

Dirofilariosis cardiopulmonar, investigación *in vitro*

# Posible interrelación entre los mecanismos de supervivencia del parásito y la patología vascular

Los resultados de esta investigación pueden dar lugar a algún tipo de herramienta en el futuro que permita mejorar la calidad de vida de los animales enfermos.

J. González-Miguel<sup>1</sup>, R. Morchón<sup>1</sup>, E. Carretón<sup>2</sup>, J.A. Montoya<sup>2</sup>, F. Simón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia e Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBSAL), Universidad de Salamanca

<sup>2</sup>Medicina Interna, Facultad de Veterinaria, Universidad de las Palmas de Gran Canaria  
Imágenes cedidas por los autores

*Dirofilaria immitis* es el nematodo filarioideo causante de la dirofilariosis cardiopulmonar canina y felina, parasitosis de transmisión vectorial con distribución cosmopolita. *D. immitis* es, además, responsable de la dirofilariosis pulmonar humana, entidad clínica caracterizada por la formación de nódulos pulmonares benignos que pueden confundirse con carcinomas en radiología (Simón *et al.*, 2012).

El perro actúa como hospedador definitivo y reservorio del parásito. En él los vermes adultos pueden sobrevivir durante siete años o más en las arterias pulmonares y ventrículo derecho del corazón causando una patología vascular inflamatoria crónica (Venco *et al.*, 2011).

## Problemas cardiacos graves

Uno de los hechos clave de esta patología es la aparición de endarteritis proliferativa que tiene como consecuencia la formación de microvellosidades intravasculares. Se ha descrito que este proceso va acompañado del aumento y migración de las células de la pared arterial hacia el interior de los vasos (Adcock, 1961; Atwell *et al.*, 1986; Hidaka *et al.*, 2004; Kawabata *et al.*, 2008), así como de la destrucción de la matriz extracelular (Wang *et al.*, 2005). Dichas alteraciones provocan desorganización del endotelio y reducción del lumen vascular en las arterias pulmonares, con la aparición subsiguiente de hipertensión y edema.

Además del desarrollo crónico de la enfermedad cardiovascular pueden producirse procesos agudos que suponen un riesgo inmediato para la vida de los animales que los padecen.

Como consecuencia de los daños descritos en las últimas fases de la enfermedad la función cardíaca puede verse afectada, apareciendo insuficiencia, hipertrofia y fallo cardíaco congestivo. Además de este desarrollo crónico, pueden producirse procesos agudos que suponen un riesgo inmediato para la vida de los animales que los padecen. Aparecen cuando ocurre la muerte súbita y simultánea de muchos vermes adultos, de manera natural o como consecuencia de un tratamiento filaricida. La liberación masiva de productos antigénicos de los parásitos y de sus bacterias simbiotas *Wolbachia* al torrente circulatorio es responsable de la exacerbación de las reacciones inflamatorias en el endotelio vascular y de la formación de tromboembolismos de diferente entidad (Venco, 2007). No obstante, *D. immitis* posee mecanismos que le permiten una cierta regulación de estos procesos patológicos, lo que contribuye a su supervivencia durante años en el hábitat intravascular.

## *Dirofilaria immitis* y el sistema fibrinolítico del hospedador

Con el fin de mantenerse y propagarse en los vasos sanguíneos, muchos patógenos no solo requieren adaptaciones para

Proteínas fijadoras de plasminógeno identificadas mediante espectrometría de masas en los compartimentos antigénicos excretor/secretor y de superficie de *D. immitis*. Se adjunta el nombre, el número de isoformas identificadas y el código de acceso a más información para cada proteína en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Antígenos excretores/secretores de <i>D. immitis</i>			Antígenos de superficie de <i>D. immitis</i>		
Código de acceso a NCBI	Proteína	Nº de isoformas identificadas	Código de acceso a NCBI	Proteína	Nº de isoformas identificadas
ACY25666	Chaperonina HSP60	3	EFV54220	Actina-5C	1
ACT1 CAEEL	Actina-1/3	1	P02578	Actina-1	1
XP 001894819	Actina	1	XP 001896281	Enolasa	2
NP 508842	Actina-4	1	AAB52600	Fructosa-bisfosfato aldolasa	2
AAC24752	Precursor de transglutaminasa	1	P48812	GAPDH	4
XP 001899850	GAPDH	2	XP 001900868	Proteína con dominio MSP	1
AAD00843	Ov87	2	P13263	MSP 2	1
XP 003150284	LOAG_14743	1	AAA20541	Lectina de unión a β-galactosidasas	1
AAF37720	Galectina	1	XP 001900812	Galectina	1
AAD11968	P222U	4	XP 003139445	Proteína con dominio inmunoglobulina	1
			AAC47233	Ciclofilina Ovcyp-2	1



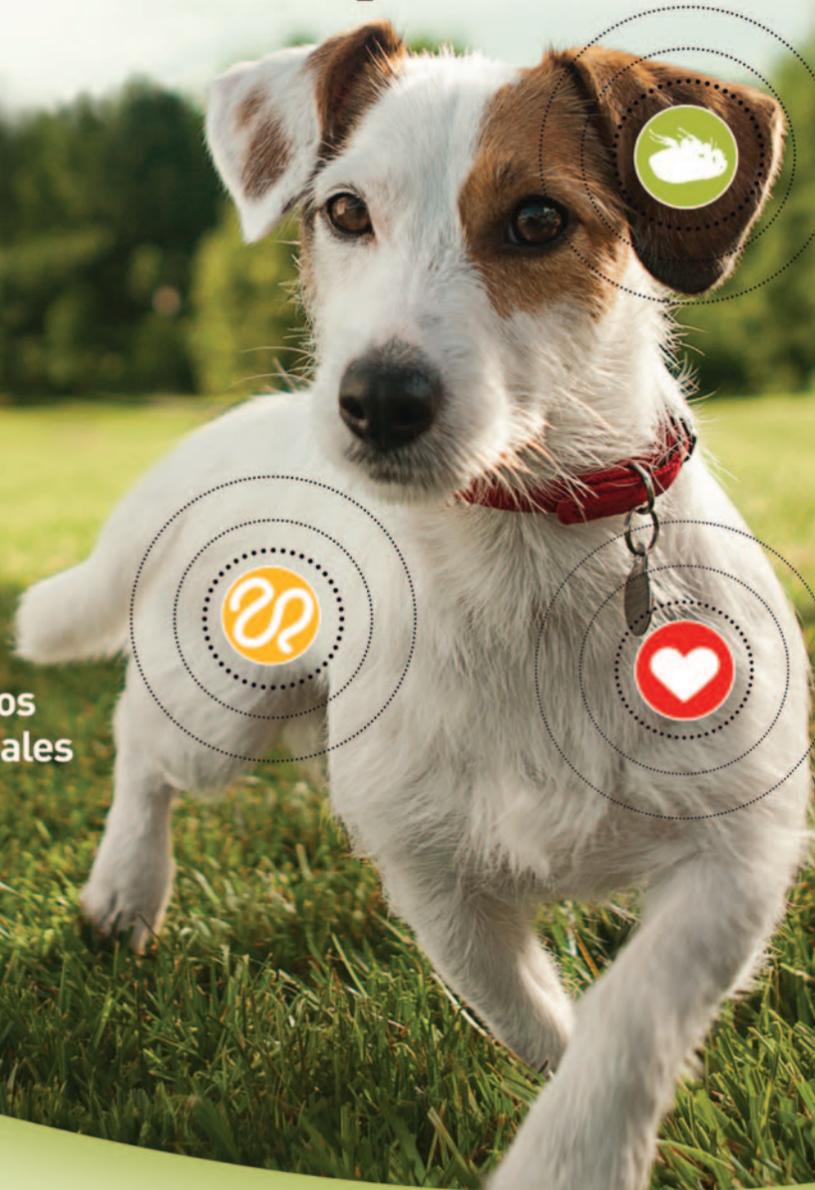
## En portada Endoparásitos

Las últimas investigaciones sobre dirofilariosis pulmonar canina abren nuestra sección "En portada" este mes, en el que también contamos con un trabajo sobre otra filaria algo menos conocida: *Cercopitiphilaria* spp.

Con respecto a la leishmaniosis, veremos las características de su distribución en Europa, según un estudio realizado recientemente. Y, para terminar, conoceremos el caso de Bayron, un perro infestado por *Thelazia* spp.

# Ahora

## 3 tipos de parásitos controlados con 1 comprimido



Pulgas

Parásitos  
intestinales

Gusano del  
corazón



**Espinosad** consiguió un control mensual de pulgas más rápido. Ahora **Trifexis®**, que combina **espinosad y milbemicina oxima**, protege frente a **parásitos internos y externos** en un **comprimido**.



Empieza a eliminar pulgas en **30 minutos**<sup>1,2</sup> y dura un mes<sup>3,4,5</sup>



Trata frente a **3 parásitos intestinales** comunes



Previene la enfermedad del **gusano del corazón**

**Trifexis**  
(espinosad+milbemicina oxima)  
comprimidos masticables para perros

**Prescripción veterinaria.** Trifexis mantiene el control antiparasitario en su clínica

**Composición:** Comprimidos de 270/4,5, 425/7,1, 665/11,1, 1040/17,4 y 1620/27 mg de espinosad/milbemicina oxima. **Indicaciones y especies de destino:** Para el tratamiento y la prevención de las infestaciones por pulgas (*Ctenocephalides felis*) en perros cuando esté indicada la prevención concurrente de la dirofilariosis (L3, L4 *Dirofilaria immitis*) y/o el tratamiento de infecciones por nematodos gastrointestinales causadas por ancilostomas (L4, adulto inmaduro [L5] y adulto de *Ancylostoma caninum*), ascáridos (adulto inmaduro L5, y adulto de *Toxocara canis* y adulto de *Toxascaris leonina*) y tricúridos (adulto de *Trichuris vulpis*). **Contraindicaciones:** No usar en perros de menos de 14 semanas. No usar en caso de hipersensibilidad conocida a la sustancia activa o a algún excipiente. **Reacciones adversas:** El efecto adverso más frecuente es el vómito en las primeras 48 horas después de administrar la dosis. Otras reacciones frecuentes incluyeron letargia, anorexia/disminución del apetito, diarrea, prurito, dermatitis y enrojecimiento de la piel y del pabellón auricular. Infrecuentemente se observaron hipersalivación, temblores musculares, ataxia y crisis epilépticas. En muy raras ocasiones, se observaron ceguera, alteraciones de la visión y otros trastornos oculares. **Dosis y vía de administración:** 45 – 70 mg de espinosad y 0,75 – 1,18 mg de milbemicina oxima por kg de peso por vía oral una vez por mes. No debe administrarse durante más de 6 meses consecutivos. Administrarse junto con alimento o inmediatamente después de éste. Si el vómito se produce durante la hora siguiente a su administración y el comprimido es visible, debe administrarse una nueva dosis completa para garantizar la máxima eficacia del producto. **Precauciones:** Debe usarse con precaución en perros con antecedentes de epilepsia. No se ha establecido de manera suficiente la seguridad de este medicamento en perras gestantes y lactantes. No se ha determinado la seguridad del medicamento en perros macho reproductores. No es posible la administración de dosis exactas en perros que pesen menos de 3,9 kg. **Nº Registro:** EU/2/13/155/001-15. **Prescripción veterinaria.**

©2014 Elanco, una división de Eli Lilly and Company Limited. Trifexis es una marca registrada de Eli Lilly and Company Limited. ESCACTFX00003

1. Blagburn BL et al (2010) Veterinary Parasitology 168:312-317; 2. Ficha técnica del producto – Trifexis; 3. Dryden MW et al (2013) Veterinary Parasitology 191: 340-346; 4. Schnitzler B et al (2011) Elanco study T3ADE100013. Eli Lilly and Company Ltd; 5. Wolken S et al (2012) Veterinary Record 170:99.

## El posible papel de la plasmina en la formación de microvellosidades en la dirofilariosis cardiopulmonar

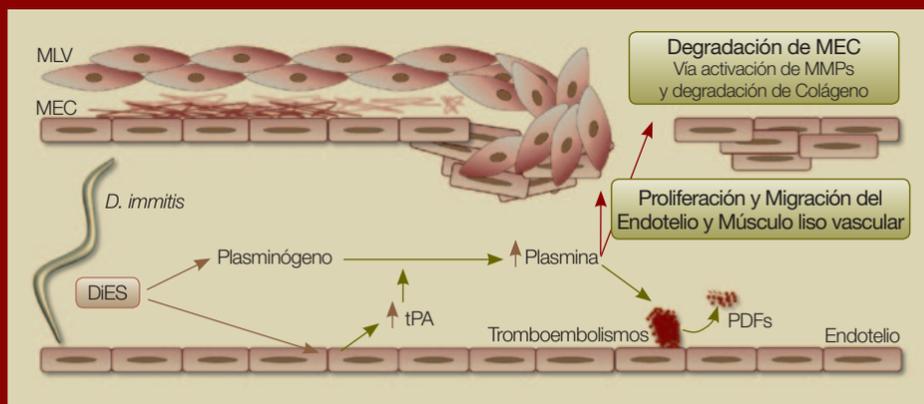
La activación del sistema fibrinolítico mediante la participación de los extractos antigénicos de *D. immitis* como receptores de plasminógeno y el consecuente mantenimiento de la hemostasia, a priori beneficiosa tanto para el parásito como para el hospedador, podría tener consecuencias patológicas. Una sobreproducción de la vía plasminógeno/plasmina ha sido relacionada con la invasión celular y con la migración intraorgánica de diferentes patógenos (Jong et al., 2003; Bernal et al., 2004). Además, en investigación cardiovascular llevada a cabo en humanos, también se ha vinculado la sobreproducción de plasmina con la proliferación y migración de células vasculares y con la degradación de matrices extracelulares (Nicholl et al., 2005; Yang et al., 2005; Roth et al., 2006; Hayashi et al., 2009). Estos mecanismos son similares a los observados en la formación de microvellosidades en la dirofilariosis cardiopulmonar, pero sus aspectos moleculares no han sido, hasta el momento, convenientemente estudiados en esta parasitosis.

Nuestro grupo ha comenzado recientemente el estudio de estos mecanismos patológicos con el objetivo de demostrar que la sobreproducción de plasmina por parte de los antígenos excretos/secretos de *D. immitis* (DiES) podría relacionarse con los mecanismos patogénicos descritos en la formación de microvellosidades a nivel vascular en la dirofilariosis cardiopulmonar. Para ello se ha estudiado:

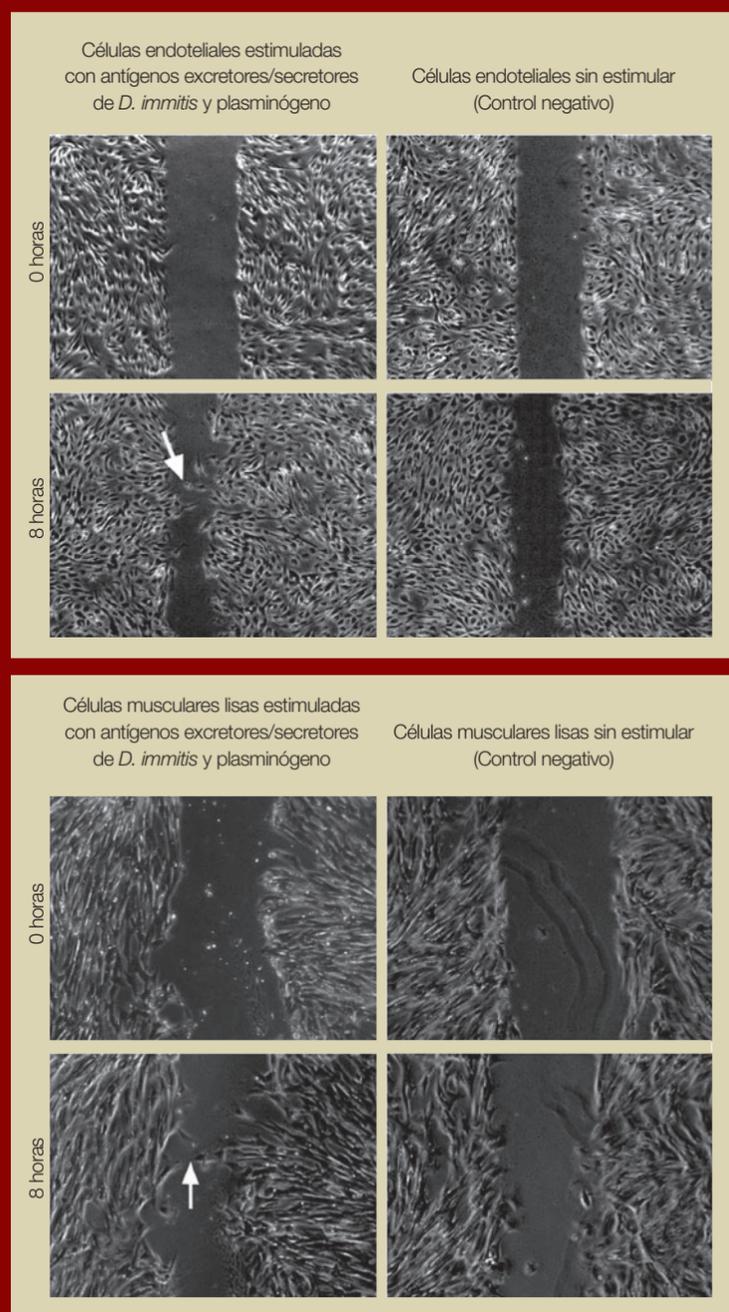
- 1) La proliferación celular mediante la técnica del cristal violeta.
- 2) La migración celular mediante la técnica de Wound-Healing.
- 3) La destrucción de la matriz extracelular midiendo degradación de colágeno y expresión de metaloproteasas de matriz.

Todo ello se llevó a cabo en cultivos de células endoteliales vasculares y de músculo liso perivascular de perro estimulados con DiES y plasminógeno. Como controles se utilizaron células sin tratar, células estimuladas solamente con DiES o con plasminógeno, y células tratadas con DiES, plasminógeno y el ácido  $\epsilon$ -amino caproico ( $\epsilon$ -ACA), molécula que actúa inhibiendo la unión de plasminógeno y por tanto la generación de plasmina (figura 2).

Los resultados preliminares obtenidos indican diferencias significativas y por tanto ponen de manifiesto la participación de DiES en la proliferación, migración y destrucción de la matriz extracelular de cultivos de células caninas endoteliales y del músculo liso vascular mediante la activación del sistema plasminógeno/plasmina (figura 1).



**Figura 1.** Representación gráfica de la posible activación del sistema fibrinolítico del hospedador por parte de los antígenos excretos/secretos de *D. immitis* y la consecuente participación de la sobreproducción de plasmina en los mecanismos patológicos relacionados con la endarteritis proliferativa en la dirofilariosis cardiopulmonar. DiES: antígenos excretos/secretos de *D. immitis*; MEC: matriz extracelular; MLV: músculo liso vascular; MMP: metaloproteasas de matriz; PDFs: productos de la degradación de la fibrina; tPA: activador tisular del plasminógeno.



**Figura 2.** Imágenes representativas del experimento en el que se demuestra que los antígenos excretos/secretos de *D. immitis* (DiES) y el plasminógeno (PLG) estimulan la migración de células endoteliales vasculares y de músculo liso de perros. Los resultados indican que la plasmina generada por la mezcla de DiES+PLG provoca un mayor porcentaje de migración celular que en los grupos control (células sin tratar o tratadas con DiES, PLG o DiES+PLG+  $\epsilon$ -ACA). Las flechas indican los puntos donde se juntan los frentes celulares que han migrado.

► evadir la actividad del sistema inmune del hospedador, sino también deben evitar la coagulación de la sangre a través de la interacción con el sistema fibrinolítico (Mebius et al., 2013). La fibrinólisis es uno de los mecanismos anticoagulantes más importantes del sistema hemostático. Uno de sus componentes clave es el plasminógeno, una glicoproteína de cadena sencilla con una masa molecular de 92 kDa, que se produce en el hígado

nasal (u-PA) [Cesarman-Maus and Hajjar, 2005]. Los receptores de plasminógeno están presentes en la red de fibrina y en diversos tipos de células, tales como monocitos, macrófagos, células endoteliales, neuronales, fibroblastos, plaquetas y células cancerosas (Hawley et al., 2000). También se han identificado en la superficie de diversas bacterias, hongos, protozoos y helmintos (González-Miguel et al., 2012).

unir y activar plasminógeno generando plasmina de forma dependiente del t-PA. Además hemos observado que los antígenos excretos/secretos son capaces de producir una sobreexpresión del activador fibrinolítico t-PA en cultivos de células endoteliales vasculares. Adicionalmente, hemos identificado un total de 10 y 11 proteínas diferentes, respectivamente, en los extractos excretor/secretor y de superficie del parásito con capacidad para unir plasminógeno, mediante la combinación de técnicas inmunoproteómicas y espectrometría de masas (tabla) (González-Miguel et al., 2012 y 2013).

### Conclusiones

El conocimiento de los mecanismos moleculares que rigen las interacciones entre los parásitos y sus hospedadores es un hecho fundamental para establecer métodos de control eficaces en las enfermedades parasitarias.

En la dirofilariosis cardiopulmonar, el creciente interés de la comunidad científica y el aumento de las técnicas disponibles han permitido el avance en el conocimiento de esta parasitosis en los últimos años. No obstante, los estudios sobre las relaciones parásito/hospedador en la dirofilariosis son aún muy escasos.



**La liberación masiva de productos antigénicos de los parásitos al torrente circulatorio es responsable de la exacerbación de las reacciones inflamatorias en el endotelio vascular y de la formación de tromboembolismos.**

y está presente en la sangre y en otros fluidos extravasculares. El plasminógeno es una proenzima que tras su activación se convierte en plasmina, que es la serina proteasa encargada de degradar la fibrina de los coágulos. La conversión de plasminógeno en plasmina está regulada por su unión a receptores a través de sus cinco dominios "kringle" con afinidad por los residuos de lisina y por los activadores del plasminógeno [activador tisular del plasminógeno (t-PA) y uroki-

Puesto que los vermes adultos de *D. immitis* sobreviven durante años en el sistema vascular de sus hospedadores inmunocompetentes, parece razonable asumir que estos utilizan sus productos metabólicos para interactuar con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores y así limitar la formación de coágulos. En estudios previos *in vitro* hemos demostrado mediante la utilización de dos compartimentos antigénicos (excretor/secretor y superficie), que *D. immitis* es capaz de

Los resultados obtenidos por nuestro grupo aportan un avance en el conocimiento de algunos de estos mecanismos mostrando, además, su enorme complejidad y dependencia mutua. Los modelos *in vitro* son fundamentales para determinar estos mecanismos, cuya actividad deberá ser confirmada en modelos *in vivo* en el futuro. □

Bibliografía disponible en [www.argos.grupoasis.com/bibliografias/dirofilariainvitro161.doc](http://www.argos.grupoasis.com/bibliografias/dirofilariainvitro161.doc)