia hemolítica provocada por la infestación: la hemoglobina se libera de los eritrocitos uniéndose a la haptoglobina hasta la saturación de la proteína y es retirada de la circulación.



Imagen 5: Analizador para diagnóstico cardiovascular humano, validado para la determinación de dímero-D en perros (Cobas h232, Roche Diagnostics). El valor de referencia está establecido en <0.2 ug/ml. El paciente era un perro con dirofilariosis no diagnosticada, que mostraba síntomas compatibles con tromboembolismo pulmonar (disnea, tos y fiebre). El resultado obtenido, junto con la exploración, historial y anamnesis, demostró un elevado indicio de tromboembolismo parasitario, lo que justificó el inicio de terapia específica para su manejo.

Entre las PFA, la que mayor utilidad ha señalado tener es la PCR. Ésta ha mostrado grandes elevaciones desde las fases iniciales de la infección, debido a la acción de la *Wolbachia* en el organismo y al daño vascular generado por el gusano en las arterias pulmonares, y se han observado que sus concentraciones plasmáticas se correlacionaban con la gravedad. Algunos estudios van más allá y correlacionan los niveles de PCR con la severidad de la hipertensión pulmonar, demostrando el incremento significativo de PCR en animales con hipertensión severa o moderada, incluso una vez finalizado el tratamiento adulticida en aquellos perros en los que la hipertensión



Imagen 6: La medición de biomarcadores serológicos permite obtener un dato clínico de manera sencilla - tras la extracción de una muestra de sangre - y objetiva, al tratarse de un resultado numérico. Esto hace que su aportación a la clínica diaria presente un valor añadido, especialmente en aquellos centros que no tienen disponibilidad inmediata de otros medios diagnósticos (por ejemplo, ecocardiografía). En la imagen, un analizador de cortisol canino (VCHECK V200, Bionote).

pulmonar persistía. Concretamente, se ha visto que las concentraciones de PCR elevadas persisten 1 mes tras finalizar el tratamiento adulticida en los perros que presentan hipertensión pulmonar, mientras que los valores de esta PFA regresan a la normalidad en la mayoría de los pacientes sin hipertensión pulmonar.

Cuando se evaluaron algunas PFA 7 meses tras finalizar el tratamiento adulticida, los resultados mostraron que todavía persistían anoma-

lías en algunas PFA, como la ferritina y la PON-1. Por otro lado, los niveles de PCR estaban dentro de los valores normales; sin embargo, los perros con hipertensión pulmonar tenían valores significativamente más elevados. Todo esto podría ser indicativo de que aún existe daño a nivel vascular en los perros tratados, y concuerda con otros estudios que indican que el daño endotelial y la hipertensión pulmonar pueden persistir durante largo tiempo e incluso no ser reversibles, una vez eliminados los gusanos.



Imagen 7: Radiografía laterolateral de un perro mestizo de 6 años de edad, con dirofilariosis grado III. La radiografía muestra cardiomegalia y dilatación del tronco pulmonar, así como un patrón vascular caracterizado por presencia de arterias pulmonares dilatadas y tortuosas. En los lóbulos pulmonares caudales también se muestra un patrón intersticial. El estudio de biomarcadores ayudó a determinar la presencia de fenómenos tromboembólicos. El NT-proBNP arrojó un valor de 2500 pmol/L (valor de referencia para perros sanos: <900 pmol/L), siendo indicativo de mal pronóstico. El perro fue tratado de dirofilariosis y se instauró una terapia específica cardíaca, pero su tiempo de supervivencia posterior fue inferior a un año.



Imagen 8: Perro con dirofilariosis cardiopulmonar. Se presentó en consulta con los signos clínicos más frecuentes (tos, intolerancia al ejercicio y pérdida de peso progresiva). Se trataba de un perro de caza que hacía ejercicio intenso regularmente. Dado que la actividad física en perros infectados es un mal indicador pronóstico, se optó por hacer un estudio completo antes de iniciar tratamiento. El estudio de biomarcadores serológicos nos ayudó a clasificar la gravedad del animal, junto a las técnicas de diagnóstico por imagen.

Endotelina-1

La endotelina-1 (ET-1) es un péptido bioactivo producido por numerosas células, incluidas las células del endotelio vascular, las células del músculo liso, las células del epitelio respiratorio, macrófagos o fibrocitos, entre otras. La ET-1 es un potente vasoconstrictor que promueve la proliferación celular, causando cambios estructurales crónicos en el tejido cardiopulmonar. En medicina humana, la ET-1 induce una vasoconstricción aguda y un remodelado de los vasos crónico, lo que favorece el desarrollo de hipertensión pulmonar. En veterinaria, los perros con dirofilariosis e hipertensión pulmonar presentan incrementos significativos de la ET-1, por lo que este péptido podría jugar un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad, como un factor agravante inducido por la hipertensión pulmonar. La reacción inmunológica a la presencia del parásito con liberación de citoquinas, la hipoxia provocada por la patología o la tensión vascular producida por la presencia de los gusanos adultos son algunos de los factores que podrían inducir la liberación de ET-1.

Además, un estudio reciente ha demostrado que la ET-1 permanece elevada en perros con dirofilariosis e hipertensión pulmonar hasta 7 meses tras finalizar el tratamiento adulticida. Este biomarcador podría, por ello, ser un potente marcador de daño endotelial y podría tener un interesante valor pronóstico.

Cortisol

El cortisol es un esteroide producido en la corteza suprarrenal; se trata de una hormona clave involucrada en la respuesta al estrés y los niveles séricos a menudo se han utilizado como una medida del estrés. Se ha demostrado que el estrés prolongado, indicado por los niveles de cortisol, se asocia con una reducción de la supervivencia y la inmunidad. En dirofilariosis canina, resultados preliminares han demostrado elevaciones de cortisol en perros infectados, especialmente en perros con elevadas cargas parasitarias y en perros con síntomas. Más aún, se observó que los niveles iban regresando gradualmente a la normalidad una vez los perros fueron tratados. Por ello, resulta interesante realizar estudios para determinar la utilidad clínica y pronóstica de este marcador, especialmente en perros con infecciones crónicas.

Conclusiones

Los resultados publicados en diversos estudios analizados muestran resultados alentadores, que invitan a continuar profundizando en el estudio de biomarcadores serológicos en esta patología. Los estudios ya publicados demuestran que son herramientas útiles en el estudio inicial de la enfermedad, en el estadiaje clínico y durante la monitorización del tratamiento adulticida. Dado que son parámetros fáciles de obtener – una muestra de sangre – y de interpretar en base a un valor numérico, su uso puede ayudar a diagnosticar, establecer gravedad y pronóstico en perros con dirofilariosis.

Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes es la falta de estandarización de los niveles de referencia que permita al veterinario clínico interpretar los valores obtenidos, dado que estos valores pueden variar enormemente en función del aparato empleado para su medición. Además, la baja disponibilidad de algunas

pruebas y al alto coste de estas, desalienta a los clínicos a usar los biomarcadores en la clínica diaria. Por ello, es necesario que se lleven a cabo más estudios, así como animar a los veterinarios clínicos al uso de estos biomarcadores.

Bibliografía

- Atkinson KJ, Fine DM, Thombs LA, et al. Evaluation of pimobendan and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in the treatment of pulmonary hypertension secondary to degenerative mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 2009;23(6):1190-6.
- Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
- Boswood A. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. *J Vet Cardiol.* 2009;11(Suppl 1):S23-32.
- Carretón E, Cerón JJ, Martínez-Subiela S, et al. Acute phase proteins and markers of oxidative stress to assess the severity of the pulmonary hypertension in heartworm-infected dogs. *Parasit Vectors.* 2017;10(Suppl 2):477.
- Carretón E, Corbera JA, Juste MC, et al. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels. *Vet Parasitol.* 2011;176(4):313-6.
- Carretón E, Morchón R, González-Miguel J, et al. Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Vet Parasitol.* 2013;197(1-2):244-50.
- Carretón E, Morchón R, Montoya-Alonso JA. Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in heartworm disease. *Parasites & Vectors.* 2017; 10(Suppl 2):534
- Dewhurst E, Cue S, Crawford E, et al. A retrospective study of canine D-dimer concentrations measured using an immunometric "point-of-care" test. *J Small Anim Pract.* 2008;49(7):344-8.
- Falcón-Cordón Y, Tvarijonavičiute A, Montoya-Alonso JA, et al. Evaluation of acute phase proteins, adiponectin and endothelin-1 to determine vascular damage in dogs with heartworm disease (*Dirofilaria immitis*), before and after adulticide treatment. *Vet Parasitol.* 2022;309:109759.
- Kramer L, Grandi G, Passeri B, et al. 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.* 2011;176(4):357-60.
- Langhorn R, Willeßen JL. Cardiac troponins in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 2016;30(1):36-50.
- Meissner MH, Zierler BK, Bergelin RO, et al. Markers of plasma coagulation and fibrinolysis after acute deep venous thrombosis. *J Vasc Surg.* 2000;32(5):870-80.
- Méndez JC, Carretón E, Martínez S, et al. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol.* 2014;204(3-4):420-5.
- Méndez JC, Carretón E, Martínez-Subiela S, et al. Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment. *Vet Parasitol.* 2015;209(3-4):197-201.
- Missov ED, De Marco T. Clinical insights on the use of highly sensitive cardiac troponin assays. *Clin Chim Acta.* 1999;284(2):175-85.
- Takemura N, Koyama H, Sako T, et al. Plasma atrial natriuretic peptide (ANP) in dogs with mild heartworm infection. *J Vet Med Sci.* 1991;53(2):323-5.
- Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930;52(4):561-71.
- Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur J Heart Fail.* 2004;6(3):261-8.