

## Eficacia de la reducción de la dosis de doxiciclina sobre la respuesta inflamatoria en perros con dirofilariosis

**Autores:** Vera-Rodríguez. D<sup>1</sup>; Costa-Rodríguez N<sup>1</sup>; Falcón-Cordón. S<sup>1</sup>; Rodrigo Morchón<sup>2</sup>; Montoya-Alonso; JA<sup>1</sup>, Carretón E<sup>1</sup>.

1. Medicina Interna, Facultad de Veterinaria, Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (iUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España.

2. Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, España.

### Abstract

Las recomendaciones actuales de las sociedades internacionales de dirofilariosis canina recomiendan la administración de 10 mg/kg cada 12 horas durante 28-30 días para eliminar *Wolbachia pipientis*, bacteria endosimbionte asociada al parásito *Dirofilaria immitis*, que juega un importante papel pro-inflamatorio en la dirofilariosis canina. Sin embargo, existen indicios de que la mitad de la dosis podría ser suficiente a pesar de la ausencia de estudios que validen esta dosis, el cual fue el objetivo de este estudio. Para ello, se incluyeron 20 perros infectados por *D. immitis*. Estos animales fueron divididos en dos grupos: Grupo A (n=10) al que se les administró doxiciclina a 10 mg/kg/12 horas y el Grupo B (n=10) al que se les administró a 5 mg/kg/12 horas durante 28-30 días. Se obtuvieron muestras sanguíneas de todos ellos antes de iniciar el tratamiento (día 0) y al finalizar el tratamiento con doxiciclina (día 30) para determinación de los biomarcadores de inflamación Proteína C Reactiva (PCR) y cortisol basal. Los resultados obtenidos en día 0 mostraron valores patológicos de PCR en los perros, al igual que mostrado en estudios previos. Igualmente, los valores de cortisol en día 0 estaban anormalmente elevados. En día 30, los valores de PCR y cortisol descendieron significativamente en ambos grupos ( $p < 0,05$ ) sin existir diferencias significativas en los valores de estos biomarcadores entre ambos grupos, lo que podría indicar que ambas dosis de doxiciclina habrían sido igualmente eficaces en la eliminación de *Wolbachia*. Estos resultados podrían ser indicativos de que la administración de 5 mg/kg/12 horas de doxiciclina podría ser suficiente para controlar las poblaciones de *W. pipientis* en perros con dirofilariosis antes de iniciar el tratamiento adulticida; sin embargo, son resultados preliminares que invitan a realizar más estudios con un mayor número de animales.

### Introducción

La dirofilariosis cardiopulmonar es causada por el nematodo *Dirofilaria immitis*. Afecta principalmente a carnívoros domésticos y salvajes y es considerada una enfermedad endémica de las Islas Canarias (1). La gran mayoría de parásitos pertenecientes a la Superfamilia *Filariidae* presenta una relación simbiote con la bacteria *Wolbachia pipientis* (2). Esta bacteria se localiza en los cordones laterales de los gusanos adultos, así como en la microfilarias y en las etapas larvianas de *D. immitis*. En las hembras, además, se encuentran en el tracto reproductivo lo que facilita su transmisión a la descendencia. *W. pipientis* provoca una fuerte reacción inflamatoria asociada a la enfermedad, tanto en perros como en gatos (3). Previamente, autores han determinado técnicas para la determinación serológica de anticuerpos específicos (IgG) frente a *Wolbachia Surface Proteins* (WSP) que han permitido su detección en los animales infectados (4).

La doxiciclina se considera el tratamiento de elección para reducir la carga de este microorganismo, con el objetivo de disminuir la reacción inflamatoria durante el tratamiento adúlticida (5). Actualmente, la dosis recomendada establecidas por protocolos internaciones es de 10 mg/kg/12 horas durante 30 días, aunque existen estudios que han demostrado que la dosis a 5 mg/kg/12 horas podría ser igualmente eficaz (6).

La respuesta de fase aguda es una reacción inflamatoria que ocurre poco después de cualquier lesión tisular. Esta respuesta induce cambios en la concentración de proteínas plasmáticas llamadas proteínas de fase aguda (PFA), entre ellas se encuentra aquellas que se ven aumentadas durante el daño, como la proteína C reactiva (PCR), el factor amiloide o la haptoglobina, entre otras. Concretamente, la PCR y el cortisol son proteínas de fase aguda que aumentan durante la infección producida por *D. immitis* (7,8). Así, este estudio pretende comprobar la efectividad de la doxiciclina a diferentes concentraciones a través de la medición de los niveles séricos de PCR y cortisol en perros infectados por *D. immitis* al inicio y fin del tratamiento con el antibiótico.

## Material y Método

Se incluyeron 20 perros infectados por *D. immitis* que acudieron al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria entre septiembre de 2020 y septiembre de 2021. Se obtuvo un registro completo de cada animal incluyendo identificación, nombre, edad, sexo, raza, hábitat, código postal, sintomatología que presentan al inicio del tratamiento, evaluación ecocardiográfica y una analítica general. Los criterios para participar en este estudio fueron ser animales positivos a la prueba de antígenos frente a *D. immitis* y que no hubieran iniciado ningún tratamiento específico frente al parásito.

El diagnóstico se llevó a cabo utilizando un kit de prueba inmunocromatográfica comercial de detección de antígenos (Uranotest Dirofilaria, Urano Vet SL, Barcelona). Los perros incluidos en el estudio fueron divididos en dos grupos aleatoriamente. Por un lado, el Grupo A (n=10) al que se les administró doxiciclina a 10 mg/kg/12 horas y el Grupo B (n=10) al que se les administro a 5 mg/kg/12 horas. Además, todos los perros recibieron una dosis oral de lactonas macrocíclicas en el día inicial del tratamiento (ivermectina a 6 mg/kg). Todos los pacientes toleraron el tratamiento sin reacciones adversas ni efectos secundarios.

Para la determinación de la PCR y el cortisol basal se obtuvieron muestras sanguíneas de todos los animales mediante venopunción de la vena cefálica y posterior obtención de suero. El análisis de la muestra se realizó mediante inmunocromatografía VCHECK (Bionote, Minnesota, USA). El valor de referencia para perros sanos fue proporcionado por el fabricante, siendo PCR <10 mg/L y cortisol <1.00 µg/dL. La determinación de ambos parámetros se llevó a cabo al inicio del tratamiento (día 0, diagnóstico) y al finalizar el tratamiento con doxiciclina (día 30).

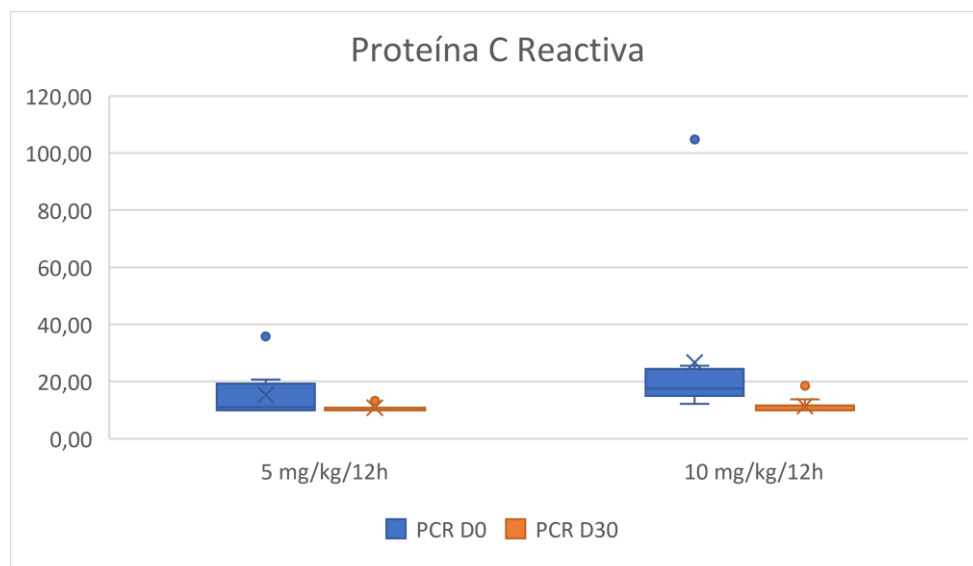
Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS Base 19.0 para Windows. Se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de los datos. Las variables continuas se expresaron como mediana ± desviación estándar. Las variables cualitativas se expresaron como porcentaje. Se utilizó la prueba de Chi cuadrado

o la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables categóricas. En todos los casos, se determinó un valor de  $p < 0.05$  como significativo. Todos los propietarios dieron su consentimiento para participar en este estudio.

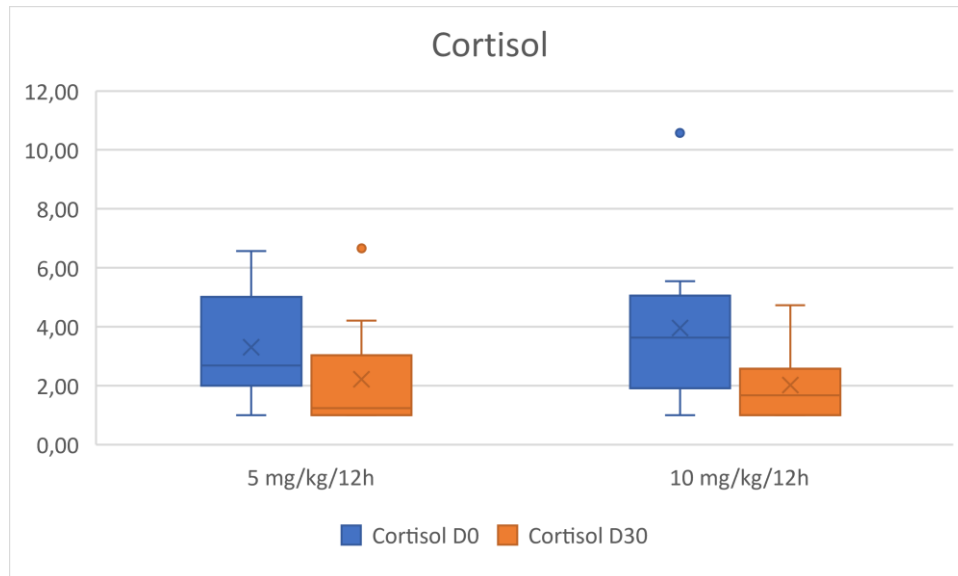
## Resultados

Los valores de PCR obtenidos en día 0 fueron significativamente más elevados que los valores de referencia para perros sanos ( $21,00 \pm 20,76$  mg/L), siendo en el Grupo A de  $26,66 \pm 27,75$  mg/L donde el 100% (10/10) presentó valores patológicos. Por otro lado, los perros del Grupo B presentaron valores de PCR de  $15,34 \pm 8,25$  mg/L, siendo patológicos en el 50% de los casos (5/10). Los valores de cortisol en día 0 también se mostraron anormalmente elevados ( $3,63 \pm 2,31$   $\mu\text{g/dL}$ ). Los perros del Grupo A mostraron valores de  $3,96 \pm 1,22$   $\mu\text{g/dL}$ , siendo patológicos en el 90% (9/10) de los animales; asimismo, el Grupo B obtuvo valores de cortisol de  $3,30 \pm 1,83$   $\mu\text{g/dL}$ , siendo patológicamente elevados en el 80% de los individuos (8/10). Para los dos biomarcadores, existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de perros ( $p < 0,05$ ).

En el día 30, los valores de PCR disminuyeron significativamente ( $11,10 \pm 2,31$  mg/L) ( $p < 0.05$ ), si bien el 30% de los individuos continuaban mostrando valores elevados. Los niveles de PCR para el Grupo A fueron de  $11,35 \pm 2,78$  mg/L y para el Grupo B de  $10,85 \pm 1,71$  mg/L, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre grupos. En el caso del cortisol, también existió un descenso significativo de los valores en el día 30 ( $2,12 \pm 1,55$   $\mu\text{g/dL}$ ) ( $p < 0,05$ ), si bien el 60% de los animales aún continuaba presentando valores elevados. Los niveles de cortisol para el Grupo A fueron de  $2,02 \pm 1,22$   $\mu\text{g/dL}$ , y  $2,22 \pm 1,88$   $\mu\text{g/dL}$  para el Grupo B, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.



**Figura 1:** Diagrama de caja mostrando valores de Proteína C reactiva (mg/dl) en el día 0 de tratamiento (azul) y día 30 de tratamiento (naranja) para grupo A (doxiciclina a 10 mg/kg/12h) y grupo B (doxiciclina a 5 mg/kg/12h). Los puntos representan los valores atípicos.



**Figura 2:** Diagrama de caja mostrando valores de cortisol ( $\mu\text{g/dL}$ ) en el día 0 de tratamiento (azul) y día 30 de tratamiento (naranja) para grupo A (doxiciclina a 10 mg/kg/12h) y grupo B (doxiciclina a 5 mg/kg/12h). Los puntos representan los valores atípicos.

## Discusión y conclusión

Los valores elevados de PCR en los perros con dirofilariosis son similares a los obtenidos previamente y confirman el fuerte componente inflamatorio asociado a la dirofilariosis (5,9), principalmente provocado por *W. pipientis*. Esta bacteria endosimbionte produce una fuerte respuesta inflamatoria a nivel cardiorrespiratorio y también en otros órganos, como el riñón, debido a la *Wolbachia Surface Protein* (WSP) y otros componentes antigénicos que son liberados especialmente tras la muerte de los parásitos adultos, ya sea de manera natural o secundario al tratamiento adulticida (10,11). Además, se muestran valores patológicos de cortisol en perros con dirofilariosis. El cortisol es una hormona clave involucrada en la respuesta al estrés y los niveles séricos a menudo se han utilizado como medida del estrés. Estos resultados son similares a otros estudios que evaluaron el efecto de varios parásitos en animales y humanos (12,13); mientras que otros estudios mostraron resultados discrepantes, estos podrían deberse a la poca virulencia de los parásitos estudiados (14).

Por otro lado, la disminución de las concentraciones séricas de PCR a día 30, una vez finalizado el tratamiento con doxiciclina, fueron similares a lo publicado en estudios anteriores (6,7). Al igual que señalaron estos autores, el antibiótico produce una disminución sobre las concentraciones de *W. pipientis* y, por tanto, desaparece una importante parte del componente inflamatorio característico de la dirofilariosis canina. En el presente estudio, además, no se observaron diferencias significativas entre los valores de PCR en los dos grupos de perros tratados, por lo que podría concluirse que ambas dosis de doxiciclina son igualmente eficaces en la reducción de la población de bacterias endosimbiontes.

Además, los resultados de este estudio muestran, por primera vez, valores de cortisol tras 30 de tratamiento frente a la infección producida por *D. immitis*, no existiendo datos previos sobre este parámetro. Los resultados muestran que el cortisol disminuye considerablemente en ambos grupos estudiados, pudiendo ser debido a la desaparición significativa de *W. pipientis* y, por tanto, del alto componente inflamatorio asociado a la presencia de esta bacteria. Al no existir diferencias significativas entre los valores de cortisol en ambos grupos de perros, podría concluirse que ambas dosis de doxiciclina han sido igualmente eficaces.

Tras la finalización del tratamiento con doxiciclina, las concentraciones de ambos biomarcadores continuaron elevados en un porcentaje de animales. Esta persistencia de valores elevados de PCR ya se ha visto en estudio previos en perros con dirofilariosis (7,15). En el caso del cortisol, a pesar de eliminar el efecto producido por *W. pipientis*, existe una persistencia del daño vascular producido por los parásitos adultos de *D. immitis* (16–18); esto coincide con otros estudios que señalan que el estrés producido por la parasitación genera incrementos en los niveles de cortisol, por lo que es posible que estos incrementos persistan, asimismo, en perros con dirofilariosis (13,19). Otros estudios han mostrado que los valores de PCR descienden gradualmente según se van eliminando los parásitos adultos (7) por lo tanto, sería necesario evaluar paralelamente cómo evolucionan las concentraciones de cortisol una vez eliminados los parásitos adultos, y valorar asimismo la evolución de estos biomarcadores en perros que han recibido distintas dosis de doxiciclina.

Las dosis recomendadas de tetraciclinas para el tratamiento de *W. pipientis* en un inicio fueron propuestas por otros autores en 20 mg/kg durante 30 días, debido a que eliminaba la población bacteriana dentro del parásito (20). Posteriormente, otros estudios propusieron dosis inferiores de 10 mg/kg/12h durante 4 semanas con óptimos resultados (21). Sin embargo, se considera necesario continuar con la realización de estudios para optimizar las dosis y duración adecuadas de este tratamiento debido a varios factores como la aparición efectos secundarios al tratamiento con tetraciclinas (22) baja tolerancia y prevenir la aparición de cepas resistentes (23,24).

Como conclusión, los biomarcadores de inflamación estudiados (PCR y cortisol) disminuyen al finalizar el tratamiento en ambos grupos sin encontrar diferencias significativas entre las diferentes dosis de doxiciclina, lo que podría ser indicativo de que ambas dosis de antibiótico podrían tener una eficacia similar en la reducción de la población de *W. pipientis*. Sin embargo, se trata de resultados preliminares ya que se evalúa un bajo número de perros. Para confirmar estos resultados, es necesario realizar estudios posteriores para determinar la dosis y duración óptimas del tratamiento con doxiciclina.

## Bibliografía

1. Alberto Montoya-Alonso J, Morchón R, Nieves García-Rodríguez S, Falcón-Cordón Y, Costa-Rodríguez N, Isidoro Matos J, et al. Expansion of Canine Heartworm in Spain. 2022; Available from: <https://doi.org/10.3390/ani12101268>
2. Bandi C, Trees AJ, Brattig NW. Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases PII: S 0 3 0 4-4 0 1 7 ( 0 1 ) 0 0 4 3 2-0. *Vet Parasitol.* 2001;98:215–38.
3. Kramer L, Simón F, Tamarozzi F, Genchi M, Bazzocchi C. Is Wolbachia complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? 2005 [cited 2024 May 10]; Available from: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)
4. Simón F, Kramer LH, Román A, Blasini W, Morchón R, Marcos-Atxutegi C, et al. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* Infection. *Vet Res Commun.* 2007;31:161–71.
5. Noll Louzada-Flores V, Kramer L, Brianti E, Napoli E, Alfonso Mendoza-Roldan J, Antonio Bezerra-Santos M, et al. Treatment with doxycycline is associated with complete clearance of circulating Wolbachia DNA in *Dirofilaria immitis*-naturally infected dogs. *Acta Trop [Internet].* 2022 [cited 2024 May 10];232:106513. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106513>
6. Carretón E, Morchón R, Falcón-Cordón Y, Falcón-Cordón S, Matos JJ, Montoya-Alonso JA. Evaluation of different dosages of doxycycline during the adulticide treatment of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs ☆. 2020 [cited 2024 May 10]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109141>
7. Carretón E, Cerón JJ, Martínez-Subiela S, Tvarijonaviciute A, Caro-Vadillo A, Montoya-Alonso JA. Acute phase proteins and markers of oxidative stress to assess the severity of the pulmonary hypertension in heartworm-infected dogs. *Parasit Vectors.* 2017;
8. Ceró JJ, David Eckersall P, Martínez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol [Internet].* 2005 [cited 2024 May 10];34(2). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x>
9. Méndez JC, Carretón E, Martínez S, Tvarijonaviciute A, Cerón JJ, Montoya-Alonso JA. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol [Internet].* 2014 [cited 2024 May 10];204:420–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.016>
10. Simón F, Prieto G, Morchón R, Bazzocchi C, Bandi C, Genchi C. Immunoglobulin G Antibodies against the Endosymbionts of Filarial Nematodes (*Wolbachia*) in Patients with Pulmonary *Dirofilaria* Infection. *Clin Diagn Lab Immunol [Internet].* 2003 [cited 2024 May 10];10(1):180–1. Available from: <https://journals.asm.org/journal/cvi>
11. Kramer L, Simón F, Tamarozzi F, Genchi M, Bazzocchi C. Is Wolbachia complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? *Vet Parasitol [Internet].* 2005 [cited 2024 May 10];133(2–3):133–5. Available from: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)
12. Fleming MW. Cortisol as an indicator of severity of parasitic infections of *Haemonchus contortus* in lambs (*Ovis aries*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol [Internet].* 1997 [cited 2024 May 15];116(1):41–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9080661/>

13. Barros-Gonçalves T de D, Saavedra AF, Silva-Couto L da, Ribeiro-Romão RP, Bezerra-Paiva M, Gomes-Silva A, et al. Increased levels of cortisol are associated with the severity of experimental visceral leishmaniasis in a *Leishmania* (L.) infantum-hamster model. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2024 May 15];15(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34813597/>
14. Monello RJ, Millsbaugh JJ, Woods RJ, Gompper ME. The influence of parasites on faecal glucocorticoid metabolite levels in raccoons: an experimental assessment in a natural setting. *J Zool* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2024 May 15];282(2):100–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-7998.2010.00717.x>
15. Méndez JC, Carretón E, Martínez-Subiela S, Tvarijonaviciute A, Cerón JJ, Montoya-Alonso JA. Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment. *Vet Parasitol* [Internet]. 2015 Apr 30 [cited 2024 May 15];209(3–4):197–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25801227/>
16. Schaub RG, Rawlings CA, Keith JC. Platelet adhesion and myointimal proliferation in canine pulmonary arteries. *American Journal of Pathology*. 1981;104(1):13–22.
17. Keith JC, Schaub RG, Rawlings C. Early arterial injury-induced myointimal proliferation in canine pulmonary arteries. *Am J Vet Res*. 1983 Feb;44(2):181–6.
18. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, et al. Human and animal dirofilariasis: The emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2012 Jul [cited 2024 May 10];25(3):507–44. Available from: <https://journals.asm.org/journal/cmvr>
19. O’Dwyer K, Dargent F, Forbes MR, Koprivnikar J. Parasite infection leads to widespread glucocorticoid hormone increases in vertebrate hosts: A meta-analysis. *J Anim Ecol* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2024 May 15];89(2):519–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31622499/>
20. Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *Int J Parasitol*. 1999 Feb 1;29(2):357–64.
21. Kramer L, Grandi G, Passeri B, Gianelli P, Genchi M, Dzimianski MT, 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 Mar 22;176(4):357–60.
22. Moorhead AR, Evans CC, Sakamoto K, Dzimianski MT, Mansour A, DiCosty U, et al. Effects of doxycycline dose rate and pre-adulticide wait period on heartworm-associated pathology and adult worm mass. *Parasit Vectors* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 May 10];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37491306/>
23. Herrera-Rodríguez D, González-Martín M, Mt TJ. *Staphylococcus aureus* in Veterinary Students of Different Levels: Prevalence, Risk Factors and Antimicrobial Resistance. Vol. 5, *Journal of Veterinary Medicine and Research*. 2018.
24. Tejedor-Junco MT, González-Martín M, Bermeo-Garrido E, Villasana-Loaiza R, Carretón-Gómez E. Doxycycline treatment for *Dirofilaria immitis* in dogs: impact on *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* antimicrobial resistance. *Vet*

Res Commun [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 May 15];42(3):227–32.  
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29938353/>