

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

SILVANA MARIS CIRIO

EPIDEMIOLOGIA E CLÍNICA DE CÃES PORTADORES DE DIROFILARIOSE EM ESPAÇOS  
URBANOS DE MUNICÍPIO DO LITORAL DO PARANÁ E ASPECTOS DA HISTOLOGIA DE  
*CULEX QUINQUEFASCIATUS* SAY, 1823 (DIPTERA, CULICIDAE)

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor, pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área  
de Concentração em Entomologia, do Setor de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
do Paraná.

Orientador : Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Ennio Luz

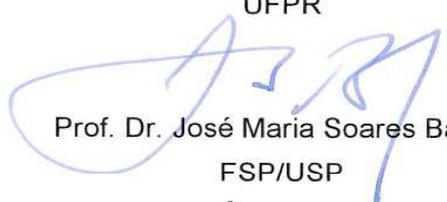
Curitiba  
2005

SILVANA MARIS CIRIO

“EPIDEMIOLOGIA E CLÍNICA DE CÃES PORTADORES DE DIROFILARIOSE  
EM ESPAÇOS URBANOS DE MUNICÍPIO DO LITORAL DO PARANÁ E  
ASPECTOS DA HISTOLOGIA DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS* SAY, 1823  
(DIPTERA, CULICIDEA).”

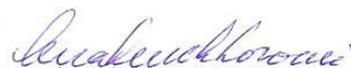
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Doutor em  
Ciências”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de  
Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela  
Comissão formada pelos professores:

  
Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva (Orientador)  
UFPR

  
Prof. Dr. José Maria Soares Barata  
FSP/USP

  
Prof. Dr. Delsio Natal  
FSP/USP

  
Prof. Dr. Ennio Luz  
UFPR

  
Profa. Dra. Ana Leuch Lozovei  
UFPR

Curitiba, 24 de maio de 2005.

***Dedico este trabalho***

**A meus pais, Raquel e Quinto, exemplos de vida**

**A Luiz Carlos, Selene e Marcelle, os amores da minha vida**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA, mais do que orientador, mostrou como os horizontes são amplos.

Ao Prof. Dr. ENNIO LUZ, que vem me acompanhando ao longo de minha vida profissional.

Ao Prof. JOÃO MARIA FERRAZ DINIZ, meu pai profissional, é sua esta conquista.

À PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ, pela concessão da licença.

Ao Prof. Dr. SILVYO PÉLLICO NETO, Decano do Centro de Ciência Agrárias, pela recomendação ao curso de Pós-Graduação.

Ao Prof. RODRIGO TÁVORA MIRA, Diretor do Curso de Medicina Veterinária, pelo apoio.

Ao Prof. Dr. ANTONIO FELIPE PAULINO DE FIGUEIREDO WOUK, pela amizade e incentivo.

Ao CORPO CLÍNICO e PESSOAL DE APOIO da UNIDADE HOSPITALAR PARA ANIMAIS DE COMPANHIA da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em especial Prof. Marconi Rodrigues de Farias e Profª Ana Paula Sarraf.

Aos funcionários LUCIANO DOS SANTOS e MARCOS AURÉLIO DOS SANTOS, que encheram de cuidados e adotaram o cão “Diro”.

Ao Canil Municipal de Guaratuba, Paraná na pessoa do Dr. Hermínio de Paula Mulinari.

Ao casal Sr. ROMALINO COSTA e Sra. CLAUDIA XISTO, pela permissão de acompanhar seu cão “Lobo”.

À COORDENAÇÃO e ao CORPO DOCENTE do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná, pela acolhida ao Curso.

Aos colegas do LEMV – Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, pela convivência e amizade.

À Profª DANIELLE MURAD TULLIO, minha amiga presente em muitos momentos importantes.

À minha irmã ROSSANA CIRIO UBA, pelas sugestões em português e em inglês.

Ao Prof. Enio Moura, colega e amigo, pela cessão de fotos do arquivo pessoal.

Ao grande amigo Maurício Bacila, uma lembrança sempre viva.

*Um agradecimento especial aos cães DIRO e LOBO.*

*Sem eles este trabalho não existiria...*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 <i>Dirofilaria immitis</i> Leidy, 1856-O agente da doença e o ciclo no hospedeiro.....	2
1.2 Distribuição geográfica de <i>Dirofilaria immitis</i> .....	4
1.3 Fatores que influenciam na competência do vetor.....	8
1.3.1 A concentração de microfilárias e a frequência da hematofagia.....	9
1.3.2 A idade do mosquito e seu estado reprodutivo.....	10
1.3.3 As características anatômicas.....	10
1.3.4 A resposta humoral e a resposta celular.....	13
1.4 Potenciais vetores de <i>Dirofilaria immitis</i> .....	20
1.4.1 <i>Culex quinquefasciatus</i> Say 1823 como potencial vetor de dirofilariose.....	21
1.5 Animais suscetíveis ao desenvolvimento de <i>Dirofilaria immitis</i> .....	28
1.6 A dirofilariose no ser humano.....	35
1.7 A patogenia da dirofilariose no cão.....	41
1.8 Fatores epidemiológicos que podem influenciar no estabelecimento da dirofilariose.....	48
1.9 Os exames laboratoriais para a dirofilariose.....	49
1.9.1 Testes para microfilária circulante.....	50
1.9.2 Testes para concentração de microfilárias.....	51
1.9.3 Testes para pesquisa de anticorpos de <i>Dirofilaria immitis</i> .....	52
1.9.4 Testes para pesquisa de antígenos de <i>Dirofilaria immitis</i> .....	53
1.9.5 O exame radiográfico e de ultra-som.....	55
1.9.6 O exame necroscópico .....	56
1.9.7 O exame histopatológico .....	56
<b>OBJETIVOS</b> .....	59
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	61
2.1 Descrição geral de Guaratuba.....	61
2.2 Descrição das áreas e procedimentos de amostragem.....	61
2.1.2 Grupo 1 - Canil Municipal de Guaratuba.....	62
2.2.2 Grupo 2 - Bairro COHAPAR II.....	63
2.3 Avaliação clínica dos cães.....	64
2.4 Exames laboratoriais utilizados para a pesquisa e identificação de microfilárias no sangue .....	65
2.4.1 Exame direto do sangue a fresco.....	65
2.4.2 Método de Knott (1939) modificado por NEWTON & WRIGHT (1956).....	65
2.4.3 <i>Snap® Canine Heartworm Antigen Test Kit (IDEXX Laboratories)</i> .....	66
2.5 Acompanhamento clínico de cães positivos para <i>Dirofilaria immitis</i> .....	68
2.5.1 Exames clínicos do cão mantido sob condições controladas no UHVAC.....	68
2.5.2 Procedimentos clínicos adotados para o cão mantido em condições não controladas no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, Paraná.....	70
2.6 <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	71

2.6.1 Estabelecimento da colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	71
2.6.2 Pesquisa de cristais de oxihemoglobina em intestino médio de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	72
2.6.3 Preparo dos exemplares de <i>Culex quinquefasciatus</i> para o estudo histológico.	72
2.7 Preparo dos exemplares adultos de <i>Dirofilaria immitis</i> para o estudo histológico.	73
<b>3. RESULTADOS</b> .....	74
3.1 Prevalência de <i>Dirofilaria immitis</i> em cães do Canil Municipal de Guaratuba, PR	74
3.2 Prevalência de <i>Dirofilaria immitis</i> em cães domiciliados do Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR.....	76
3.3 Acompanhamento clínico dos cães positivos para <i>Dirofilaria immitis</i> .....	79
3.3.1 Avaliação clínica do cão “Diro” do Canil Municipal de Guaratuba.....	79
3.3.2 Bairro COHAPAR II.....	88
3.4 Pesquisa de cristais de oxihemoglobina em intestino médio de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	92
3.5 Aspectos histológicos do intestino médio, intestino posterior e ovários de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	93
3.6 Aspectos histológicos de fêmea adulta de <i>Dirofilaria immitis</i> .....	99
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	101
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	116
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	118

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características morfológicas para identificação de microfilárias de <i>Dirofilaria immitis</i> .....	66
---	----

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Levantamento da prevalência de <i>Dirofilaria immitis</i> em cães no Brasil em pesquisas realizadas no período de 1946 a 2004.....	7
QUADRO 2 - Demonstrativo das avaliações clínicas, laboratoriais e de imagem entre maio de 2002 e julho de 2004 do cão “Diro” positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> , proveniente do Canil Municipal de Guaratuba, PR.....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Canil Municipal de Guaratuba, PR. A. Vista frontal. B. Entrada principal para acesso aos canis coletivos e individuais. C. Canis individuais.....	63
Figura 2. Bairro COHAPAR II, Guaratuba, Paraná. A. Condições de drenagem das águas em uma rua do bairro. B. Aspecto geral das moradias. C. Peridomicílio com abrigo de cães .....	64
Figura 3. Interpretação dos resultados do <i>Snap® Canine Heartworm Antigen Test Kit (IDEXX Laboratories)</i> segundo indicação do fabricante.....	67
Figura 4. A/B. Vista frontal da Unidade Hospitalar para Animais de Companhia da PUCPR (UHVAC) em São José dos Pinhais, PR. C/D. Canil para doenças infecto-contagiosas, PUCPR. E/F. Exame clínico e venopunção em jugular do cão positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> . G/H. Exame radiográfico e de ultra-som do cão positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> .....	69
Figura 5. A. “Lobo”, cão microfilarêmico e positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> . B. Médico Veterinário Luiz C. Leite (centro) e proprietários do “Lobo”, Sr. Romalino e Sra. Claudia em seu domicílio no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR.....	71
Figura 6. Frequência de cães machos e fêmeas avaliados para microfilárias no Canil Municipal de Guaratuba, PR, no período de 12 meses entre maio de 2001 e abril de 2002.....	75
Figura 7. Idade dos cães avaliados para microfilárias no Canil Municipal de Guaratuba, PR, no período de 12 meses entre maio de 2001 e abril de 2002.....	75
Figura 8. Porte dos cães avaliados para microfilárias no Canil Municipal de Guaratuba, PR, no período de 12 meses entre maio de 2001 e abril de 2002.....	76
Figura 9. Frequências de cães machos e fêmeas avaliados para microfilárias no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR, no período de 12 meses, entre maio de 2002 e abril de 2003.....	77
Figura 10. Idade dos cães avaliados para microfilárias no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR, no período de 12 meses, entre maio de 2002 e abril de 2003.....	78
Figura 11. Porte dos cães avaliados para microfilárias no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR, no período de 12 meses, entre maio de 2002 e abril de 2003.....	78
Figura 12. A. “Diro”, cão microfilarêmico e positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> , diagnosticado no Canil Municipal de Guaratuba, PR. B. Canil de isolamento da Unidade Hospitalar para Animais de Companhia da PUCPR, Curitiba, PR. C. Venopunção. D. Microfilária de <i>Dirofilaria immitis</i> em exame direto a fresco. E. Microfilária em Teste de Knott modificado. F. <i>Snap® Test</i> positivo.....	85

Figura 13. Exames complementares do “Diro” cão microfilarêmico e positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> , diagnosticado no Canil Municipal de Guaratuba, PR. A. Preparo para o exame radiológico. B. RX n.º 1 realizado em abril de 2002 com aumento do VD do coração. C. RX n.º 3 realizado em outubro de 2003, 19 meses após, sem evolução do quadro. D. RX n.º 4 realizado em junho de 2004, após 27 meses, com aumento do VD e discreta proeminência do AE. ....	86
Figura 14. Exames complementares de “Diro”, cão microfilarêmico e positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> , diagnosticado no Canil Municipal de Guaratuba, PR. A e B. Exame de ultra-som no UHVAC/PUCPR. C. Resultado do exame de ultra-som realizado na Avaliação n.º 4, em julho de 2004, sem alterações evidentes.....	87
Figura 15. Número de microfílias circulantes de <i>Dirofilaria immitis</i> detectadas nas avaliações mensais de “Diro”, detectado no Canil Municipal de Guaratuba, PR. e mantido no UHVAC/PUCPR.....	87
Figura 16. Sangue do cão “Lobo” microfilarêmico e positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> , domiciliados no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR. A. Microfíliar de <i>Dirofilaria immitis</i> em exame direto a fresco. B. Microfíliar em Teste de Knott modificado. C. <i>Snap® Test</i> positivo.....	89
Figura 17. Número de microfílias circulantes de <i>Dirofilaria immitis</i> detectadas nas avaliações mensais de “Lobo”, domiciliado no Bairro COHAPAR, Guaratuba, PR.....	89
Figura 18. Exame necroscópico do cão microfilarêmico e positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> , diagnosticado no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR. A. Animal magro e com lesões cutâneas (seta). B. Mucosa oral pálida e dentes fraturados. C. Aspecto geral interno do cadáver. D. Hidropericárdio. E. Áreas pálidas no miocárdio em AD (circulo).....	91
Figura 19. Exame histopatológico do cão microfilarêmico e positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> , diagnosticado no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR. A/B. Parótida com cortes de microfílias (círculo). Azul de Toluidina. Obj.40x. C. Parótida com cortes de microfílias. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40x. D. Fígado com fibrose centro-lobular (seta). Tricrômico de Shorr. Obj. 40x.....	92
Figura 20. <i>Culex quinquefasciatus</i> . Exame microscópico direto do conteúdo do intestino médio, após uma hora do repasto em cão, onde se observam cristais de hemoglobina (seta) e túbulos de Malpighi (TM). Corante de Shorr. Obj. 10x.....	93
Figura 21. <i>Culex quinquefasciatus</i> . Fêmea com 24 horas de vida e sem repasto. Corte longitudinal da região abdominal. Região posterior do Intestino médio (IMP). Conteúdo do IMP (CIMP). Intestino posterior (IP) Túbulos de Malpighi (TM). Píloro (P). Ovariolo (OV). Hematoxilina-Eosina, Obj.10x.....	94
Figura 22. <i>Culex quinquefasciatus</i> . Fêmea com 24 horas de vida e sem repasto. Corte longitudinal da região abdominal. Intestino médio posterior (IMP). Conteúdo do IMP (CIMP). Intestino posterior (IP) Túbulos de Malpighi (TM). Píloro (P). Glândulas retais (Gr). Reto (R). A/B. Tricrômico de Shorr. Obj. 40x. C. Tricrômico de	

Mallory. Obj.10x.....	94
Figura 23. <i>Culex quinquefasciatus</i> . Fêmea com 24 horas de vida e sem repasto. Células dos Túbulos de Malpighi (seta). Ovariolo (OV). Cálice (C). Tricrômico de Shorr. Obj. 40x.....	95
Figura 24. <i>Culex quinquefasciatus</i> . Fêmeas com 48 horas de vida e pós-repasto imediato. Região posterior do Intestino médio distendido por sangue (IMP).Células dos Túbulos de Malpighi (seta). Ovariolo (OV). Cálice (C). Folículos com trofócitos e oócitos (F). A. Hematoxilina-Eosina, Obj.4x. B.Tricrômico de Mallory. Obj. 40x.....	96
Figura 25. <i>Culex quinquefasciatus</i> . Fêmeas com 72 horas de vida e após 24 horas do repasto. A. O abdômen está distendido por óvulos (O). Região posterior do Intestino médio (IMP) com conteúdo envolvido pela matriz peritrófica, de coloração negra (CIMP), também presente no intestino posterior (IP) e no reto (R). B. Intestino posterior (IP) com projeções papilares revestidas por células epiteliais e conteúdo negro digerido, adjacente ao túbulo de Malpighi em corte longitudinal. C. Intestino posterior (IP) e reto (R) com conteúdo digerido negro. Observam-se cortes das glândulas do reto (Gr), óvulos (O) e oviduto (ov) ). A/C. Tricrômico de Mallory. Obj.4x. B. Tricrômico de Shorr. Obj. 40x.....	97
Figura 26. <i>Culex quinquefasciatus</i> . Fêmeas com 72 horas de vida e após 24 horas do repasto. Região abdominal mostrando parte do ovário com ovariolos (OV) em fase de oócito maduro. No reto (R) não há conteúdo ainda e observa-se glândula anexa do reto (Gr) projetando-se para a luz. Túbulos de Malpighi (TM) em corte transversal. Oviduto (ov) e espermateca com espermatozóides (E). Hematoxilina-Eosina, Obj.10x.....	98
Figura 27. <i>Culex quinquefasciatus</i> . Fêmeas com 72 horas de vida e após 24 horas do repasto. Região abdominal, porção terminal A. Observa-se oviduto (ov) com óvulo em sua luz e o conteúdo negro digerido no reto (R). B. A espermateca adjacente ao oviduto (ov), à glândula secretora do envelope do óvulo (gs) e ao reto (R) está repleta de espermatozóides. C. Região posterior do Intestino médio com epitélio pseudoestratificado (EPS) e conteúdo envolvido pela matriz peritrófica (CIMP) adjacente ao óvulo. D. Envoltório do óvulo (eo) formado por células angulares. Reto (R) com conteúdo digerido e túbulos de Malpighi (TM) em corte longitudinal. A/B/C. Tricrômico de Mallory. Obj.40x. D.Tricrômico de Shorr. Obj. 40x.....	99
Figura 28. Aspecto microscópico de fêmea adulta de <i>Dirofilaria immitis</i> . A. Cutícula lisa (Ct) e camada muscular (CM) proeminente composta por células dispostas perpendicularmente à superfície. B. Projeção interna da cutícula (PIC) e canal alimentar (Ca). C. Útero repleto de microfílarías. D. Útero contendo ovos. A/D. Tricrômico de Shorr. Obj. 40x. B. Tricrômico de Mallory. Obj.10x. C. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40x.....	100

## RESUMO

Regiões litorâneas localizadas nos trópicos são consideradas enzoóticas para ocorrência de *Dirofilaria immitis*, o qual possui distribuição cosmopolita. Apresenta-se como situação favorável o clima, devido às temperaturas elevadas e à alta precipitação pluviométrica, que por sua vez possuem relação direta e positiva com o desenvolvimento de espécies de Díptera, considerados como vetores em potencial, como por exemplo *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). O presente trabalho teve por objetivo avaliar a prevalência de *Dirofilaria immitis* em duas populações de cães de área urbana, acompanhar a evolução clínica dos animais portadores de dirofilariose e abordar aspectos da morfologia interna de *Culex quinquefasciatus*. A prevalência de *Dirofilaria immitis* foi determinada em duas populações de cães presentes no município de Guaratuba, Paraná. Uma das populações era formada por cães errantes capturados pelo Serviço de Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal. A outra população era de cães domiciliados em um bairro periférico ao núcleo central da cidade com infra-estrutura deficiente quanto ao abastecimento, recolhimento de águas servidas e drenagem do solo. Para avaliação da presença de microfilárias e sua identificação foram utilizados simultaneamente três métodos: exame direto a fresco, teste de Knott modificado e *Snap® Canine Heartworm Antigen Test Kit (IDEXX Laboratories)*. Foi realizado o acompanhamento da evolução clínica dos cães microfilarêmicos, sob condições diferenciadas de manejo: a) condições ideais de alimentação e abrigo, e b) cão sob guarda dos proprietários, porém sem alimentação e abrigo adequados. Os procedimentos comuns entre os dois cães foram exames para microfilárias, mas o cão sob condições ideais foi submetido aos exames de hemograma, exame coproparasitológico e parasitológico de pele, exame radiográfico e de ultra-som de tórax. No cão sob guarda dos proprietários foram realizados os exames necroscópico e histopatológico. Para *Dirofilaria immitis* foi detectada prevalência de 1% de

cães microfilarêmicos positivos para os cães capturados e prevalência de 4,2% no grupo de cães domiciliados, neste segundo caso os dados indicando potencial de dirofilariose para o espaço urbano analisado. Paralelamente, através do exame direto de sangue a fresco e Teste de Knott modificado, foi possível determinar a prevalência de *Dipetalonema sp.*, cujos valores foram 11,6% para os cães capturados e 5,6 % para os cães domiciliados. O acompanhamento da evolução clínica da doença nos cães microfilarêmicos evidenciou o mesmo comportamento de redução progressiva da microfilaremia, embora um dos cães tenha chegado a óbito por causas não relacionadas com a presença de *Dirofilaria immitis*. O estudo microscópico das estruturas internas de *Culex quinquefasciatus* demonstrou que este agente possui três mecanismos de defesa contra microfírias relacionados diretamente com o intestino médio que seriam a formação de cristais de oxihemoglobina, a coagulação do sangue ingerido e a secreção da matriz peritrófica em um período de tempo menor. A dirofilariose em Guaratuba pode ser considerada uma zoonose de reduzida importância quantitativa, porém qualitativamente os casos positivos indicam a necessidade de monitoramento dos cães e da população dos vetores em potencial, uma vez que o bairro de maior prevalência da doença apresenta alguns dos elementos necessários para a manutenção da dirofilariose, que seriam as condições ambientais para o desenvolvimento do mosquito potencial vetor e os cães infectados portadores da doença.

Palavras-chave: *Dirofilaria immitis*, Dirofilariose canina, *Culex quinquefasciatus*, *Dipetalonema sp.*

## ABSTRACT

Coastal areas located in the tropics are considered enzootic for *Dirofilaria immitis*, which has cosmopolitan distribution. The climate may be presented as a favorable condition, owing to the high temperatures and high pluviometric precipitation. These have direct and positive relation with the development of species of Diptera, considered potential vectors, as for instance *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). This research aims at evaluating the prevalence of *Dirofilaria immitis* in two populations of dogs from an urban area, following the clinic evolution of the animals with dirofilariosis and discussing aspects of the internal morphology of *Culex quinquefasciatus*. The prevalence of *Dirofilaria immitis* was examined in two populations of dogs in Guaratuba, Paraná. One population consisted of wandering dogs captured by the Sanitary Vigilance Department of the City Hall. The other population consisted of domiciliary dogs from a district away from the downtown area and deficient in water supplying, water collecting and soil drainage infrastructure. Three methods have been simultaneously used to detect and identify microfilaries: the direct blood smear, the modified Knott's test and the *Snap® Canine Heartworm Antigen Test Kit (IDEXX Laboratories)*. The clinical evolution of the microfilaremic dogs was performed under different handling conditions: a) a dog under ideal conditions of feeding and shelter, and b) a dog in the care of its owners without appropriate feeding and shelter. The common procedures for both dogs were demonstration of microfilaries in blood films. The dog under ideal conditions was submitted to hemograma, skin and fecal parasitologic exams, radiographic and ultrasonographic thoracic exams, while only necropsy and histopathology were performed in the dog in the care of its owners. For *Dirofilaria immitis* it was detected a prevalence of 1% positive microfilaremic in the group of dogs captured and a prevalence of 4.2% positive microfilaremic in the group of domiciliary dogs, in which case the results indicated potential for dirofilariosis in the urban area analyzed. Concomitantly, through the direct blood smear and the modified Knott's test, the prevalence of *Dipetalonema sp.* was detected, the values of which were 11.6% for the dogs captured and 5.6% for the domiciliary dogs. The clinical evolution of the disease in the microfilaremic dogs demonstrated the same progressive reduction of microfilaremia, although one of the dogs died for causes not related to *Dirofilaria immitis*. The microscopic study of the internal structures of *Culex quinquefasciatus* showed that this agent has three defense mechanisms against microfilaries directly related to the middle intestine: the oxihemoglobin crystal formation, the ingested blood coagulation and

the peritrophic matrix secretion in a shorter period of time. The dirofilariosis in Guaratuba may be considered a zoonosis of reduced quantitative importance; nevertheless, when considered qualitatively, the positive cases indicate the need of monitoring the dogs and the population of potential vectors, once the area of major prevalence of the disease has some of the necessary elements for the maintenance of dirofilariosis, which are the environmental conditions for the development of the potential vector mosquito and the dogs which bear the disease.

Key-words: *Dirofilaria immitis*, Dirofilariosis in dog, *Culex quinquefasciatus*, *Dipetalonema sp.*

## INTRODUÇÃO

O estudo da patogênese das filarioses é dificultado pela especificidade do hospedeiro e pelo complexo ciclo do parasita. As filárias necessitam de um artrópodo vetor para a maturação das larvas e a sua transmissão. Após a maturação, quando o vetor faz o repasto em outro animal, a larva infectante penetra na pele, migra até o órgão alvo e se desenvolve até a fase madura, onde há produção de microfílarias, reiniciando o ciclo.

Ao redor do mundo, as filarioses atingem grande número de pessoas e animais, geralmente em áreas tropicais devido às condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos respectivos vetores. Os animais não participam na epidemiologia de algumas das filarioses mais importantes para o ser humano, como *Wuchereria bancrofti* Cobbold, 1877, *Loa loa* Cobbold, 1864 e *Onchocerca volvulus* Leukart, 1893. Outras filárias, do gênero *Dirofilaria* possuem potencial zoonótico, mas somente *Dirofilaria immitis* Leidy, 1856 pode causar dirofilariose pulmonar no ser humano, apesar de nematodas como *Dirofilaria tenuis* Chandler, 1942, de racoons, *Dirofilaria ursi* Yamaguti, 1941, de ursos e *Dirofilaria subdermata* Monning, 1924, de porco-espinho causarem dirofilariose subcutânea no homem. Outro parasita deste gênero, *Dirofilaria repens* Railliet e Henry, 1911 além de infectar cães pode causar dirofilariose ocular no ser humano (ACHA & SZYFRES, 1986).

*Dirofilaria immitis* é a filariose de maior prevalência para o cão em algumas regiões que reúnem as condições necessárias para o seu desenvolvimento e permanência, em geral áreas litorâneas. Nestas regiões chega a ser a maior causa de morbidade e mortalidade de cães domésticos, que passam a ser também fonte de infecção para animais silvestres. Algumas drogas utilizadas para a sua prevenção tem tido sucesso na prevenção de outras filarioses em humanos, cujos parasitas apresentam muitas semelhanças com *Dirofilaria immitis* e as características bioquímicas, de comportamento e de taxonomia tornam este parasita modelo

ideal para o estudo da patogênese da filariose humana e animal (MUPANOMUNDA *et al.* 1997).

### **1.1 *Dirofilaria immitis* - o agente da doença e os ciclos nos hospedeiros**

A dirofilariose canina é também chamada de “Doença do verme do coração” e tem como agente etiológico o parasita *Dirofilaria immitis*, descrito nos Estados Unidos por Leidy em 1850 como *Filaria immitis*, e por ele mesmo reclassificado no gênero *Dirofilaria*. No Brasil, a dirofilariose canina vem sendo estudada desde 1878, os casos humanos desde 1887 e a doença nos felinos desde 1921 (ALMOSNY *et al.*, 2002). Como outros parasitas filarioides e helmintos, seu ciclo consiste de cinco estádios de desenvolvimento em um hospedeiro vertebrado e em um artrópodo hematófago (mosquito) como vetor.

Os parasitas machos adultos possuem comprimento de 120 a 200 mm e diâmetro de 0,7 a 0,9 mm. As fêmeas adultas medem 250 a 310 mm de comprimento por 1 a 1,3 mm de diâmetro. O aspecto microscópico de *Dirofilaria immitis* revela cutícula lisa, multilaminar com espessura variando entre 5 e 25  $\mu\text{m}$  com projeções internas espessas, diametralmente opostas, seguidas de musculatura proeminente (GUTIERREZ, 1996; SKIDMORE *et al.*, 2000; NISSEN & WALKER, 2003). As fêmeas são vivíparas e liberam as microfilárias na circulação sanguínea, as quais são ingeridas pelo mosquito vetor no momento do repasto. No ciclo de vida de *Dirofilaria immitis* ocorrem quatro mudas, sendo a 1ª e a 2ª mudas no mosquito e a 3ª e 4ª no hospedeiro definitivo. A microfilária mede  $298,1 \pm 8,7 \mu\text{m}$  de comprimento e  $7,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de largura. Possui a extremidade anterior ovalada e a posterior é reta (BRITO *et al.* 2001). Os 1º, 2º e 3º estádios larvais de *Dirofilaria immitis* são parasitas obrigatórios de mosquitos, predominantemente os de gênero *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, entre as mais de 70 espécies distribuídas em seis gêneros de mosquitos que são capazes da propagação de *Dirofilaria immitis*. Também algumas espécies de pulgas podem atuar como vetores (STUEBEN, 1954).

No vetor as larvas desenvolvem-se até o estágio infectivo em aproximadamente 13 dias nos túbulos de Malpighi, migrando para os espaços intersticiais da cabeça ou para a probóscide, para serem inoculadas em um novo hospedeiro no momento do repasto do mosquito. A larva infectante, quando no hospedeiro vertebrado mede 1,2 mm de comprimento e atinge 5 cm quando chega ao ventrículo direito, 3 a 4 meses após a inoculação. Neste intervalo de tempo, o parasita permanece no tecido subcutâneo e músculos, migrando através das veias para o coração, quando atinge a idade adulta após aproximadamente 3 meses. A larva infectante evolui para L4 entre 3 e 9 dias pós-infecção, ocorrendo a 4ª muda entre 50 e 58 dias pós-infecção. Os adultos imaturos (L5) chegam ao coração do hospedeiro 20 dias após a 4ª muda e aproximadamente 70 dias após a inoculação. O período pré-patente é de 6 a 8 meses. Os adultos podem viver por vários anos no cão, e a microfilária pode sobreviver no máximo, dois anos e meio (HARRISON & THOMPSON, 1965; MERRIL *et al.*, 1980; KOTANI & POWERS, 1982; ACHA, 1986).

KOTANI & POWERS (1982) fizeram um estudo experimental sobre os estágios de desenvolvimento de *Dirofilaria immitis*, inoculando L3 infectantes em cães da raça Beagle. A larva infectante media de 0,85 a 13,3 mm; L4 de 1,1 a 13,9 mm; L5 em locais intermediários (músculo e tecido subcutâneo) tinham como medida 11,8 mm para o macho e 134 mm para a fêmea. Esta, quando no coração media de 19 a 295 mm e as medidas dos machos no mesmo local era de 27 a 184 mm. Nesse estudo microfilárias foram detectadas em aproximadamente 6 meses após a inoculação. Em outro estudo os mesmos autores inocularam em 36 cães beagle com larvas infectantes de 3º. estágio para determinar quando as terceira e quarta mudas ocorrem, de quanto tempo é o estágio de desenvolvimento no músculo e pele do cão e como se dá a migração do local da infecção até o coração. Entre 22 e 84 % das larvas inoculadas foram recuperadas da pele ou do músculo nos primeiros 58 dias pós-inoculação. Parasitas adultos e imaturos foram observados no coração dos cães com 70 dias pós-inoculação. A

migração ao coração completou-se em torno de quatro meses pós-inoculação e em aproximadamente seis meses haviam microfílarias no sangue periférico.

A periodicidade das microfílarias no sangue está relacionada às alterações na densidade de microfílarias na circulação periférica do cão de acordo com o período do dia. WALTERS (1995) descreve três formas de manifestação: aperiódica, subperiódica e periódica. A forma aperiódica mostra alteração mínima na densidade periférica durante as 24 horas. Apesar da permanência constante de microfílarias no sangue, na forma subperiódica, elas são detectadas em densidade variável em diferentes períodos do dia. Na forma periódica existe alternância entre baixa e alta densidade de microfílarias, podendo a concentração maior acontecer tanto no período diurno quanto noturno, representando uma evolução na adaptação do parasita para maximizar a ingestão pelo vetor. Quando não estão no sangue periférico, permanecem nos capilares pulmonares. Além das variações diárias, pode haver flutuações sazonais, observadas por SAWYER (1975) em dois cães naturalmente infectados por *Dirofilaria immitis*, cuja densidade de microfílarias no sangue periférico foi maior no verão.

Investigando as causas do óbito de 17 coiotes (*Canis latrans* Say, 1823) no centro-sul da Geórgia, Estados Unidos, através de testes sorológicos, radio-telemetria e exames pós-mortem para diferentes agentes, HOLZMAN *et al.* (1992), observaram que a prevalência de microfílarias de *Dirofilaria immitis* foi baixa nos animais capturados no outono, enquanto que naqueles capturados no inverno foi alta. Do parasita adulto, a prevalência foi mais alta entre os animais adultos do que nos jovens capturados no outono.

## **1.2 Distribuição geográfica de *Dirofilaria immitis***

O parasita *Dirofilaria immitis* tem distribuição cosmopolita, mas há locais em onde é enzoótico. Mais de 70 espécies de mosquitos são capazes de permitir o desenvolvimento de microfílarias a larvas infectantes, de terceiro estadio (L3), mas acredita-se que menos de 12 espécies sejam vetores principais.

A prevalência da dirofilariose está influenciada por fatores ambientais propícios, sejam eles naturais como fonte de águas disponíveis ou como alterações ambientais provocadas pelo homem, principalmente no que se refere ao saneamento básico precário ou inexistente. Outros fatores seriam temperatura adequada para o desenvolvimento do mosquito, a identificação do vetor na região e sua densidade populacional, a exposição contínua do cão e o nível sócio-econômico da população humana local. Regiões costeiras tropicais e subtropicais com clima super-úmido onde há alta densidade pluviométrica e calor, apresentam prevalência acentuada de dirofilariose canina, o que não exclui a possibilidade de haver áreas distantes do litoral com incidência da doença. A isso se deve a alta mobilidade dos cães microfilarêmicos que acompanham seus proprietários em suas viagens, constituindo fonte de infecção para os mosquitos locais. Com relação à qualidade de vida da população humana, há de se levar em conta a informação sobre a doença, cuidados ao animal de estimação e medidas profiláticas adequadas sob orientação do médico veterinário (ALMOSNY *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-SILVA *et al.*, 2004).

Globalmente, a prevalência da dirofilariose varia de taxas extremamente baixas no Canadá a taxas excepcionalmente elevadas em áreas da Europa e da Ásia, particularmente em algumas regiões da Austrália, Itália e Japão. Na África a infecção canina parece ser comum em toda parte oeste e nas regiões do leste do continente. Na maioria das ilhas do Pacífico e em muitos países asiáticos a doença está bem estabelecida. No Japão é enzoótica e na Coreia do Sul a incidência é baixa. A prevalência da dirofilariose em cães de Sidney, Austrália, chegou a 30% no final da década de 1980. Mais recentemente a taxa em cães nesta mesma área foi relatada como sendo de 11,4%. A queda na prevalência ocorrida neste período deveu-se à vigilância associada à prevenção da dirofilariose. Na Europa a doença é diagnosticada principalmente nos países do sul, Espanha, Itália, Portugal e França, além de alguns casos na Grécia e Turquia. A área européia com a prevalência mais alta de dirofilariose

em cães localiza-se ao longo do Vale do Rio Pó, no norte da Itália. Nos Estados Unidos, em todos os seus 50 Estados a doença já foi diagnosticada em cães, sendo considerada enzoótica ao longo da costa do Atlântico. Os Estados da região sudeste apresentam índices de prevalência mais elevados. Em alguns países sul-americanos a dirofilariose é endêmica. Existem áreas na Argentina cuja prevalência varia de 5 a 32%. Na Venezuela este índice é de 2,3% (McCALL, 1998).

No Brasil a distribuição do parasita segue as mesmas tendências mundiais. Quando se avalia a distribuição da doença por região, os dados mais freqüentes são de localidades costeiras, mas existem relatos de locais distantes da costa (Quadro 1). XAVIER (1946) no Rio de Janeiro, ainda quando era sede do governo federal, apresentou o resultado de suas pesquisas em 526 cães nos quais encontrou 10,83% deles positivos para dirofilariose. DACORSO *et al.* (1953) também no Rio de Janeiro ao pesquisar o parasita em 144 cães, encontraram 4,9% deles parasitados. De 1989 a 1999, estudos revelavam que as mais altas prevalências de dirofilariose canina eram encontradas nos estados do Maranhão (46%), São Paulo (14,2%), Rio de Janeiro (13,68%) e Minas Gerais (9,4%) (DUQUE-ARAUJO *et al.*, 1995; LABARTHE *et al.*, 1998; AHID *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 1999). Através de um inquérito soropidemiológico realizados em 822 cães na cidade de Cuiabá, MT, constatou-se que 11,8% eram positivos (FERNANDES *et al.*, 2000). BRITO *et al.* (2001) estimaram a prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* (Grassi, 1889) após pesquisa de 1519 cães domiciliados em Maceió, AL. Foram detectados 15 (1,3%) cães com microfilárias de *Dirofilaria immitis* e 15 (1,3%) cães com microfilárias de *Dipetalonema reconditum*, todos os casos considerados como autóctones. Simultaneamente, foram capturadas 6579 fêmeas pertencentes a seis espécies de mosquitos e oito fêmeas de *Culex quinquefasciatus* foram encontradas naturalmente infectadas com larvas de *Dirofilaria immitis*.

QUADRO 1 – Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no Brasil em pesquisas realizadas no período de 1946 a 2004.

LOCAL	PREVALÊNCIA DE <i>Dirofilaria immitis</i> EM CÃES	AUTORES E ANO
Rio de Janeiro e Niterói	10,83 %	XAVIER, 1946
Rio de Janeiro	4,9 %	DACORSO <i>et al.</i> , 1953
Estado do Rio de Janeiro		
Litoral	19,18%	
Central e montanhosa	12,88%	LABARTHE <i>et al.</i> , 1989
Maranhão	46 %	DUQUE-ARAÚJO <i>et al.</i> , 1995
Rio de Janeiro, RJ	8,61 %	
Niterói, RJ	21,76 %	LABARTHE <i>et al.</i> , 1997
Belém, PA	10,74%	SOUZA <i>et al.</i> ; 1997
São Paulo, SP	12 %	ROCHA <i>et al.</i> , 1997
Recife, PE	2,3 %	ALVES <i>et al.</i> , 1999
Ilha de São Luiz, NE do Brasil	12,8 %	AHID <i>et al.</i> , 1999
Uberlândia, MG	9,41 %	FERREIRA <i>et al.</i> , 1999
Cuiabá, MT	11,81 %	FERNANDES <i>et al.</i> , 2000
Itacoatiara, Niterói, RJ	31,7 %	SERRÃO <i>et al.</i> , 2000
São Paulo e litoral, SP	8 %	SOUZA <i>et al.</i> , 2001
Maceió, AL	3,1 %	BRITO <i>et al.</i> , 2001
Salvador e Lauro Freitas, BA	10,4 %	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2001
Florianópolis, SC	15 %	ARAUJO <i>et al.</i> , 2003
Litoral do Paraná	5,47 %	REIFUR <i>et al.</i> , 2004
Rio de Janeiro, RJ	1,96 %	COSTA <i>et al.</i> , 2004

Na epidemiologia da dirofilariose também se estudou a relação entre as características fenotípicas dos cães e a contaminação por *Dirofilaria immitis*. ALMEIDA *et al.* (2001) estudaram

a influência da raça, cor, comprimento do pelo, sexo e idade no parasitismo por *Dirofilaria immitis* de uma população de 613 cães dos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, BA. Foram positivos 10,4% sendo o maior percentual em cães de seis a dez anos, com a frequência do parasitismo em machos de 11,7% e nas fêmeas de 9,2%. A presença de microfíliárias foi maior nos cães com definição de raça (11,1%), principalmente dogue alemão e boxer, e em animais de pelo curto (17,3%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as cores dos pelos e a ocorrência da infecção nos cães. GUEVARA *et al.* (1996) observaram que a maior frequência de cães positivos para *Dirofilaria immitis* na cidade do México foi a de animais do sexo masculino (4,2%). Em Seul, Coréia, YOON *et al.* (2002) investigaram dirofilariose em 17.644 cães usando o teste comercial Witness®, cujo resultado positivo foi observado em 263 animais (1,5%). Houve predomínio de animais com raça (71,8%), sexo feminino (56,6%), entre 3 e 4 anos de idade (64,6%), que eram mantidos no ambiente externo (88,2%) e não haviam sido submetidos à profilaxia (85,2%).

### **1.3 Fatores que influenciam na competência do vetor**

Na epidemiologia da dirofilariose é fundamental relacionar os mecanismos internos de defesa do mosquito com os fatores do meio ambiente para considerar a espécie competente na transmissão da doença.

Os insetos têm sido evolutivamente bem sucedidos, ocupando quase todos os habitats da biosfera atual. Assim sendo, defrontam-se com numerosas populações, muitas delas parasitas, representadas por microorganismos ou por helmintos. Na maioria dos casos, os parasitas passam por uma série complexa de crescimento e diferenciação para tornarem-se infectantes ao hospedeiro vertebrado. Conseqüentemente, desenvolveram-se mecanismos de defesa no hospedeiro/vetor que resultam em graus variados de resistência ao parasita (FORATTINI, 2002).

Os conhecimentos sobre o mecanismo de defesa em invertebrados em geral foram ampliados consideravelmente desde o trabalho pioneiro sobre fagocitose de METCHNIKOFF em 1892. Os artrópodos possuem um mecanismo sofisticado de resposta imunológica contra material estranho e vários estudos realizados visam desvendar os procedimentos pelos quais o parasita interage com os diferentes tecidos do vetor. Existem diferenças de resposta imunológica não só entre artrópodos de diferentes classes, ordens, gêneros e estágio de desenvolvimento, mas também entre espécies do mesmo gênero, inclusive na mesma espécie.

Os artrópodos possuem mecanismos gerais e específicos contra a infecção por parasitas. As barreiras gerais incluem as características anatômicas, como cutícula e armadura cibarial, e processos fisiológicos como formação de membrana peritrófica e síntese de proteases digestivas no interior do intestino médio. A resposta imunológica de origem celular e humoral é a forma específica dos insetos reagirem a presença do parasita.

O artrópodo *Drosophila* é considerado protótipo da resposta imune inata. É particularmente resistente às infecções bacterianas devido aos mecanismos desencadeados como resposta à agressão: fagocitose pelas células da hemolinfa; substâncias proteolíticas e síntese de peptídeos antimicrobianos. Estes peptídeos são primariamente produzidos pelas células do corpo adiposo e secretados para a hemolinfa (LAI-FOOK,1973).

### **1.3.1 A concentração de microfilárias e a frequência da hematofagia**

A concentração de microfilárias ingeridas após o repasto em um animal infectado pode influenciar na eficiência do mosquito como vetor. Cães infectados com *Dirofilaria immitis* e que possuam filaremia superior a 400 microfilárias/20 µl de sangue podem causar mortalidade elevada de mosquitos, muitas vezes chegando a 100%, pela destruição maciça de células, ao serem liberadas dos túbulos de Malpighi (CHRISTENSEN, 1978). Isso acaba sendo um fator autolimitante e a importância do mosquito altamente suscetível na transmissão da filária tende a diminuir, quando há elevada concentração de filárias na população canina da região. Por

outro lado, o mosquito considerado pouco competente como transmissor de filaria pode ressaltar seu significado como vetor, uma vez que, sendo parcialmente resistente à microfilária, suporta seu desenvolvimento até o estágio infectante L3. AHID *et al.* (2000) estudaram no Brasil cinco populações diferentes de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823, que foram capazes de desenvolver *Dirofilaria immitis* até o estágio infectivo e demonstraram ser essa espécie suscetível à infecção e também um vetor em potencial. Por estar presente o ano todo conforme a região do país, a frequência de hematofagia na população canina pode ser maior, aumentando a oportunidade de infecção. Tendo em vista o caráter antropofílico desta espécie, o homem pode vir a tornar-se hospedeiro ocasional da dirofilariose (AHID & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999).

### **1.3.2 A idade do mosquito e seu estado reprodutivo**

CHUNG *et al.* (1995) estudaram o efeito da idade e da condição de reprodução no processo de melanização de corpo estranho (Sephadex®) inoculado intratoracicamente em linhagens refratária e suscetível de *Anopheles (Cellia) gambiae*, Giles 1902 à infecção por *Plasmodium*. A habilidade de melanizar foi visivelmente afetada pela idade da fêmea e seu estado reprodutivo. Em linhagem refratária, foi mais eficiente no dia imediatamente após a emergência, com todas as partículas fortemente melanizadas. Depois, esta resposta foi decrescendo e, no sétimo dia, estava em torno de 23%. Na linhagem suscetível, no período imediatamente após a emergência, ocorreu melanização em apenas 53% das fêmeas.

### **1.3.3 As características anatômicas**

O tamanho do corpo de mosquitos adultos (Culicidae) pode influenciar vários fatores bionômicos como fecundidade, dispersão e o índice de agressão ao hospedeiro. Existem evidências que o volume grande do corpo está relacionado a uma maior quantidade de sangue ingerido por ocasião do repasto, maior fecundidade e vida mais longa. Fêmeas maiores são menos suscetíveis a várias infecções virais (NASCI & MITCHELL, 1994), enquanto que as

fêmeas de *Aedes aegypti* que são de tamanho maior são as mais infectadas pelo vírus da dengue (SUMANOCHITRAPON *et al.*, 1998). O volume do corpo do mosquito adulto pode ser influenciado pela densidade populacional em seu estágio larval. A limitação de alimento, ação de produtos químicos e a competição por espaço geram adultos menores em diferentes espécies estudadas.

Para nematóides entomofílicos, os locais de penetração mais comuns na cavidade corporal do inseto são a cutícula, o intestino médio e os túbulos de Malpighi. A cutícula e o revestimento interno do intestino médio funcionam como barreiras físico-químicas para proteger o inseto da ação de agentes patogênicos. Para invadir a cavidade interna do hospedeiro, os nematóides devem ser capazes de produzir lesão na cutícula ou no intestino médio, ou hidrolisar componentes desses tecidos. Quando a barreira intestinal é rompida, o nematóide invade a hemocele e ativa o processo inicial de reparação, incluindo aqui a coagulação da hemolinfa, e as respostas celular e humoral de defesa (NAPPI & CHRISTENSEN, 1987). Espécies de *Anopheles* possuem o cibário e a armadura faringeal bem desenvolvidos e podem causar dano letal à microfilária durante a sua ingestão. Em *Culex*, essa armadura é pouco desenvolvida e está ausente em *Aedes* (McGREEVY *et al.*, 1978). Em estudos de LOWRIE (1991) sobre infecção por *Dirofilaria immitis* em *Culex quinquefasciatus*, foi demonstrado que 12% das microfilárias apresentavam dano pela ação da armadura cibarial.

Em *Culex*, ocorre outra forma de dano às microfilárias que é através dos cristais de oxihemoglobina formados após a coagulação do sangue ingerido fazendo com que sejam excretadas mais rapidamente (NAYAR & SAUERMAN, 1975). LOWRIE (1991) observou cristais no intestino médio de *Culex quinquefasciatus* linhagem Haiti após 15 minutos da ingestão do sangue. Em duas horas, todo o sangue ingerido apresentava cristais semelhantes a agulhas que restringiam o movimento das microfilárias aos túbulos de Malpighi. Também existiam microfilárias mortas e nos resíduos intestinais. RUSSEL & GEARY (1992) realizaram

infecção experimental de *Aedes (Finlaya) notoscriptus* Skuse, 1889 e de *Culex (Culex) annulirostris* Skuse, 1889 com microfilárias de *Dirofilaria immitis*. Observaram que o coágulo sangüíneo formou-se mais rapidamente e com consistência mais sólida no intestino médio de *Culex annulirostris*, sendo maior o número de microfilárias impedidas de passar para os túbulos de Malpighi, demonstrando ser um vetor menos eficiente.

AHID *et al.* (2000) estudaram a competência de *Culex quinquefasciatus* de cinco regiões diferentes do Brasil na transmissão de *Dirofilaria immitis*. Observaram que houve rápida coagulação do sangue ingerido após uma hora do repasto, com formação de cristais de oxihemoglobina e diminuição dos movimentos das microfilárias, inclusive com presença de larvas mortas ou com dano na cutícula.

A matriz peritrófica (MP) pode participar da defesa contra parasitas, além de ter papel fundamental na digestão do sangue. Ela é formada por lâminas organizadas compostas por uma complexa mistura de proteínas, glicoproteínas, glicosaminoglicanas e polissacarídeos de quitina. Os mosquitos secretam MP tipo I pelas células do intestino médio e leva aproximadamente 48 horas para ser formada totalmente, apesar de existirem diferenças interespecíficas consideráveis. Ela é produzida somente após o repasto e há um curto período de tempo em que o sangue e o patógeno podem entrar em contato com o epitélio, permitindo a migração para o órgão-alvo. Muscidae secretam continuamente MP tipo II que já é pré-formada em células do pró-ventrículo e é eficiente contra bactérias e vírus. Mas helmintos e protozoários possuem enzimas que permitem atravessá-la ativamente. Devido à necessidade de controlar as populações de insetos e prevenir a transmissão de patógenos, LEHANE (1996) comenta a respeito do uso potencial de componentes do sistema imune do hospedeiro serem carregados para o interior do inseto através do repasto sangüíneo e discutem-se duas estratégias: atacar o parasita enquanto no interior do inseto ou atacar o inseto propriamente dito. Algumas pesquisas foram realizadas na década de 1990 mas o sucesso efetivo ocorreu

com o lançamento de uma vacina comercial cuja ação é sobre uma glicoproteína componente da MP do intestino de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) que leva ao comprometimento de sua digestão e conseqüentemente da fecundidade. A manipulação do canal alimentar do inseto hematófago no sentido de controlar a transmissão de patógenos depende do estudo básico de sua estrutura e do processo de digestão, através do qual é possível determinar características inerentes às diferentes espécies.

#### **1.3.4 A resposta humoral e a resposta celular**

A imunidade dos artrópodes deve-se à resposta humoral e resposta celular, as quais não devem ser vistas como processos distintos e sem relação (NAPPI & CHRISTENSEN, 1987). Os mecanismos de imunidade humoral são conhecidos contra bactérias invasoras e primariamente envolvem fatores antibacterianos denominados cecoprinas (BOMAN & HULTMARK, 1987). A resposta celular envolve fagocitose de bactérias, fungos e protozoários por hemócitos, células presentes na hemolinfa, sendo que na maioria dos insetos, a população de hemócitos circulantes é grande (LACKIE, 1981). As alterações celulares que acompanham o encapsulamento dos nematóides em vários insetos incluem proliferação de hemócitos, mobilização, diferenciação, degranulação, lise, adesão e coesão (NAPPI & CHRISTENSEN, 1987).

Os hemócitos foram estudados e classificados segundo suas funções. Os prohemócitos estão presentes em diferentes espécies de Diptera e sua freqüência é maior em larvas e pupas. Para LAI-FOOK (1973) são considerados como células-tronco que podem transformar-se em plasmatócitos e a ausência de expansões citoplasmáticas e grânulos sugere que essas células não possuem função de fagocitose (KAAYA & RATCLIFFE, 1982). No estudo destes mesmos autores, plasmatócito ovais e redondos foram as células mais comuns observadas em todos os dípteros e alguns eram capazes de se espalhar em superfícies de vidro, através de expansões citoplasmáticas longas.

Trombocitóides foram descritos por ZACHARY & HOFFMANN (1973) como células que se desintegravam em numerosos fragmentos anucleados de citoplasma e tendiam a aglutinar-se e formar uma rede, semelhante ao que acontece com as plaquetas em mamíferos. Em larvas e adultos, ZACHARY *et al.* (1975) descreveram como o único hemócito com capacidade de encapsular corpos estranhos, no caso foi feito implante de celofane nos insetos. ROWLEY & RATCLIFF (1976) observaram que em larvas estas células tinham grande capacidade fagocitária para bactérias.

Granulócitos foram descritos em todos os estágios do inseto como células comuns, frágeis, e na hemolinfa são evidenciadas como massas de grânulos liberados e de núcleos chanfrados. Adipohemócitos foram assim designados por FOLEY (1978) por apresentarem numerosos vacúolos intracitoplasmáticos, semelhantes a lipídios. GUPTA (1979) reconhece essas células como uma célula originária do granulócito. No estudo de KAAYA & RATCLIFFE (1982), encitoides foram encontrados apenas em mosquitos e em *Calliphora*, e como as células fusiformes possuem função desconhecida.

A melanização é um processo bioquímico que está presente em várias atividades biológicas do inseto como coloração da casca do ovo, da cutícula, reparação de descontinuidade dos tecidos e reação de encapsulamento por melanização. Como parte da resposta imunológica, a destruição de parasitas pelos insetos está, na maioria das vezes associada à produção e deposição de substância melanótica que efetivamente seqüestram o parasita (CHRISTENSEN & TRACY, 1989). CHRISTENSEN (1981) realizou estudos laboratoriais sobre resposta imune em exemplares de *Aedes (Ochlerotatus) trivittatus* Coquillett, 1902 infectados com *Dirofilaria immitis*. Observou que 41 dos 268 mosquitos infectados alimentados em um cão com dirofilariose apresentaram resposta imune, a qual foi mais evidente nos mosquitos que receberam grande número de microfílarias (21,9 larvas/mosquito). Os mosquitos que receberam 14,7 larvas, não apresentaram resposta imune significativa.

Apesar de haver melanização em todas as fases, foi no estágio de microfilária em que ela ficou mais evidente. Larvas que migraram através dos túbulos de Malpighi para a hemocele, foram completamente encapsuladas e melanizadas.

PYE & YENDOL (1972) demonstraram aumento na atividade da fenoloxidase em insetos inoculados com suspensão de bactérias. Fenoloxidasas são enzimas-chave na produção de material melanótico e sua importância na reação de encapsulamento por melanização foi confirmada em estudos de NAPPI *et al.* (1987) e LI & NAPPI (1992), que demonstraram elevada atividade da enzima na hemolinfa de mosquitos sob imuno-ativação (exposto a microfilária). Fenoloxidasas nos insetos incluem monofenoloxidase (tirosinase) e difenoloxidasas, estas para substratos como dopa, dopamina, N-B-alanyldopamina e N-acetildopamina.

NAPPI (1975) demonstrou que a dopa descarboxilase e a transacetilase estão envolvidas na produção de melanina e quinonas a partir da tirosina. Esta substância é o principal substrato na biossíntese de catecolaminas e quinonas, produzidas durante o desenvolvimento cuticular e em sua reparação (NAPPI & CHRISTENSEN, 1987). Tirosina e seus derivados, e enzimas como fenoloxidase, tem sido descritas como substâncias que participam na reação de encapsulamento por melanização por insetos contra parasitas que são muito grandes para serem fagocitados (CHRISTENSEN & TRACY, 1989; SHIAO *et al.*, 2001). NAPPI & CHRISTENSEN (1987) e LI *et al.* (1989) documentaram que as reações de encapsulamento com melanização estão associadas a um aumento evidente da atividade da fenoloxidase, e os hemócitos são fonte desta enzima (LI & NAPPI, 1992). Em 1990, MUNKIRS *et al.*, relataram em *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 imuno-ativado a presença de tirosina, dopamina e  $\beta$ -alanil-dopamina na hemolinfa, sem que houvesse alterações na concentração destas substâncias nos grupos controle e teste.

CHRISTENSEN & HUFF (1990) estudaram o efeito da radiação gama sobre a resposta imune de *Aedes aegypti* mediada por hemócitos desencadeada pela presença de microfilárias. Concluíram que a radiação gama externa não afetou significativamente a proliferação de hemócitos associados ao encapsulamento melanótico, mas comprometeu a atividade da monofenoloxidase, envolvida nos processos bioquímicos associados à produção de substâncias melanóticas que seqüestram microfilárias.

ZHAO *et al.* (1995) estudaram em *Armigeres (Armigeres) subalbatus* Coquillet, 1898 (Culicidae) infectados com *Brugia malayi* (Brug, 1927), os níveis de tirosina e seus derivados e também, de enzimas que atuam no metabolismo de catecolaminas durante a reação de encapsulamento por melanização contra microfilárias. Tirosina e dopa foram detectadas na hemolinfa tanto do grupo controle quanto do grupo imuno-ativado. Neste grupo, tirosina estava aumentada significativamente entre 6 e 12 horas após o repasto sangüíneo e dopa estava também aumentada em 6, 12 e 24 horas após a exposição à microfilária. Houve aumento da atividade da fenoloxidase e da dopa-descarboxilase, relacionadas com os níveis de tirosina e de dopa na hemolinfa.

Foi através de estudos ultraestruturais de encapsulamento de nematóides filarioides por mosquitos que se revelou a participação de hemócitos na resposta imune. Os túbulos de Malpighi das fêmeas adultas de *Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821) são compostos por dois tipos de células. As células primárias representam 80 a 85 % das células que revestem os túbulos. Possuem núcleos grandes e microvilosidades apicais volumosas que podem ou não conter mitocôndrias. O segundo tipo, são as células estreladas que possuem microvilosidades apicais pequenas e não contem mitocôndrias (BRADLEY *et al.*, 1982). As microvilosidades apicais são essenciais para o processo de secreção de urina. Nos insetos, ela é produto de transporte ativo de íons e água através das células que revestem o túbulo e as mitocôndrias devem prover de energia a bomba de íons nos vilos apicais (HARVEY, 1980). O

comprometimento das mitocôndrias nos vilos apicais está associado a uma cessação do transporte de íons e água, podendo resultar na morte do hospedeiro.

BRADLEY *et al.* (1984) realizaram o estudo ultraestrutural de túbulos de Malpighi de *Aedes taeniorhynchus* infectados experimentalmente com *Dirofilaria immitis*. As alterações patológicas nas células foram observadas apenas 24 e 48 horas após a infecção. Houve redução no volume das microvilosidades, da porcentagem do volume da microvilosidades ocupadas por mitocôndrias e do volume da própria mitocôndria. Nas primeiras 24 horas, as microfilárias invadiram as células primárias, permanecendo no citoplasma envoltas por uma zona clara, livres na substância fundamental, sem membrana limitante. Segundo TRAGER (1974) e BLOOM (1979), essa disposição dificulta a célula hospedeira de atingir o parasita com lisossomos. Além disso, o parasita está em contato direto com o citoplasma, meio rico em nutrientes dissolvidos, cujo transporte é transcuticular. Pela sua localização intracelular, o parasita é ainda protegido do complexo de enzimas fenoxidases, presentes nos hemócitos e parte do sistema imune do hospedeiro.

Freqüentemente numerosos fragmentos de material pigmentado, com diâmetros semelhantes ao de microfilárias pigmentadas podem ser vistos na hemocele de mosquitos infectados por filárias. CHEN & LAURENCE, (1985) demonstraram que esse material corresponde a bainhas de microfilárias encapsuladas, quando estudaram a infecção de *Aedes aegypti* linhagem suscetível e *Anopheles (Anopheles) quadrimaculatus* Say, 1824 com *Brugia pahagi* (Buckley and Edeson, 1956) após repasto em gato infectado. Para comparar, foram injetadas na hemocele de um grupo de fêmeas de *Anopheles quadrimaculatus*, microfilárias vivas e em outro grupo, fragmentos de bainhas pigmentadas de microfilárias. Neste último grupo houve contato de plasmatócitos com os fragmentos em 50 minutos após a infecção, estando totalmente encapsuladas entre 8 e 12 horas após. Por se um material inativo, o encapsulamento ocorreu mais rapidamente. No primeiro grupo essas células apareceram ao

redor das microfilárias vivas aproximadamente 2 horas após a inoculação. Seu encapsulamento não foi observado antes de 24 a 48 horas após a infecção, justificado pela atividade da microfilária na hemocele.

FORTON *et al.* (1985) estudaram ultraestruturalmente a resposta de melanização de *Aedes trivittatus* contra microfilárias de *Dirofilaria immitis* inoculadas intratoracicamente. A lise dos hemócitos e a melanização das microfilárias iniciaram imediatamente após a exposição na hemocele. A deposição inicial de melanina ocorreu aleatoriamente ao longo da superfície da microfilária e rapidamente aumentou de espessura. Não houve encapsulamento por hemócitos, mas podem ser necessários para a ativação da reação de melanização. Apesar de hemócitos intactos não serem abundantes, os presentes mostravam o que parecia ser secreção ativa de vacúolos limitados por membrana, em direção à microfilária, mas não apresentando contato direto. Três dias após a inoculação, houve deposição de membranas ao redor da microfilária melanizada e remanescentes de hemócitos, sugerindo que sua ocorrência é para fazer isolamento do material.

BRADLEY & NAYAR (1985) relataram os resultados da melanização intracelular de larvas de *Dirofilaria immitis* em túbulos de Malpighi de *Aedes (Ocherotatus) sollicitans* (Walker, 1856). Os resultados indicaram que a forma de deposição de melanina e as características ultraestruturais do pigmento ao redor do parasita são idênticas às aquelas observadas em nematóides que sofreram melanização humoral em outros dípteros. Nos túbulos de Malpighi, não foi observado contato entre a larva melanizada com a hemolinfa ou com hemócitos. Os resultados sugerem que os túbulos de Malpighi desta espécie de mosquito são capazes de induzir uma resposta melanótica para parasitas nematóides. Com este trabalho, os autores questionam ainda a razão da melanização de *Dirofilaria immitis* não ser observada com a mesma frequência em outras espécies de mosquitos e o motivo da existência de larvas melanizadas em alguns túbulos, enquanto que em outros não acontece isso.

CHRISTENSEN & FORTON (1986) realizaram estudo ultraestrutural da melanização de microfilária de *Dirofilaria immitis* inoculadas intratoracicamente em *Aedes aegypti* suscetível. A reação inicial foi lise de hemócitos na superfície da microfilária ou próximo a elas antes da deposição do pigmento. A formação da melanina pode ocorrer concomitante à lise de hemócitos, mas durante os estágios iniciais da reação, alguns hemócitos intactos apresentavam material eletrôn-denso intracitoplasmático, semelhante ao observado na superfície da microfilária. Muitos fragmentos celulares foram observados em sua superfície, juntamente com os depósitos de melanina. Em estágios mais avançados observaram-se estruturas semelhantes a membrana, dispostas ao redor do parasita, onde os depósitos de melanina e restos celulares estavam aumentados, eventualmente isolando a reação da hemolinfa. Há diferenças entre a capacidade imune de *Aedes aegypti* e de *Aedes trivittatus* em resposta à inoculação de microfilárias, mas a investigação ultraestrutural não foi capaz de informar as causas dessas diferenças (CHRISTENSEN *et al.*, 1984).

BRADLEY & NAYAR, em 1987, estudaram sob microscopia eletrônica de transmissão, fêmeas de *Anopheles quadrimacularus* infectadas com *Dirofilaria immitis* após repasto em cão contaminado. As células primárias dos túbulos de Malpighi desta espécie possuem grandes vilosidades apicais com numerosas mitocôndrias e caracterizam-se pela presença de concreções intracitoplasmáticas mineralizadas envoltas por membrana. Após invasão de túbulos de Malpighi, em 24 horas a microfilária localizava-se no citoplasma das células primárias, em uma zona clara sem membrana. Em muitos espécimes, as membranas das concreções estavam interrompidas.

TALLURI *et al.* (1993) realizaram um estudo ultraestrutural do desenvolvimento de *Dirofilaria repens* em túbulos de Malpighi de linhagens suscetível e resistente de *Aedes aegypti*. Observaram que, 24 horas após o repasto, a única diferença entre as linhagens foi a presença de numerosos ribossomos livres e mitocôndrias, além de retículo endoplasmático

granular mais evidente em células primárias de túbulos de Malpighi de linhagem resistente. Aos 13 dias, L3 foi observada no aparelho bucal apenas dos mosquitos da linhagem suscetível.

GUO *et al.* (1995) estudaram as alterações ocorridas nos hemócitos de *Armigeres subalbatus* infectados por *Brugia malayi* durante o encapsulamento com melanização. Houve redução significativa da população de hemócitos em 24 horas pós-infecção, voltando ao nível normal entre 48 e 72 horas. O nível de fenoloxidase estava evidentemente elevado em torno de 12 horas pós-infecção.

Existem proteínas plasmáticas da hemolinfa dos insetos que possuem atividade antibacteriana estudadas em linhagem celular de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) e em *Anopheles* (GWADZ *et al.*, 1989; COCIANCICH, 1994). Proteínas antimicrobianas específicas contra parasitas eucarióticos não foram relatadas, mas BEERNTSEN & CHRISTENSEN (1990) descreveram a presença do polipeptídeo 84-kDa diferenciado na hemolinfa de *Aedes aegypti* durante o processo de encapsulamento com melanização de microfilárias.

Os estudos incrementados na década de 1970 sobre as células da hemolinfa de artrópodes foi o ponto de partida que permitiu a compreensão dos mecanismos básicos de defesa contra agentes patogênicos. Através de estudos ultraestruturais desenvolvidos principalmente nos anos de 1980 foi dada ênfase à relação entre os hemócitos e a melanização de parasitas nematóides, enfocando as filárias, principalmente *Dirofilaria immitis*. Na década de 1990 os estudos têm demonstrado proteínas presentes na hemolinfa, com capacidade antibacteriana. Ao longo dos anos tem sido acrescentados conhecimentos que permitem estar mais próximos do entendimento da suscetibilidade ou resistência dos potenciais vetores.

#### **1.4 Potenciais vetores de *Dirofilaria immitis***

A subfamília *Culicinae* conta com aproximadamente 1700 espécies distribuídas em mais de 20 gêneros, sendo que dois terços destes pertencem aos gêneros *Aedes* e *Culex*, e dentre estes, várias espécies são importantes para a saúde pública.

Nos Estados Unidos LUDLAM *et al.* (1970) reuniram em uma tabela os resultados dos diferentes estudos realizados até então sobre os mosquitos transmissores da *Dirofilaria* canina em diferentes partes do mundo. Relacionaram 64 espécies nas quais foram encontradas larvas completamente desenvolvidas. A maioria dos dados refere-se a infecções experimentais, havendo poucos casos de mosquitos com larvas infectantes capturados em seu ambiente natural.

No Brasil infecções experimentais com *Dirofilaria immitis* tiveram sucesso com *Aedes* (*Ochlerotatus*) *scapularis* (Rondani, 1848) (MACEDO *et al.*, 1998), *Culex quinquefasciatus* (BRITO *et al.*, 1999), *Culex quinquefasciatus* de cinco regiões diferentes do país (AHID *et al.*, 2000) e *Aedes aegypti* população Rio de Janeiro (SERRÃO, 2001), demonstrando que estas espécies são potenciais vetores de *Dirofilaria*. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE (1995) ao estudarem a ecologia de mosquitos do Estado do Rio de Janeiro, encontraram larvas L3 ativas em túbulos de Malpighi de *Aedes taeniorhyncus* e em *Aedes scapularis*, presumindo serem formas evolutivas de *Dirofilaria immitis*. Este seria o único relato de infecção natural nestas espécies no Brasil.

#### **1.4.1 *Culex quinquefasciatus* como potencial vetor de *Dirofilaria***

O culicídeo *Culex quinquefasciatus* é tido como cosmotropical por distribuir-se tanto em regiões urbanas quanto tropicais e neotropicais. Nas Américas estende-se desde as partes Central e Sul dos Estados Unidos até a Argentina. No Brasil esta espécie está disseminada em praticamente todos os centros urbanos, em geral associada a condições precárias de saneamento, principalmente no que diz respeito a águas residuais (URBINATTI *et al.*, 2002). Constitui uma espécie de grande importância na saúde pública e sanidade animal, responsável

pela veiculação de patógenos como poxvirus aviário, *Brugia malayi* ao homem e gatos, vírus St. Louis e *Wuchereria bancrofti* ao homem, *Plasmodium cathemerium* Hartman, 1927 aos pássaros e *Dirofilaria immitis* aos cães (VIANNA *et al.*, 1996). É considerado em regiões neotropicais como o mais eficiente vetor da filaria bancroftiana ao homem. O contato antropofílico prolongado das fêmeas permite a migração das formas larvais infectantes através da probóscide do vetor para a pele do hospedeiro (FORATTINI, 2002).

Este mosquito se apresenta adaptado ao ambiente humano e em todas as fases de sua vida mantém-se relacionado com o homem tanto no meio urbano como no rural. Suas formas imaturas adaptaram-se ao desenvolvimento em água poluídas que fornecem os alimentos aos vários estádios larvais. Os criadouros tanto do ambiente domiciliar como peridomiciliar são os mais variados, constituídos de recipientes artificiais e pequenas coleções de águas de baixa movimentação ou paradas no solo. Desta forma os criadouros típicos são representados por coleções de águas altamente poluídas, com abundante matéria orgânica e protegidos da exposição solar. Os adultos têm hábitos essencialmente noturnos e freqüentam de maneira assídua os domicílios para abrigo e repasto e são considerados como mosquitos de baixa exofilia e elevada endofilia. Os abrigos diurnos caracterizam-se por escassez ou ausência de luz e existência de certos graus de temperatura e umidade (FORATTINI, 2002).

No que concerne às preferências sangüíneas, *Culex quinquefasciatus* possui algum ecletismo. Para alguns pesquisadores possui acentuada antropofilia, não se descartando a presença de ornitofilia e mesmo de saurofilia (FORATTINI *et al.*, 1987; CASTEX *et al.*, 1990). Na Argentina, ALMIRON & BREWER (1995) estudaram a preferência de culicídeos por sangue de quatro vertebrados diferentes: sapos, galinhas, coelhos e tartarugas. Observaram que *Culex quinquefasciatus* alimentava-se preferencialmente em galinhas, coelhos e tartarugas. No sul da Índia, SAMUEL *et al.* (2004) estudaram o hábito alimentar de *Culex quinquefasciatus* e *Mansonia (Masonioides) annulífera* (Theobald, 1901), dois grandes vetores de filaria na região.

Os resultados mostraram que ambos são altamente antropofílicos, sendo identificado sangue humano em 74% e 66% dos espécimes coletados, respectivamente. Em áreas endêmicas é um fator a ser considerado na persistência da doença. A atividade hematófaga é noturna, inicia-se no crepúsculo vespertino e alcança valores máximos de atividade após as 22 horas, para decrescer gradualmente até a chegada do crepúsculo matutino. Normalmente as fêmeas grávidas são encontradas próximo a criadouros, enquanto que as recentemente ingurgitadas o são nos domicílios (FORATTINI, 2002).

O mosquito *Culex quinquefasciatus* que possui forte tendência a ornitofagia, parece ter apenas recentemente se adaptado aos mamíferos e pode não ter desenvolvido mecanismos eficientes para bloquear a resposta das plaquetas dos mamíferos, enquanto que as aves possuem trombócitos relativamente ineficientes. RIBEIRO (2000) comparou o tempo de procura por sangue intradermal de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann, 1820. Os dois últimos gêneros parecem ter uma associação com mamíferos desenvolvida ao longo da evolução. O autor supracitado observou que *Culex* demora muito mais tempo para encontrar o sangue no homem e no rato que os dois outros gêneros, enquanto que quando em contato com galinha este tempo diminui sensivelmente.

O sangue é o principal nutriente da fêmea de *Culex quinquefasciatus* para a evolução do ciclo gonotrófico. Sua digestão envolve a ação de enzimas proteolíticas, a absorção dos produtos de digestão pelo epitélio do intestino médio e seu transporte para a hemolinfa (OKUDA *et al.*, 2002). Devido a hábito da hematofagia, as fêmeas de mosquitos são vetores de importantes patógenos tanto ao homem quanto aos animais, pois seu intestino está exposto ao ambiente externo. Os agentes patogênicos são ingeridos com o sangue e os processos digestivos no intestino médio do vetor podem influenciar em seu desenvolvimento. OKUDA *et al.* (2002) estudaram a morfologia funcional do intestino médio de fêmea adulta de *Culex*

*quinquefasciatus* durante o repasto. Eles observaram que a morfologia era muito similar à de outros Culicidae. As duas regiões distintas, uma porção anterior e estreita era situada no tórax, e uma porção posterior dilatada localizava-se no abdômen. Na luz, a flora bacteriana se mantinha mesmo com a digestão do sangue. Internamente era revestido por monocamada de células epiteliais com microvilosidades. Quando sem conteúdo a luz da porção anterior apresentava o epitélio com espessura irregular; a porção posterior possuía o epitélio com aparência regular, separado das camadas circular e longitudinal de células musculares pela lâmina basal multilaminar e estriada. Traquéolas envolviam ambas as porções do intestino médio. As células colunares do intestino médio eram unidas por junções intercelulares e junções *gap* na região apical. A membrana nesta região continha numerosas microvilosidades, enquanto que a membrana lateral possuía numerosas invaginações sem apresentar junções intercelulares. O núcleo das células colunares era volumoso, ovalado, com nucléolo central e proeminente. Sob microscopia eletrônica de transmissão, os autores observaram que existiam numerosas mitocôndrias tanto na região basal quanto apical da célula, entremeadas com ribossomos livres e retículo endoplasmático granular. Em mosquitos não alimentados, células do intestino posterior possuíam na porção supranuclear áreas delimitadas e claras, lembrando lisossomos, sendo envolvidas por mitocôndrias.

Após a ingestão do sangue, a alteração mais evidente observada era a distensão do intestino médio posterior. As células digestivas com padrão colunar, com aproximadamente 25 $\mu$ m de altura no mosquito não alimentado, distendiam-se lateralmente após o repasto, passando a medir 2,5 $\mu$ m, adquirindo a forma cubóide. Aparentemente a distensão era causada por redução da densidade das microvilosidades e estiramento da membrana basal. Havia estreitamento dos espaços intercelulares sem alterações das respectivas junções. As células da porção anterior do intestino médio mantinham seu padrão colunar. Poucos minutos após a ingestão, os eritrócitos eram retidos no coágulo e a parte líquida (soro) deslocada para a

periferia do bolo alimentar, separado em duas zonas claramente visíveis até 18 horas após o repasto, quando ocorria o desaparecimento do soro, levando à redução do conteúdo e da distensão do intestino médio, voltando o epitélio da porção posterior ao padrão colunar anterior. Numerosas vesículas e corpos multivesiculares estavam presentes entre as mitocôndrias apicais nas células epiteliais de ambas as regiões. A membrana peritrófica era evidente na porção posterior do intestino médio após 12 horas do repasto. A digestão do sangue foi completada após 72 horas do repasto, e neste período foi observada descamação celular na luz intestinal (OKUDA, 2002). ROMOSER *et al.* (2000) constataram que a membrana peritrófica está sempre presente em *Culex*, enquanto sua ocorrência é variável em *Aedes*.

Estudos experimentais colocam *Culex quinquefasciatus* como um vetor secundário de *Dirofilaria*. LOWRIE (1991) estudou a eficiência de duas cepas geograficamente distintas de *Culex quinquefasciatus* como vetores de *Dirofilaria immitis* comparativamente a uma cepa de *Aedes taeniorhynchus*. Quando as duas cepas de *Culex* foram alimentadas com sangue de cão com 110 microfilárias/20 µl observou-se que 1,2% e 0,3% dos mosquitos respectivamente desenvolveram L3 de *Dirofilaria immitis*. Na concentração de 400 microfilárias/20 µl de sangue este índice foi de 1,6% e 0,5%. Na infecção de *Aedes taeniorhynchus* com as mesmas concentrações de microfilárias, observou-se que 20% e 31,5% dos mosquitos respectivamente desenvolveram larvas L3. A baixa infecção de *Culex* seria justificada pela formação de cristais de oxihemoglobina no intestino médio, que começa a acontecer 15 minutos após o repasto estando 75% do sangue ingerido cristalizado em 1 hora. Esses cristais impediriam a migração das microfilárias para os túbulos de Malpighi. O autor comenta ainda que nunca observou a formação de cristais quando *Culex quinquefasciatus* ingeria sangue humano, de macaco ou de cobaia. Há a lise apenas de eritrócitos do cão, desconhecendo os fatores que poderiam estar envolvidos. Neste mesmo estudo o autor atribuiu à armadura cibarial robusta de *Culex*, o dano em 12 % das microfilárias de *Dirofilaria immitis* enfatizando que a baixa eficiência desta

espécie como vetor deste parasita estaria mais relacionada à formação de cristais de oxihemoglobina no sangue ingerido. Estudos anteriores de McGREEVY *et al.* (1978) reportaram que a armadura cibarial robusta de *Culex quinquefasciatus* causou dano e matou apenas 6% das microfilárias de *Wuchereria bancrofti* ingeridas.

BRITO *et al.* (1999) pesquisaram experimentalmente a suscetibilidade de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* provenientes da região de Maceió, Brasil à infecção por *Dirofilaria immitis*. Larvas L3 foram observadas em ambas as espécies, mas ficou demonstrado que *Aedes aegypti* é sete vezes mais eficiente como vetor do que *Culex quinquefasciatus*. Em 2000, os mesmos autores detectaram 3,1% de cães positivos para *Dirofilaria immitis* em uma população canina de Maceió, no nordeste do Brasil. Fêmeas de *Culex quinquefasciatus* foram alimentadas de forma artificial com sangue de cães positivos que continham aproximadamente 560 microfilárias/ml e após 15 dias, larvas L3 foram isoladas de túbulos de Malpighi, confirmando a competência vetora desta espécie para a *Dirofilaria*.

Outro estudo experimental foi conduzido por LAI *et al.* (2000) onde alimentaram *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* com sangue canino contendo 2500 a 25000 microfilárias/ml. Em *Aedes albopictus* o número de larvas que se desenvolveram foi maior, sendo maior também a mortalidade das fêmeas ingurgitadas desta espécie. No caso das densidades maiores, a mortalidade de ambas as espécies foi igual. *Aedes albopictus* mostrou-se mais eficiente como vetor, mas seu tempo de sobrevivência foi reduzido. Cães com baixa filaremia são as principais fontes de infecção para os mosquitos destas espécies.

AHID *et al.* (2000), estudaram no Brasil, cinco populações diferentes de *Culex quinquefasciatus*, que foram capazes de desenvolver *Dirofilaria immitis* até o estágio infectivo. A eficiência como vetor e o número de microfilárias infectantes foram baixos, demonstrando ser essa espécie um vetor secundário. Mas os autores consideram que a suscetibilidade desta espécie pode variar entre as populações devido às diferenças na frequência de repasto sobre a

população canina. Por estar presente o ano todo conforme a região do país, a frequência de hematofagia na população canina pode ser maior, aumentando a oportunidade de infecção. Tendo em vista o caráter antropofílico desta espécie, o homem pode vir a tornar-se hospedeiro ocasional da dirofilariose (AHID & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999).

No período de março de 1995 e fevereiro de 1996, LABARTHE *et al* (1998) realizaram captura de 21 espécies de mosquitos na região de Niterói, área com alta prevalência de dirofilariose, usando como iscas o ser humano, o cão e o gato, o qual mostrou-se menos atrativo aos mosquitos. As quatro espécies mais frequentes foram *Aedes taeniorhyncus*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes scapularis* e *Culex (Culex) declarator* Dyar & Knab, 1906, considerados como vetores potenciais da doença em áreas endêmicas.

No Paraná, SILVA *et al.* (2003) estudaram a fauna de Culicidae e a identificação de prováveis vetores naturais de filariose canina em área enzoótica de Guaratuba, no litoral paranaense. Foram identificadas 1086 fêmeas dos gêneros *Culex spp.*, *Aedes spp.*, *Mansonia spp.*, *Psorophora spp.*, e *Uranotaenia spp.* Outras 454 fêmeas foram dissecadas para investigar a presença de microfilárias, sendo negativo o resultado para vetores naturalmente infectados. *Culex quinquefasciatus* foi predominante em número de exemplares de todas as coletas e por seu elevado grau sinantrópico, esta espécie pode ser tida como mosquito suspeito de estar envolvido na transmissão de *Dirofilaria immitis*.

Na zona oeste do Rio de Janeiro onde, em 1990, 31% dos cães estavam parasitados, COSTA *et al.* (2004) realizaram uma pesquisa da fauna de culicídeos e atualização da prevalência da dirofilariose em duas populações caninas: uma não assistida por médicos veterinários e outra regularmente assistida por esses profissionais, a qual recebeu a medicação preventiva durante 12 meses. A prevalência da infecção canina por *Dirofilaria immitis* detectada por teste imunoenzimático foi de 1,9% na população não assistida e nenhum cão positivo foi encontrado entre aqueles regularmente assistidos. Os autores creditam o

declínio evidente da prevalência da dirofilariose canina na região ao uso sistêmico da medicação preventiva. Entre os vetores eficientes na região, foram capturados em baixa frequência *Aedes scapularis*, considerado vetor primário para cães, *Culex quinquefasciatus*, vetor secundário para cães e primário para gatos e *Aedes taeniorhynchus*.

### **1.5 Animais suscetíveis ao desenvolvimento de *Dirofilaria immitis***

O cão é o mamífero infectado comumente por *Dirofilaria immitis* e é considerado o reservatório significativo da infecção. Nas áreas onde a infecção é enzoótica no cão, outros mamíferos podem tornar-se infectados, como gatos domésticos e selvagens, coiotes, raposas, lobos, ferrets, leões marinhos, eqüinos e mais raramente o ser humano (JUBB *et al.*, 1993).

Com o deslocamento constante de animais entre diferentes regiões geográficas muitos parasitas são disseminados e introduzidos em ambientes que possuem condições para o seu desenvolvimento, podendo vir a tornar-se enzoóticos.

O gato é um hospedeiro definitivo inadequado. A dirofilariose felina é doença de distribuição geográfica cosmopolita, embora menos freqüente que a canina, mesmo em áreas endêmicas. Existem numerosos relatos da ocorrência da infecção felina, embora a maioria sejam casos isolados. No Japão gatos infectados podem ser encontrados por todo o país, com prevalência de até 7%. Na Itália há variação de 3 a 23 %, dependendo da região. Nos Estados Unidos a prevalência é entre 1,1 e 16%. Também na Austrália, Venezuela, Canadá foram relatados casos de dirofilariose em gatos. No Brasil foi descrita em 1921. Em geral o gato parasitado possui menos de seis parasitas adultos, atingem tamanho menor que nos cães e possuem a vida mais curta. O período pré-patente é maior que nos cães, em torno de oito meses e apenas 50% dos gatos infectados desenvolvem a doença (SCHREY & TRAUTVETTER, 1998; ALMOSNY *et al*, 2002).

Os gatos são mais resistentes, desta forma exigindo um nível de exposição mais alto para o desenvolvimento de infecções por parasitas adultos. Para que isso aconteça, há a

necessidade de um reservatório, geralmente um cão positivo para microfilárias, temperatura ambiente relativamente elevada em que L3 possa desenvolver-se e o mosquito suscetível que se alimente primeiro em um cão e depois em um gato (DILLON, 2001). Em um estudo experimental realizado por MANSOUR *et al.* (1996) a infecção com 100 larvas L3 resultou no desenvolvimento de 60 a 75 vermes adultos em 90% dos cães e em apenas 3 a 10 vermes adultos em cerca de 75% dos gatos. O risco para os gatos está em áreas endêmicas, onde tem maior probabilidade de sofrerem picadas repetidas por mosquitos infectados em um período de 2 a 3 meses. Até nove parasitas adultos podem ser encontrados em infecções espontâneas no gato, enquanto que no cão pode chegar a 150. No Rio de Janeiro, LABARTHE *et al.* (1998), examinaram 125 gatos através de testes laboratoriais e exames anatomopatológicos, e encontraram apenas um animal portador de um exemplar de *Dirofilaria immitis* localizado no lobo pulmonar direito, o qual apresentava hipertrofia severa da camada muscular de artérias e arteríolas pulmonares. Não foram observadas microfilárias no sangue de nenhum dos gatos examinados. A prevalência do mesmo parasita em cães da mesma área era de 12% aproximadamente. Em um estudo anatomopatológico de 184 gatos na Geórgia, Estados Unidos, CARLETON & TOLBERT (2004) encontraram espécimes de *Dirofilaria immitis* adultos em apenas quatro animais. Demonstraram que a prevalência da dirofilariose felina na região é baixa, mas próxima à de regiões com topografia semelhante.

O diagnóstico da doença no gato é difícil porque a microfilaremia raramente é observada, o que o exclui como reservatório de larvas infectantes. A periodicidade de microfilárias de *Dirofilaria immitis* foi estudada por NOGAMI *et al.* (2000). Os gatos foram infectados com formas adultas imaturas com 120 dias de idade. As microfilárias apareceram no sangue após 98 dias da implantação e o horário de maior densidade foi entre 1:00 e 3:00, caracterizando a periodicidade como noturna sub-periódica. HAYASAKI *et al.* (2003) observaram a variação diurna da microfilaremia em quatro gatos infectados experimentalmente

com 100 a 123 larvas de *Dirofilaria immitis*. Somente um gato desenvolveu microfíliar e observou-se o número máximo no período noturno. Ao exame necroscópico, neste animal foram encontrados dez parasitas adultos. O antígeno do parasita normalmente está bem abaixo dos níveis médios e as alterações radiológicas e os parâmetros das análises do sangue são sutis e inespecíficos. No diagnóstico diferencial devem ser consideradas as infecções por parasitas pulmonares. Em 1996, Heska Corp. introduziu no mercado o teste ELISA para pesquisa de anticorpo circulante específico para gatos.

DeFRANCESCO *et al.* (2001) realizaram um estudo retrospectivo de doze anos em 43 gatos com infecção por *Dirofilaria immitis*, com o objetivo de determinar a utilidade da ecocardiografia no diagnóstico da dirofilariose comparando com outros testes, como radiografia do tórax, pesquisa de anticorpo e pesquisa de antígeno. Em dezessete dos 43 gatos observaram-se parasitas adultos através da ecocardiografia, a maioria em artérias pulmonares. Em 22 gatos submetidos a todos os testes citados, o teste antígeno foi positivo em 12 e o teste de anticorpo em 18. Dilatação evidente de artérias pulmonares detectadas através do exame radiográfico e presença de parasitas adultos através de ecocardiografia foram observados em 14 animais. Em cinco gatos negativos no teste antígeno a infecção foi diagnosticada exclusivamente pelo ecocardiograma.

Na dirofilariose crônica do gato, a síndrome caval é uma séria complicação, caracterizada por anorexia, dispnéia, fraqueza, anemia, hemoglobinúria, disfunção hepática e renal, falência cardíaca e às vezes, coagulação intravascular disseminada. A migração dos parasitas adultos das artérias pulmonares, para o ventrículo e átrio direitos e veia cava causa lesão na válvula tricúspide. A insuficiência valvular reduz o débito cardíaco, há hemólise na passagem do sangue pelos parasitas levando a altos índices de mortalidade. Morte súbita pode ocorrer por tromboembolismo (STRICKLAND, 1998; SCHEREY & TRAUTVETTER,

1998). CORNEGLIANI *et al.* (2003) descreveram dois casos de lesões nodulares cutâneas causadas por *Dirofilaria immitis* em gatos provenientes em área endêmica no norte da Itália.

Além do cão e do gato, existem registros do parasita em outras espécies domésticas. KLEIN & STODDART (1977) relataram a presença de *Dirofilaria immitis* em um eqüino (*Equus caballus* Lynnaeus, 1758). Quatro parasitas adultos estavam nas veias pulmonares e um no ventrículo direito do coração. THURMAN *et al.*(1984) diagnosticaram arteriosclerose em um eqüino quarto-de-milha, macho, de 20 meses de idade, causada por parasitas adultos de *Dirofilaria immitis*. Este animal também apresentou endoarterite proliferativa em vasos pulmonares, lesão típica observada em cães com dirofilariose.

Também os animais selvagens são suscetíveis à infecção por *Dirofilaria immitis* e vários relatos foram feitos em animais de vida livre e em cativeiro. STARR & MULLEY (1988) examinaram o coração e os pulmões de 32 dingos (*Canis familiaris dingo* Lynnaeus, 1758) na Austrália e 18 deles apresentavam infecção por *Dirofilaria immitis*, variando de um a 31 exemplares por animal. Em sete animais, os parasitas eram de um único sexo. A microfilaremia era alta nos dingos infectados por parasitas de ambos os sexos.

Na Espanha, CORTAZAR *et al.* (1994) determinaram a prevalência de *Dirofilaria immitis* entre 433 raposas vermelhas (*Vulpes vulpes* Desmarest, 1820), havendo 46 delas positivas, nas quais foram encontradas de um a 36 parasitas por hospedeiro. Uma pesquisa na Austrália por MARKS & BLOOMFIELD (1998) em 125 animais desta mesma espécie revelou que oito raposas vermelhas eram positivas e seis delas apresentavam microfilaremia. Em um estudo sobre a infecção por helmintos em 47 lobos (*Canis lupus* Lynnaeus, 1758)), residentes no noroeste da Espanha, SEGOVIA *et al.* (2001) isolaram *Dirofilaria immitis* em 2,1% dos animais examinados.

Em uma raposa cinzenta fêmea (*Urocyon cinereoargenteus* Schreber, 1775) encontrada morta em ambiente natural nos Estados Unidos foram encontrados 11 exemplares adultos de

*Dirofilaria immitis* no átrio e ventrículo direitos, artérias pulmonares e pulmão. As lesões microscópicas descritas nos respectivos órgãos eram compatíveis com dirofilariose (CARLSON & NIELSEN, 1983). Examinando corações e pulmões de 293 coiotes (*Canis latrans*), 85 raposas vermelhas e 70 raposas cinzentas, WIXSOM *et al.* (1991) observaram que a prevalência de *Dirofilaria immitis* difere em espécie selvagens de canídeos que convivem dentro de uma mesma área e durante o mesmo período. Observaram um a cem exemplares em 19 coiotes, um a sete exemplares do parasita em cinco raposas vermelhas, enquanto que em raposas cinzentas não foram encontrados espécimes deste parasita. Na Califórnia, Estados Unidos, SACKS & CASWELL-CHEN (2003) determinaram que a infecção por *Dirofilaria immitis* é enzoótica para cães e coiotes.

Em racoon (*Procyon lotor* Lynnaeus, 1758), SNYDER *et al.* (1989) isolaram no Alabama, EUA, dois exemplares fêmeas imaturas de *Dirofilaria immitis* no coração. Outra espécie de racoon (*Nyctereutes procyonoides viverrinus* Temminck) também é suscetível a dirofilariose. No Japão, NAKAGAKI *et al.* (2000) realizaram o exame necroscópico de 75 destes animais e em oito deles foram observados exemplares de *Dirofilaria immitis*. Em uma fêmea adulta existiam microfíliárias no útero.

Em uma lontra (*Lontra longicaudis* Olfers, 1818) macho em cativeiro na Coréia do Sul que veio à óbito por congestão pulmonar severa, foram encontrados no ventrículo direito, dois exemplares, um macho e uma fêmea de *Dirofilaria immitis*. Apesar de terem sido observadas microfíliárias no útero do parasita, não foram encontradas no sangue circulante (MATSUDA *et al.*, 2003).

Em três leões marinhos (*Zalophus c. californiatus* Lesson, 1828) adultos capturados na Califórnia e mantidos em cativeiro na Flórida, área enzoótica de dirofilariose, foram encontrados vários exemplares de *Dirofilaria immitis* no coração. Um dos animais apresentava trombose e arterite de artéria pulmonar, e congestão e fibrose hepática resultante da

insuficiência cardíaca direita (FORRESTER *et al.*, 1973). Em uma foca (*Phoca vitulina* Lynnaeus, 1758) de cinco anos de idade foram encontrados 90 parasitas adultos de *Dirofilaria immitis* distribuídos no ventrículo direito, artéria pulmonar, veia porta, no saco pericárdico e na cavidade peritoneal. Microfilárias não haviam sido encontradas em exame hematológico realizado seis meses antes (MEDWAY & WIELAND, 1975).

Examinando macroscopicamente o macho adulto de um casal de pandas vermelhos (*Ailurus fulgens* Cuvier, 1825) em cativeiro no Zoológico de Houston, Estados Unidos, HARWELL & CRAIG (1981) encontraram um parasita no ventrículo direito e outro na veia cava caudal. A fêmea panda foi submetida a vários testes laboratoriais para microfilárias que resultaram negativamente.

Em 1997, MARANHO *et al.*, constataram que a espécie *Arctocephalus australis* Zimmermann, 1783 (Lobo marinho sul-americano) pode ser hospedeiro ocasional de *Dirofilaria immitis*. Este animal foi reabilitado e vivia em cativeiro em Santos, SP, região enzoótica do parasita e manteve contato direto por 60 dias com um cão, potencial portador.

A migração e desenvolvimento de *Dirofilaria immitis* em ferret (*Mustela putorius furo* Lynnaeus, 1758) foi estudada experimentalmente por SUPAKORNDEJ *et al.* (1994). Após inoculação subcutânea de 60 larvas infectantes, entre 119 e 140 dias todos os parasitas inoculados estavam no coração dos animais, atingindo o tamanho do parasita adulto aos 140 dias. Devido à popularidade do ferret como animal de estimação nos Estados Unidos, McCALL (1998) realizou estudos laboratoriais que demonstraram ser esta espécie altamente suscetível a dirofilariose, semelhante ao que acontece nos cães. Em 2000, SASAI *et al.* descreveram a doença em uma fêmea de ferret de 14 meses de idade com anorexia e dispnéia. O exame ecocardiográfico revelou a presença de parasitas adultos nas cavidades atrioventriculares direitas. Durante a necropsia, três fêmeas e um macho de *Dirofilaria immitis* foram encontrados no coração direito, veia cava caudal e cranial.

Os felinos selvagens também são suscetíveis ao desenvolvimento da dirofilariose. Na Califórnia, Estados Unidos, PAUL-MURPHY *et al.*(1994) examinaram o soro de 22 leões-da-montanha (*Felis concolor* Lynnaeus, 1758) e encontraram apenas um deles positivo para o antígeno somático de *Dirofilaria immitis*. Na Flórida, DEEM *et al.* (1998) observaram ao exame necroscópico de uma fêmea de *Felis nigripes* Burchell, 1824, com seis anos de idade, exemplares de *Dirofilaria immitis*, em conjunto com glomerulonefrite e endometrite.

Na Índia, GUPTA *et al.* (1999) relataram o achado acidental de *Dirofilaria immitis* no ventrículo direito e ramos de artéria pulmonar de dois leões (*Panthera leo* Lynnaeus, 1758 ) e em um tigre (*Panthera tigris* Lynnaeus, 1758), em cativeiro, os quais apresentavam convulsões, dispnéia, emaciação e fraqueza.

ZAHEDI *et al.* (1986) descreveram um caso de infecção dupla de *Brugia pahangi* e *Dirofilaria immitis* em um leopardo cinzento (*Neofelis nebulosa* Griffith, 1821). Três parasitas adultos de *Dirofilaria immitis* foram detectados no ventrículo direito e na artéria pulmonar em uma fêmea em cativeiro de leopardo da neve (*Uncia uncia* Schereber, 1775) no Japão. O óbito do animal foi conseqüente ao desenvolvimento de um carcinoma pancreático e não havia apresentado sintomas cardio-respiratórios típicos da dirofilariose. A identificação do parasita baseou-se na análise do DNA mitocondrial (MURATA *et al.*, 2003). No Texas, Estados Unidos, entre 1987 e 1998, foi realizada pesquisa para helmintos em 15 jaguatiricas (*Leopardus pardalis* Lynnaeus, 1758). Dentre os diferentes gêneros dos parasitas, *Dirofilaria immitis* foi observado em um dos animais (PENCE *et al.*, 2003).

Em 1982, BASKIN & EBERHARD relataram um caso de infecção espontânea de *Dirofilaria immitis* em um macaco rhesus (*Macaca mulatta* Zimmermann, 1780) com presença de um exemplar imaturo em ventrículo direito e arterite granulomatosa eosinofílica em artéria pulmonar. Em Dallas, Estados Unidos, o exame sorológico de um macaco de cabeça branca (*Pithecia pithecia* Lynnaeus, 1758) de 6 anos de idade reagiu positivamente ao teste para

antígeno de *Dirofilaria immitis* adulto. Através da ultra-sonografia sugeriu-se o diagnóstico de dirofilariose aberrante, e em áreas onde o parasita é enzoótico, é uma doença a ser considerada em primatas não humanos com doença cardiopulmonar (GAMBLE *et al.*, 1998).

Em lebre (*Lepus brachyurus angustidens* Lynnaeus, 1758), OYAMADA *et al.* (1995) relataram o primeiro caso no Japão de *Dirofilaria immitis* com localização pulmonar em um trombo arterial, sendo um parasita macho e outro fêmea jovens. Coelhos foram utilizados como modelo experimental de dirofilariose pulmonar humana. Inoculou-se no tecido subcutâneo exemplares de *Dirofilaria immitis* imaturos para induzir dirofilariose pulmonar, cujas lesões de arterite e periarterite de vasos pulmonares foram semelhantes àsquelas observadas no ser humano (SATO *et al.*, 1994).

#### **1.6 A dirofilariose no ser humano**

Infecções humanas por *Dirofilaria immitis* tem sido relatadas na literatura como casos isolados, com poucos estudos epidemiológicos até hoje. Em 1887, DE MAGALHÃES relatou o primeiro caso de infecção humana por *Dirofilaria* em um menino no Rio de Janeiro. Nos Estados Unidos, FAUST *et al.* (1952) foram os primeiros a relatar infecção por *Dirofilaria* em uma mulher em New Orleans e em 1961, o primeiro caso humano com envolvimento pulmonar foi relatado por DASHIELL.

A larva de *Dirofilaria immitis* não se desenvolve até sua forma adulta no ser humano. As infecções humanas são causadas por um único parasita e de modo excepcional por dois (ACHA & SZYFRES, 1986). A dirofilariose pulmonar desenvolve-se quando a larva não sobrevive, e como êmbolo localiza-se em ramos de artérias pulmonares, liberando antígenos, os quais produzem endoarterites e conseqüentemente infarto pulmonar. Não há relato da presença de microfíliarias circulantes no ser humano, apesar de terem sido encontrados casos de parasitas imaturos vivos no sangue e tecido subcutâneo. Por ter seu desenvolvimento

interrompido quando está no ser humano, a transmissão de homem para homem não ocorre (MRUGESHKUMAR, 1999).

A dirofilariose pulmonar causada por *Dirofilaria immitis* é uma zoonose que representa um problema médico, uma vez que produz sintomas que podem confundir com aqueles causados por neoplasias, o que leva a necessidade de submeter pacientes à cirurgia torácica desnecessária, apesar da maioria dos indivíduos infectados ser assintomática. Os granulomas subpleurais formados podem induzir a diagnósticos equivocados como neoplasias primárias ou metastáticas em exames radiográficos do pulmão (RO, 1989; RODRIGUES-SILVA *et al.*, 1995). Nos casos sintomáticos observa-se tosse e dor torácica durante um mês ou mais, às vezes acompanhada de hemoptise, febre, calafrio e mialgia. Somente em dois casos nos EUA e em um caso no Brasil foi encontrado o parasita no coração direito, sendo que nos demais casos humanos o parasita se alojava em um lobo do pulmão direito, ocluindo parcialmente uma pequena artéria onde formava um trombo. Em todos os casos pulmonares se encontraram os parasitas mortos e quase sempre em estados de degeneração (ACHA & SZYFRES, 1986). Em 1981, TAKEUCHI *et al.* observaram que até então haviam sido diagnosticados 80 casos humanos de dirofilariose pulmonar, a maioria na região sudeste dos Estados Unidos. Vinte dos casos foram registrados na Austrália e 10 casos no Japão. RO *et al.* (1989) realizaram um estudo clinicopatológico de sete casos humanos de dirofilariose pulmonar e foram analisados em conjunto com outros 76 casos nos Estados Unidos. A doença foi adquirida nos estados ao longo da costa do Atlântico e do Golfo e ocorreu predominantemente em indivíduos brancos (94,7%), entre 50 e 60 anos, na proporção de dois homens para cada mulher. Os sintomas mais comuns como tosse, dor, hemoptise esteve presente em 37,6 % dos pacientes. Eram assintomáticos 62,4% deles, cuja doença foi descoberta de forma acidental em exames radiográficos de rotina ou durante investigação de outros problemas. Nos exames radiográficos observaram-se nódulos pulmonares únicos (89,8%) ou múltiplos (10,2%), simulando

neoplasias pulmonares primárias ou metastáticas. Dirofilariose não foi incluída como diagnóstico diferencial em nenhum dos casos estudados.

Nos Estados Unidos NICHOLSON *et al.*(1992) identificaram cinco pacientes com infecção por *Dirofilaria immitis* manifestada por formação de nódulo pulmonar solitário. Observaram que os casos em animais concentravam-se nos estados da costa, sudeste, leste e sul, sendo a distribuição semelhante em humanos. Também descreveram caso de lesão nodular em pulmão em um paciente de 69 anos de idade, cuja avaliação histopatológica após a ressecção revelou a presença de *Dirofilaria immitis* em tecido necrótico em uma artéria pulmonar.

No Brasil o segundo caso de dirofilariose pulmonar humana foi relatado em 1993 por VICNETE *et al.* cujo paciente teve um dos nódulos excisado e o diagnóstico feito a partir da avaliação histopatológica. RODRIGUES-SILVA *et al.* (1995) apresentaram um detalhado sumário de distribuição geográfica e aspectos clínico-patológicos de dirofilariose pulmonar humana. Dos 229 casos citados na literatura, apenas 17 foram relatados no Brasil, a despeito das condições altamente favoráveis para a transmissão desta infecção ao homem. CAMPOS *et al.* (1997) realizaram um estudo retrospectivo de 24 casos confirmados de dirofilariose pulmonar humana, com 17 pacientes masculinos e sete femininos. Em todos os casos o exame histopatológico revelou um parasita morto, normalmente fragmentado. Em Florianópolis, SC sete casos humanos foram relatados por CAVALLAZZI *et al* (2002). Dos cinco pacientes do sexo masculino, com idade variando entre 42 e 73 anos, apenas três eram assintomáticos. Os outros dois pacientes eram do sexo feminino com idades de 63 e 69 anos respectivamente. Em 2004, RODRIGUES-SILVA *et al.* reportaram o caso de dirofilariose pulmonar em uma paciente de 45 anos de idade originária do Rio de Janeiro. Com este último relato, foram 51 casos de dirofilariose pulmonar humana confirmados no Brasil, o maior número ocorrendo na região Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro).

GUTIERREZ *et al.* (1996) relataram na Califórnia, Estados Unidos, dois casos humanos, de infecção extrapulmonar por parasita semelhante a *Dirofilaria immitis*. Em um dos pacientes existia pequeno nódulo com menos de um centímetro na pálpebra e órbita esquerdas. No corte histológico observou-se além da reação inflamatória granulomatosa, a presença de secções oblíquas de um nematóide fêmea medindo aproximadamente 140 µm de diâmetro. O outro paciente apresentava dois nódulos na cavidade peritoneal nos quais foram observados cortes de nematóides fêmeas com diâmetro variando de 260 a 320µm.

MRUGESHKUMAR (1999) em um estudo retrospectivo sobre dirofilariose pulmonar humana nos Estados Unidos observou que a frequência e distribuição desta doença estão relacionadas à prevalência da dirofilariose canina, ao número de mosquitos vetores na área e a participação de atividades que expõem os seres humanos às picadas de mosquitos, independentemente de serem proprietários de cães. Desta forma dos 37 casos revisados, 29 foram observados nos estados do sudeste e sul, ao longo da costa do país. O paciente mais jovem foi uma mulher de 33 anos e o mais idoso foi um homem de 79 anos.

Em 2000, LEE *et al.* relataram na Coréia o primeiro caso de dirofilariose pulmonar humana após analisar uma lesão de dois centímetros de diâmetro associada à hiperplasia do linfonodo mediastínico. A lesão era um granuloma com cortes de nematodas compatíveis com *Dirofilaria immitis*. Além disso, havia ainda pneumonia necrótica, infarto e fibrose pulmonar focal.

No Japão, a incidência de dirofilariose humana tem aumentado significativamente e é um diagnóstico que deve ser considerado quando são observados nódulos pulmonares. YAMAZAKI *et al.* (1998) chamaram a atenção para este fato ao relatarem três casos de dirofilariose pulmonar, dois deles assintomáticos, diagnosticados após ressecção de nódulo pulmonar.

Em uma paciente de 73 anos com história de fibrose pulmonar com doença vascular há quatro anos, o exame de imagem mostrou nódulo solitário com cavidade de dois centímetros de diâmetro localizado no lobo pulmonar direito, o qual foi retirado cirurgicamente na hipótese de ser neoplasia. O exame anatomopatológico revelou ser um granuloma com *Dirofilaria immitis* (SAKO *et al.*, 2000). Ainda no Japão, HIRANO *et al.* (2002) realizaram um estudo clinicopatológico sobre dirofilariose pulmonar onde encontraram formação nodular única na porção inferior e média do pulmão direito de quatro pacientes, após um exame de rotina. Nenhum deles apresentou sintomatologia clínica. Apenas em um deles foi observada eosinofilia moderada no exame hematológico. A avaliação histopatológica dos nódulos revelou necrose de coagulação central, com cortes de parasitas e células inflamatórias, circunscritas por cápsula fibrosa. Após os testes de imunohistoquímica foi confirmada a presença de *Dirofilaria immitis*. YOSHINO *et al.* (2003) considerando a dirofilariose rara no Japão relataram o caso de uma paciente de 53 anos, submetida à excisão cirúrgica de câncer de mama e uterino, a qual passou a apresentar tosse, cujo exame revelou formação nodular no pulmão direito. A biópsia revelou nódulo fibroso com agregação de macrófagos. Não descartando a possibilidade de neoplasia maligna, realizou-se a cirurgia e ao exame microscópico, a lesão nodular mostrava marcada necrose de coagulação e parasitas mortos na luz vascular com características morfológicas de *Dirofilaria immitis*. A dirofilariose pulmonar foi confirmada após o resultado positivo para o teste imunológico específico.

Na Tailândia, TSUNG & LIU (2003) diagnosticaram dirofilariose pulmonar em um paciente assintomático de 69 anos de idade, após a ressecção de uma lesão nodular observada em um exame radiográfico rotineiro de pulmão. Apesar de ser uma zoonose incomum, os casos relatados são importantes, pois a apresentação clinicopatológica da dirofilariose pulmonar humana pode mimetizar neoplasias de pulmão e os profissionais da área devem incluí-la nos diagnósticos diferenciais quando são observadas no exame radiográfico as

lesões subpleurais “em forma de moedas”. No Canadá, LAGROTTERIA *et al*, (2003) diagnosticaram pelo exame histopatológico forma imatura de *Dirofilaria immitis* em um nódulo solitário excisado de uma paciente de 44 anos. Os resultados de três diferentes testes sorológicos para detectar antígenos circulantes foram negativos, consistentes com a presença de parasita imaturo. MORI *et al* (2004) realizaram o estudo sorológico de cinco pessoas de uma mesma família, onde um dos membros apresentou lesão granulomatosa no pulmão compatível com *Dirofilaria immitis*. Três membros reagiram positivamente ao teste ELISA para o parasita, demonstrando que o teste sorológico é útil para detectar infecção sub-clínica.

Apesar da maioria dos casos de dirofilariose humana causar infecção pulmonar existem relatos de infecção extrapulmonar e em locais não usuais. Na Malásia, DISSANAIKE *et al*. (1977) observaram um parasita ativo localizado no humor vítreo do olho direito de um homem de 62 anos de idade. Foi identificado tentativamente como forma imatura de *Dirofilaria immitis*, sendo que na época existiam apenas cinco casos autênticos de filaria no humor vítreo humano. Mais recentemente na Costa Rica, RODRIGUEZ *et al*. (2003) descreveram um caso de um paciente com 55 anos, que teve removida uma fêmea imatura de *Dirofilaria immitis* localizada em tecido periorbital.

Em 1986, MIMORI *et al.*, examinaram um nódulo excisado de mama de uma mulher e encontraram cortes de nematóide fêmea com características compatíveis às de *Dirofilaria immitis*. GUTIERREZ *et al*. (1997) relataram dois casos de infecção humana extrapulmonar por parasitas imaturos semelhantes a *Dirofilaria immitis*. Em um dos pacientes a localização era orbital e no outro era na cavidade peritoneal. No Texas, SKIDMORE *et al* (2000), descreveram um caso de infecção por *Dirofilaria immitis* extrapulmonar em um paciente de 71 anos de idade. Quando submetido a laparotomia para diagnóstico de massa de cólon, dois nódulos foram encontrados aderidos à parede abdominal anterior. O exame microscópico revelou ser granuloma com estruturas semelhantes à helmintos, compatível a *Dirofilaria immitis* imaturo.

O quarto caso de dirofilariose humana na Califórnia, Estados Unidos foi relatado por THEIS *et al.* (2001). Um paciente com 28 anos de idade com suspeita de hérnia inguinal encarcerada foi submetido à cirurgia para resolução do processo. Havia massa envolvendo cordão espermático que examinada microscopicamente revelou um exemplar macho de *Dirofilaria immitis* imaturo em um ramo da artéria espermática, confirmado após estudos com técnicas moleculares.

KIM *et al.* (2002) descreveram o primeiro caso de dirofilariose hepática humana. O paciente de 39 anos de idade apresentou nódulo hepático durante exame de rotina. Após a ressecção do nódulo, o exame microscópico mostrou lesão granulomatosa com centro necrótico e cortes de parasitas, semelhantes a *Dirofilaria immitis*. O soro do paciente reagiu positivamente ao respectivo antígeno. Em uma área não endêmica na China, TO *et al* (2003) relataram o quarto caso de dirofilariose na mucosa oral.

Os casos de dirofilariose com localização pulmonar e extrapulmonar podem complicar os diagnósticos diferenciais, necessitando de estudos epidemiológicos detalhados dos vetores em áreas enzoóticas.

### **1.7 A patogenia da dirofilariose no cão**

Primariamente a dirofilariose é uma doença pulmonar vascular e os sinais clínicos no cão são aqueles relacionados à disfunção cardiovascular, como tosse e exaustão ao exercício, que pode evoluir para a insuficiência cardíaca congestiva. Em geral os cães possuem idade superior a cinco anos e quadros freqüentes de infecção. Existe uma relação estreita entre o número de parasitas presentes e a severidade do distúrbio, mas em casos excepcionais, os sinais mais severos podem aparecer em cães que alojam poucos parasitas. Cães clinicamente normais podem abrigar em torno de 30 parasitas e cães afetados clinicamente, 50 ou mais. KAISER & WILLIANS (2004) estudaram a relação entre a quantidade de parasitas no coração e a proliferação da intima das artérias que alojavam os parasitas. Realizaram a necropsia de

176 cães capturados em Michigan, Estados Unidos, dos quais 170 apresentaram os parasitas adultos no coração e artéria pulmonar na média de  $14 \pm 13$  exemplares por animal.

O comprometimento vascular é caracterizado por proliferação miointimal, inicialmente em pequenas artérias periféricas e mais tarde em artérias pulmonares lobares, especialmente a artéria lobar caudal direita. Esta proliferação fibromuscular da íntima em grandes vasos produz rugosidades evidentes da parede vascular, patognomônico desta doença e acontece tanto com o contato direto com as formas imaturas quanto maduras do parasita adulto. Possivelmente ocorre pelo dano endotelial provocado pela irritação mecânica, mediado por fator de crescimento derivado das plaquetas. A trombose pode ser associada a parasitas vivos ou mortos e tromboembolismo quando o animal é submetido a terapia adulticida, levando ao agravamento do quadro de hipertensão pulmonar. Parasitas mortos podem induzir reação granulomatosa na parede do vaso, a qual pode estender-se ao parênquima pulmonar. MUPANOMUNDA *et al.* (1997) observaram que o desempenho frente ao exercício de cães de corrida infectados por um grande número de parasitas, assim como em cães infectados com um ou dois parasitas foi fraco, uma vez que já estava estabelecido o quadro de comprometimento vascular. Os parasitas adultos são encontrados normalmente nas artérias pulmonares e no ventrículo direito, mas já foram observados em átrio direito e na veia cava em infecções severas. O parasita adulto jovem primeiramente desenvolve-se em pequenas artérias pulmonares e progressivamente invade as artérias proximais à medida que vai crescendo. Acima de 50 exemplares os parasitas podem ser encontrados em átrio direito e veia cava. A insuficiência cardíaca direita se desenvolve como consequência da hipertensão pulmonar causando progressivamente esclerose vascular pulmonar. Também é de importância a ação mecânica do parasita no fluxo sanguíneo intracardíaco e na função das válvulas atrioventriculares. FRANK *et al.* (1997) descreveram nos Estados Unidos a manifestação da doença em cinco cães, resultante da localização aberrante dos parasitas na circulação arterial

periférica. Os cães apresentaram paresia e necrose interdigital isquêmica resultante da doença tromboembólica. A angiografia confirmou a presença dos parasitas em todos os animais que foram submetidos ao tratamento específico. Um dos cães foi à óbito por complicações tromboembólicas, tornando o tratamento sistêmico da dirofilariose um desafio.

As alterações do parênquima pulmonar que acompanham as alterações vasculares incluem inflamação granulomatosa periarterial, hemossiderose, fibrose interalveolar difusa, proliferação do epitélio alveolar, fibrose pleural e os parasitas mortos induzem formação de granulomas parasitários no parênquima. Terapia adulticida causa embolismo resultando em trombose e inflamação granulomatosa, cuja resolução ocorre seis semanas após o tratamento. Com a remoção cirúrgica dos parasitas, as lesões proliferativas da parede do vaso tendem a desaparecer. A doença arterial pulmonar severa sempre resulta em insuficiência cardíaca congestiva crônica com conseqüente trombocitopenia e hemoglobinúria. A microfilária no pulmão pode induzir a uma pneumonite eosinofílica alérgica, pode ser precursora da granulomatose pulmonar eosinofílica, onde há formação nodular de um a oito centímetros de diâmetro, compostas por eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos envolvendo a microfilária, associada ainda a eosinofilia periférica. As lesões adicionais incluem congestão passiva crônica do fígado e ascite.

NINOMIYA & WAKAO (2002) estudaram as lesões nas camadas da artéria pulmonar e ramificações, sob microscopia óptica e eletrônica de transmissão, provocadas por parasitas adultos de *Dirofilaria immitis* em cães infectados naturalmente. A microscopia óptica evidenciou projeções papilíferas e/ou sésseis da íntima, para a luz vascular algumas vezes acompanhadas por trombos recentes ou organizados com restos parasitários. Com a microscopia eletrônica observou-se que esses espessamentos estavam associados à presença de células musculares lisas migrantes da média e ao aumento da matriz extracelular. Para caracterizar as alterações estruturais nos vasos pulmonares de cães com dirofilariose, e

entender o desenvolvimento dos distúrbios circulatórios e hipertensão pulmonares, os mesmos autores, sob microscopia de varredura estudaram estas lesões em ramos da artéria pulmonar e observaram lesões proliferativas na parede as quais provocavam constrição ou obstrução, responsáveis pela elevada pressão arterial dos animais severamente afetados. Artérias bronquiais estavam bem desenvolvidas e extremamente dilatadas, formando numerosas anastomoses com artérias pulmonares. Pequenas veias pulmonares possuíam constrições anulares causadas por hiperplasia das células musculares lisas dos esfíncteres venosos.

Além das lesões cardio-pulmonares, outros órgãos podem sofrer processos patológicos decorrentes da dirofilariose que acabam comprometendo suas funções. Lesões na microcirculação renal podem ocorrer em cães com dirofilariose, manifestadas como moderada proteinúria e microscópicamente por nefrite crônica proliferativa difusa, de moderada a intensa e glomerulonefrite membranoproliferativa generalizada. Dependendo da infecção pode-se observar microfírias dentro dos capilares glomerulares e em veias da camada medular (LUDDERS *et al.*, 1988).

Glomerulonefrite membranoproliferativa ocorre primariamente devido a deposição glomerular de imunocomplexos, tanto daqueles formados no sangue circulante pelo excesso de antígeno, quanto aquele formado *in situ* no glomérulo. A intensidade da deposição de imunocomplexos varia com a intensidade e duração da microfíremia e da resposta do anticorpo. O dano ao epitélio glomerular também é atribuído à microfíria. O resultado da doença glomerular na dirofilariose é proteinúria moderada a severa, dificilmente ocorrendo falência renal e uremia (GRAUER, 1989). PAES-DE-ALMEIDA *et al.* (2003) induziram experimentalmente a dirofilariose em cães da raça beagle para avaliar em microscopia óptica e de transmissão o efeito da doença sobre os rins. Observaram que os depósitos densos na membrana basal glomerular estava associada a deposição de imunocomplexos. O estudo das

alterações ultraestruturais sugeriu que tanto as microfilárias, quanto os parasitas imaturos e adultos contribuem para o desenvolvimento da glomerulonefropatias.

A síndrome da veia cava ou síndrome da falência hepática é uma variante da dirofilariose observada usualmente em cães jovens, com mais de 100 parasitas adultos preenchendo o átrio direito e a veia cava, como resultado da migração retrógrada das artérias pulmonares. Esta síndrome caracteriza-se por fraqueza, anorexia, bilirrubinúria, hemoglobinúria e anemia. Choque pode ocorrer por obstrução e diminuição do retorno venoso. A massa de parasitas pode ainda interferir na função valvular, causando regurgitação da tricúspide e falência congestiva direita. A congestão hepática é severa, os linfáticos podem estar distendidos levando à ascite. A anemia desenvolve-se devido a turbulência do sangue arterial direito, com hemólise mecânica acompanhada talvez de hemólise microangiopática resultante da ativação de plaquetas e formação de fibrina. Há azotemia e o óbito ocorre em um a três dias. Fleboesclerose e trombose de veia cava caudal e veias hepáticas são semelhantes às reações que ocorrem em artérias pulmonares. GOGGIN *et al.* (1997) descreveram a presença de *Dirofilaria immitis* na aorta e no fígado de um cão macho, sem raça definida de cinco anos de idade. Ao exame necroscópico observaram 58 parasitas adultos no coração direito e veia cava, na aorta e em granulomas hepáticos. Quando a microfilária morre na circulação pode induzir a formação de microgranulomas em vários órgãos como pulmão, fígado e rim.

Assim como em outros animais existem vários relatos de infecções extra-cardíacas por *Dirofilaria immitis* em cães. PATTON *et al.* (1970) em um exame de rotina em um cão macho com quatro anos de idade diagnosticaram dirofilariose e o submeteram à terapia adulticida. Três meses após o animal passou a manifestar alterações neurológicas, as quais evoluíram até impossibilitar a manutenção da vida. Ao exame necroscópico observaram no coração 15 exemplares adultos de *Dirofilaria immitis* no ventrículo direito e extensa área de necrose

isquêmica no hemisfério cerebral direito. Uma fêmea adulta e grávida foi retirada viva da artéria comunicante direita. Cortes histológicos de cérebro revelaram parasitas em ramos da artéria cerebral media e no pulmão existiam múltiplos trombos arteriais organizados. BOZEMANN *et al* (1974) encontraram parasitas adultos no cérebro de um cão e de um gato. No cão adulto de raça Chihuahua, com manifestações neurológicas, um exemplar macho adulto foi encontrado no ventrículo lateral do cérebro, além de vários outros no ventrículo direito do coração. Microscópicamente existia desmielinização e manguitos perivasculares na área do cérebro afetada. No gato adulto, cuja manifestação foi a cegueira, existia uma fêmea adulta de *Dirofilaria immitis* com 153mm em uma veia do ventrículo lateral direito do cérebro, o qual estava preenchido por sangue. HAMIR (1987) descreveu o caso de um cão de 10 anos de idade, sem raça definida, levado ao atendimento clínico por apresentar sinais neurológicos. Após 11 dias veio a óbito e ao exame necroscópico, foram encontrados numerosos parasitas no ventrículo direito do coração e extensivas lesões de espirocercose no esôfago distal e aorta torácica. No cérebro, existia aproximadamente 40 mm de uma parte livre do parasita adulto no ventrículo e o restante estava inserido no parênquima nervoso envolto por reação inflamatória.

BLASS *et al.* (1989) diagnosticaram dirofilariose extra-cardíaca em um cão adulto da raça Lulu da Pomerânia com tetraparesia recorrente. O exame radiográfico mostrou uma massa dorsal extramedular entre C2-3 compatível com neoplasia. Na cirurgia uma fêmea adulta de *Dirofilaria immitis* com aproximadamente 200 mm de comprimento estava localizada no espaço epidural desta região. A pesquisa de microfílarias com o teste de Knott após a cirurgia foi negativa.

Em 1994, ORTEGA-MORENO *et al.*, descreveram na Espanha infecção por microfílarias de *Dirofilaria immitis* na mama de uma cadela com a doença manifesta. Outra localização aberrante foi observada por HENRY (1992) em um caso de mucocele salivar associada a dirofilariose em um cão. Microfílarias foram encontradas no fluido aspirado da

mucocele, sendo a identificação confirmada pelo teste de imunoensaio e pela presença do parasita adulto dentro da mucocele. Em um cão Boston terrier, de dois anos de idade, positivo para *Dirofilaria immitis*, COOLEY *et al.* (1987) além das anormalidades clinicopatológicas observadas na dirofilariose avançada diagnosticaram ainda miosite resultante de trombose da artéria femoral e seus ramos devido à infecção pelo parasita. Este animal desenvolveu ainda encefalomielite pela presença de larvas no tecido nervoso.

Muitos parasitas localizados acidentalmente no olho podem provocar endoftalmite parasitária. Uveíte crônica acompanhada de formas imaturas de *Dirofilaria immitis* foi observada em cavidades do humor vítreo e aquoso de cães. Também se relatou endoftalmite com sinéquia anterior e exsudato subretinal (GWIN *et al.*, 1977; SMITH, 1978; JOHNSON, 1989).

Anemia hemolítica por dano aos eritrócitos está associada à migração somática dos parasitas na dirofilariose canina (REBAR, 1981). A coagulação intravascular disseminada pode ser desencadeada por *Dirofilaria immitis* devido ao dano endotelial e exposição do colágeno subendotelial trombogênico e/ou por ativação direta do mecanismo de coagulação extrínseco e intrínseco. Vasculite ocorre em grande variedade de doenças inflamatórias. *Dirofilaria immitis* pode provocar endovasculite em vasos de médio e grande calibre, assim como arterites que podem desenvolver trombose, isquemia e infarto. A endoarterite pulmonar obliterativa pode ocorrer por insuficiência cardíaca congestiva (CRAWFORD & FOIL, 1989). Também já foi observada osteopatia hipertrófica em cães portadores de *Dirofilaria immitis*. Esta síndrome ocorre no ser humano e todas as espécies de animais domésticos, onde se observa osteofitose periosteal difusa secundária à lesão crônica, usualmente intratorácica, de origem inflamatória ou neoplásica (BRODEY, 1971).

As microfíliarias de *Dirofilaria immitis* tem sido associadas também à dermatite pápulonodular pruriginosa em cães. As lesões são encontradas mais comumente na face,

cabeça, tronco e membros torácicos. Variam de 0,5 a 3 cm de diâmetro e são circunscritas, firmes, alopecicas e ulceradas. Microscópicamente há dermatite perivascular superficial e profunda até dermatite piogranulomatosa nodular com infiltração eosinofílica. As microfilárias são observadas intra ou extravascularmente nos locais das lesões (SCOTT & VAUGHN, 1987).

### **1.8 Fatores epidemiológicos que podem influenciar no estabelecimento da dirofilariose**

Em áreas não endêmicas de dirofilariose existem vários fatores que podem influenciar no estabelecimento da doença. Desta forma, o governo da Nova Zelândia relacionou uma série deles, os quais devem ser considerados no estudo epidemiológico da dirofilariose em uma região (NEW ZELAND, 2004).

- 1. Expectativa de vida do parasita adulto e de microfilárias: Qualquer cão infectado movendo-se permanentemente pode ser uma fonte em potencial de microfilárias por muitos anos. Mesmo tratado com medicamentos adulticidas, este risco ainda existe por um tempo considerável.*
- 2. Manifestação tardia dos sinais clínicos: Em muitas circunstâncias os sinais clínicos podem não ser aparentes por dois ou mais anos, apesar de existirem microfilárias na circulação. Se a infecção é baixa, muitos animais nem chegam a manifestar a doença.*
- 3. Ausência de resposta imune efetiva: Nas infecções naturais o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva é questionável e em áreas endêmicas os cães necessitam de tratamento profilático constante.*
- 4. Infecções ocultas: A ausência de microfilárias pode ocorrer por infecção pré-patente, infecção por parasita de único sexo, terapia filaricida e fatores imunomediados. A incidência das infecções ocultas é variável mas tem aumentado sistematicamente chegando a 41 %.*

5. *Migração transplacentaria de microfilárias: Microfilárias possuem a capacidade de migrar através da placenta, o que não acontece com as larvas L3 ou o parasita adulto. Animais com menos de seis meses de idade podem ter microfilaremia baixa e testes antígenos que acusam o parasita adulto não irão reagir positivamente nestes filhotes.*
6. *Dirofilariose felina: Em gatos a dirofilariose pode ser detectada em áreas endêmicas, mas esta espécie é mais resistente que o cão, a microfilaremia é incomum ou transitória, oferecendo pouco risco como fonte de infecção.*
7. *Diferença de sexo e raça: São fatores com pequena relevância, pois cães de qualquer raça, sexo ou tamanho podem ser infectados.*
8. *Número de larvas desenvolvidas no mosquito: Em geral, menos de dez larvas infectantes chegam a se desenvolver em um mosquito. Desta forma uma única picada de mosquito pode resultar em uma infecção leve no cão. Para que seja uma infecção grave, são necessárias várias picadas no animal que viva próximo a um cão infectado e com densa população de vetores infectados.*
9. *Densidade da população canina: Em áreas urbanas a densidade canina é maior, possibilitando a transmissão entre eles.*
10. *Dispersão do mosquito: A capacidade de dispersão do mosquito é variável sendo necessário conhecer a espécie potencialmente vetora na região de ocorrência da dirofilariose.*

### **1.9 Os exames laboratoriais para a dirofilariose**

No diagnóstico das filarioses caninas a identificação das microfilárias é de grande importância para definir o agente específico, utilizando-se as características morfológicas para tal. Várias técnicas diferentes vem sendo utilizadas para examinar o sangue em busca de larvas de nematóides. O exame direto à fresco é o método mais comum e rápido para

demonstrar a presença de microfilárias. Para identificá-las o recomendado seriam as técnicas de concentração em filtro ou o Teste de Knott modificado (SLOSS *et al.*, 1999).

Muitos testes para dirofilariose são desenvolvidos para proporcionar um método rápido e seguro para determinar o estado dos cães e gatos portadores de dirofilariose, mesmo para animais amicrofilarêmicos. Para avaliar a confiabilidade destes testes é necessário conhecer a sensibilidade e especificidade dos vários métodos. Os testes antígenos são comumente usados para detectar parasitas adultos, mas os testes para microfilárias e para pesquisa de anticorpos são também úteis. Resultados falso-positivos e falso-negativos podem levar ao tratamento desnecessário (CRAIG, 2003). O prazo mínimo para a migração da larva de *Dirofilaria immitis* após a infecção é de cinco meses, desta forma em cães com idade inferior a cinco meses não há como fazer os testes para dirofilariose, pois são muito jovens para serem infectados sob quaisquer circunstâncias (BROOKS, 2001).

### **1.9.1 Testes para microfilária circulante**

Existem vários testes para detectar microfilárias circulantes de *Dirofilaria immitis* tanto em cães quanto em gatos. Como a microfilária deste parasita não se confunde com aquelas de *Acanthocheilonema (Dipetalonema) reconditum*, *Dirofilaria repens* ou outra microfilária rara, a especificidade dos testes para microfilárias pode virtualmente chegar a 100%. Os resultados falso-negativos decorrem de infecções ocultas, isto é, o parasita adulto está presente, mas as microfilárias são ausentes, existe pequeno número de parasitas ou há flutuação diária no número de microfilárias.

O exame direto do sangue total é o mais simples e rápido de todos os procedimentos, permitindo a demonstração de microfilárias. Pode ser usado para avaliar o padrão de movimento das microfilárias por entre as células sanguíneas, na tentativa de diferenciar *Dirofilaria* de *Dipetalonema*, mas a menor alteração no padrão do movimento serpentiforme

pode levar a resultados equivocados (LINDSEY, 1965; SLOSS *et al.*, 1999; BROOKS, 2001). No passado utilizou-se um método rápido para diagnosticar *Dirofilaria immitis*, descrito por BURCH & BLAIR (1951), o qual se fazia a concentração de microfilárias vivas. A técnica era misturar 2ml de sangue a 1ml de solução de saponina a 2%, posteriormente centrifugada a 4500 rpm durante um minuto. O sedimento era examinado microscópicamente para avaliar a mobilidade de microfilárias. COURTNEY & ZENG (2001) relacionaram a contagem de microfilárias e a sensibilidade do exame direto para o diagnóstico da dirofilariose canina. O exame direto de sangue detectou 165 dos 204 cães positivos (80,9%). O mesmo exame detectou todos os 134 animais positivos com mais de 50 microfilárias/ml e apenas 31 (44,3%) dos 70 animais com menos de 50 microfilárias/ml de sangue.

### **1.9.2 Testes para concentração de microfilárias**

O Teste de filtração, o Teste de Knott e Teste de Knott modificado são técnicas de concentração utilizadas para a detecção de infecções com pequeno número de microfilárias. Nesses testes uma grande quantidade de sangue é centrifugada ou filtrada para concentrar as microfilárias presentes. Quando a pesquisa é realizada, ambos os testes são apropriados e devem ser feitos em conjunto com os testes antígenos (BROOKS, 2001).

A sensibilidade e especificidade do teste de filtração foram avaliadas por MARTINI *et al.* (1996). Este estudo demonstrou 72,7% de sensibilidade e 87,7% de especificidade do kit comercial Difil-Test®, EVSCO Pharmaceuticals, comparativamente ao exame necroscópico. A contagem de microfilárias pode ser estimada através deste teste comercial se a quantidade de sangue usada for exatamente a recomendada pelo fabricante.

FELDMEIER *et al.* (1986) compararam quatro técnicas para detecção de microfilárias de *Dirofilaria immitis* no sangue periférico. Filtração de membrana de policarbonato sozinha ou em combinação com gradiente de densidade por centrifugação mostrou 100% de sensibilidade

e boa eficiência. Esfregaço sangüíneo fino e citocentrifugação foram considerados de baixa eficiência e alcançou 100% de sensibilidade quando com mais de 200 microfíliarias/ml de sangue.

Originalmente descrito em 1939, o teste de Knott é usado por muitos laboratórios em detrimento ao teste de filtração (CRAIG, 2003). O tamanho e a morfologia das microfíliarias são melhores preservadas, o que auxilia na diferenciação de *Dirofilaria* e de *Acanthocheilonema*.

MARTINI *et al.* (1996) avaliaram a sensibilidade e a especificidade do teste de Knott, obtendo índices de 66,4% e 95,4 % respectivamente. O custo é menor quando comparado ao kit comercial de filtração, mas requer mais tempo para obter o resultado. Com o objetivo de calcular a prevalência de *Dirofilaria immitis* em municípios de Belém, Pará, SOUZA *et al.* (1997) examinaram 540 amostras de sangue de cães, 297 machos e 243 fêmeas, SRD e de raças variadas, com idade entre seis meses e 16 anos. As técnicas utilizadas para pesquisa de microfíliarias circulantes foram a de gota espessa, o microhematócrito e a de Knott modificada. Foram encontradas 58 amostras positivas das quais 52 (89,66%) de machos e seis (10,34%) de fêmeas.

### **1.9.3 Testes para pesquisa de anticorpos de *Dirofilaria immitis***

Devido a algumas limitações dos testes antígenos desenvolveram-se os métodos de imunodiagnóstico para detectar anticorpos circulantes produzidos em resposta à infecção por *Dirofilaria immitis*. O uso destes testes em cães tem demonstrado baixa especificidade, geralmente devido à reação cruzada com parasitas gastrointestinais e não são muito úteis na detecção de cães com dirofilariose (HOOVER *et al.*, 1996). Estudos realizados por MANELLA *et al* (1998) e McCALL (2001) demonstraram que os testes anticorpos possuem sensibilidade e especificidade suficiente para serem usados em gatos. Nestes animais raramente observa-se microfíliarêmia e o número de parasitas adultos é baixo, tornando difícil a detecção de antígeno

específico. Além disso, os testes para pesquisa de anticorpos são eficientes para detectar infecções recentes ou aquelas envolvendo apenas parasitas machos (BROOKS, 2001).

#### **1.9.4 Testes para pesquisa de antígenos de *Dirofilaria immitis***

Os testes antígenos são largamente usados para o diagnóstico da dirofilariose no cão e alguns deles também podem ser utilizados para gatos. Os antígenos são produzidos predominantemente pelas fêmeas dos parasitas adultos, estando provavelmente relacionados à função reprodutiva (WEIL, 1987). Desta forma animais infectados com formas imaturas de *Dirofilaria immitis* ou parasitas do sexo masculino podem não apresentar antigenia (GOODWIN, 1998). Os antígenos de superfície de larvas L3, L4 e parasitas adultos de *Dirofilaria immitis* diferem entre si. Cada estágio do parasita parece adotar estratégias diferentes para escapar da resposta imune do hospedeiro. A larva infectante L3 faz isso eliminando grande quantidade de moléculas antigênicas antes e durante o processo de muda, controlando a apresentação do antígeno somático ao sistema imune do hospedeiro. A larva L4 e os parasitas adultos podem evitar a resposta imune fazendo a adsorção de IgG e fração C3 do Complemento pela cutícula (MURO *et al.*, 1999).

A engenharia genética permite desenvolver testes extremamente sensíveis capazes de detectar fragmentos minúsculos do tegumento de parasitas adultos no sangue circulante. Esses testes podem tornar possível a detecção de infecção com ausência de microfilaremia, as chamadas “infecções ocultas”. BROOKS (2001) justifica essas infecções ocultas como sendo causadas por parasitas do mesmo sexo, ou parasita único. Fêmeas jovens tendem a ser mais resistentes às drogas usadas para eliminação de parasitas adultos. Após a medicação anti-dirofilaria, recomenda-se fazer o teste antígeno para comprovar a eliminação total dos parasitas. No gato, o período em que a microfilaria pode ser detectada no sangue é extremamente curto devido à ação rápida do sistema imunológico. Medicações preventivas

atuam sobre microfilárias, mas não sobre os parasitas adultos. É possível que nos casos de medicação incompleta, se estabeleça de imediato a infecção onde não é possível detectar microfilárias, razão pela qual recomenda-se fazer o teste anual para dirofilariose. Resultados falso-negativos podem ocorrer também se houver apenas um ou dois espécimes de parasitas fêmeas ou aplicação incorreta da técnica de utilização do kit (KNIGHT, 2002).

LEE *et al.* (2000), entre 1994 e 1995, monitoraram a dirofilariose em cães pastores alemães de cinco regiões diferentes da Coreia do Sul através do teste de Knott modificado e teste antígeno (Dirochek®, Synbiotics, USA). Ficou demonstrado que este último é mais acurado que a pesquisa de microfilárias circulantes, pois de 36 animais antígeno-positivos, 24 deles foram negativos para microfilárias circulantes. À necropsia, esses animais continham aproximadamente quatro parasitas adultos em artérias pulmonares e coração.

Em Taiwan, WANG (1998) comparou os testes comerciais de hemaglutinação e de ELISA para a pesquisa de antígenos de *Dirofilaria immitis* em 100 cães. Ao exame necroscópico, 53 cães apresentaram a média de 8,2 parasitas/cão, sendo 45 deles positivos para o teste de hemaglutinação e 47 para ELISA. Os cães falso-negativos apresentaram poucos exemplares do parasita. O teste de ELISA foi mais sensível e específico que o teste de hemaglutinação, apesar deste ser mais simples e mais rápido de se fazer. Este teste também é pouco eficiente para detectar *Dirofilaria immitis* em populações caninas onde a doença é rara.

No Brasil, FERNANDES *et al.* (2000) pesquisaram os aspectos epidemiológicos da dirofilariose no perímetro urbano de Cuiabá, Mato Grosso. Empregaram um teste antígeno para *Dirofilaria immitis* adulto e o teste Knott modificado. De 822 cães, 11,81 % das amostras foram positivas para o teste antígeno e 0,41% das amostras apresentaram microfilárias. A prevalência da dirofilariose para a região foi de 120,8 casos para cada 1000 animais. O teste

antígeno acusou ainda como positivas 11,27 % das amostras consideradas como negativas através do teste de Knott modificado.

COURTNEY & ZENG (2001) em um estudo de 963 cães com dirofilariose confirmada através de necropsia, constataram que 834 foram positivos para o teste antígeno Dirochek®, dois foram negativos e 18 fracamente positivos frente ao mesmo teste. ATKINS (2003) comparou os resultados de três testes antígenos para dirofilariose colocados à disposição nos Estados Unidos, testados em cães com um a quatro parasitas adultos fêmeas. Os resultados indicaram que a sensibilidade destes testes variou de 78 a 84 % quando usados para analisar amostras de soro de cães com baixo número de parasitas adultos, e esta sensibilidade variou também entre os testes. A especificidade dos três testes foi de 97%, e todos eles apresentaram resultados falso-positivos e falso-negativos para alguns cães com baixo número de parasitas adultos.

Os testes antígenos também são utilizados no caso de infecção humana, onde em geral existe um estímulo antigênico fraco de difícil detecção. Foi observado que respostas contra antígenos somáticos ou secretores/excretos de parasitas adultos de *Dirofilaria immitis* foram encontrados em indivíduos que desenvolveram dirofilariose pulmonar e indivíduos soropositivos sem sintomas pulmonares (MURO *et al.*, 1999).

#### **1.9.5 O exame radiográfico e de ultra-som**

Em áreas onde a dirofilariose não é comum, os testes de rotina não são realizados e as infecções são detectadas quando o animal manifesta clinicamente doença cardíaca. A radiografia complementa os demais testes por ser o método mais objetivo na avaliação da gravidade da doença cardiopulmonar. Os sinais característicos são ramificações interlobulares e periféricas dilatadas e tortuosas, principalmente nos lobos diafragmáticos. Nos casos graves há evolução para dilatação de átrio e ventrículo direitos (KNIGHT *et al.*, 1999; BROOKS, 2001).

Em estudo na Alemanha sobre a freqüência dos sinais clínicos e lesões em 47 cães infectados por *Dirofilaria immitis*, SCHREY & TRAUTVETTER (1998) observaram no exame radiográfico que hipertrofia cardíaca direita e alterações nos vasos pulmonares foram encontrados em 55,3% e 42,6% respectivamente contra 38,3% de radiografias normais

A ecocardiografia pode fornecer provas definitivas da infecção por *Dirofilaria immitis* uma vez que a parede do corpo dos parasitas adultos é altamente ecogênica e definida. Além disso é útil na avaliação dos efeitos anatômicos e funcionais da doença sobre o coração. Contudo não é um método eficaz para os casos de infecções com poucos parasitas (KNIGHT *et al.*, 1999)

#### **1.9.6 O exame necroscópico**

O exame de necropsia é o procedimento padrão para a determinação da dirofilariose canina e é utilizado sempre que possível em conjunto com os demais exames laboratoriais. É comum o gato desenvolver a infecção ectópica, passando despercebida durante o exame pós-mortem. SNAYDER *et al* (2000) compararam os resultados de testes comerciais para pesquisa de antígeno e anticorpo de *Dirofilaria immitis* com os achados de necropsia de uma população de 330 gatos, onde em 19 deles foram encontrados exemplares do parasita adulto. Em 14 dos 19 gatos, os parasitas eram de um único sexo.

#### **1.9.7 O exame histopatológico**

Os cortes histológicos dos granulomas excisados podem demonstrar cortes de parasitas entre os detritos celulares da necrose central. Em geral, *Dirofilaria immitis* apresenta cutícula delgada destituída de rugosidades longitudinais, características também observadas em outros parasitas do mesmo gênero, o que torna difícil a confirmação do diagnóstico apenas pela histopatologia (GUTIERREZ *et al.*, 1996). Por outro lado, em casos de lesões nodulares em pulmão, como acontece no ser humano, cuja suspeita geralmente direciona para

neoplasias, o exame histopatológico descarta esta suspeita quando observam-se os cortes de parasitas (RODRIGUES-SILVA *et al.*, 1995).

A Sociedade Americana de Dirofilariose criou um guia para orientar o uso dos testes laboratoriais para cães e gatos suspeitos da doença. Baseado neste guia, CRAIG (2003) recomenda para cães:

- ◆ *Filhotes com idade inferior a seis meses não devem ser testados para dirofilariose, pois o período entre a exposição (picada do mosquito) e a produção de microfírias/secreção de antígeno é de seis a sete meses. As microfírias em filhotes podem ser adquiridas in utero se as mães estiverem infectadas, mas não desenvolverão até o parasita adulto sem um hospedeiro intermediário (mosquito).*
- ◆ *Filhotes com idade superior a seis meses e que não estiveram sob tratamento preventivo para dirofilariose, devem fazer o exame direto para microfíria. Em caso de resultado negativo, utilizar o exame de concentração de microfírias. A incidência de infecções ocultas (microfíria negativo/antígeno positivo) varia de 20 a 70%, devendo-se submeter o animal negativo ao teste antígeno. Menos de 1% dos cães podem ser microfíria positivo/antígeno negativo, ocorrendo por remoção dos parasitas adultos através de medicação ou de forma espontânea.*
- ◆ *Os cães com dirofilariose e submetidos ao tratamento preventivo mensal raramente apresentam microfírias, devido ao efeito microfilaricida do medicamento. Os testes de filtração e Knott não são recomendados para avaliar esses animais.*

*Para gatos, as recomendações de CRAIG (2003) são:*

- ◆ *Gatos podem ser testados para dirofilariose com os testes de anticorpo e antígeno. Se ambos os testes derem positivo, o animal provavelmente apresenta a infecção. Se ocorrer anticorpo positivo/antígeno negativo, é possível que sejam apenas um ou dois exemplares de *Dirofilaria*, ou sejam apenas machos, ou formas imaturas ou até exposição anterior ao parasita. Anticorpo positivo/antígeno negativo sugerem a existência de parasitas adultos. Em gatos sintomáticos, mas com anticorpo negativo/antígeno negativo devem ser submetidos a outros testes e exames complementares como radiografias e ecocardiogramas.*

As áreas de litoral são apresentadas como enzoóticas para a ocorrência de dirofilariose. Atribui-se a ocorrência de situações favoráveis como clima, temperaturas elevadas e alta precipitação pluviométrica favoráveis ao desenvolvimento de insetos considerados como potencialmente vetores, como por exemplo *Culex quinquefasciatus*, vetor de *Dirofilaria immitis* em algumas cidades do litoral sudeste e nordeste de nosso país. Esta espécie está estreitamente associada a ambientes antrópicos com estrutura ausente ou ineficiente no sistema de coleta e tratamento de águas residuais e drenagem urbana, esta última particularmente crítica em áreas de planície.

A estes fatores soma-se a pouca informação disponível sobre a prevalência da dirofilariose e o estudo dos insetos potencialmente vetores.

## OBJETIVO GERAL

Em decorrência das áreas de litoral serem apresentadas como regiões enzoóticas para *Dirofilaria immitis* e este parasita possuir distribuição cosmopolita, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a prevalência de *Dirofilaria immitis* em duas populações de cães do município de Guaratuba, assim como a evolução clínica de animais portadores de dirofilariose e abordar aspectos da morfologia interna de *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae), espécie considerada como potencial vetor e normalmente associada a ambientes urbanos com infraestrutura precária de saneamento.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar a prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães errantes capturados pela Secretaria Municipal de Saúde de Guaratuba, Paraná no período de maio de 2001 a abril de 2002.
2. Estimar a prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães domiciliados no Bairro COHAPAR II de Guaratuba, Paraná no período de maio de 2002 a abril de 2003.
3. Estimar a prevalência de *Dipetalonema sp.* em cães errantes capturados pela Secretaria Municipal de Saúde de Guaratuba, Paraná no período de maio de 2001 a abril de 2002.
4. Estimar a prevalência de *Dipetalonema sp.* em cães domiciliados no Bairro COHAPAR II de Guaratuba, Paraná no período de maio de 2002 a abril de 2003.
5. Examinar e avaliar elementos diagnósticos da evolução clínica de cães portadores de dirofilariose submetidos a condições de manejo diferenciado.
6. Avaliar a histologia normal de *Culex quinquefasciatus* como possível ferramenta para diagnóstico de infecção de *Dirofilaria immitis* no vetor.

7. Proceder a análise histológica do processo de digestão do sangue ingerido por fêmeas de *Culex quinquefasciatus* e suas implicações no processo de defesa à infecção por *Dirofilaria immitis*.
8. Proceder a análise histológica de estruturas internas de *Dirofilaria immitis* como parâmetro auxiliar para o diagnóstico histopatológico diferencial de granulomas parasitários em animais e no ser humano.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Descrição geral de Guaratuba

O estudo da prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães foi realizado no município de Guaratuba, localizado na zona litorânea do Estado do Paraná, cuja área abrange 1326 km<sup>2</sup> e conta com 22 km de praias. Sua altitude é de 15 metros, Latitude de 25°53'60"S e Longitude de 48°34'0"W com uma população estimada de 32007 habitantes sendo a população urbana residente de 23156 pessoas. A rede de esgoto, o abastecimento de água e a coleta de lixo atendem respectivamente 1410, 6334 e 6724 do total de domicílios particulares e permanentes (IBGE, 2004). Este município está a 119 km da capital Curitiba, cujo acesso é feito através da BR 277. O clima é do tipo tropical super úmido, sem estação seca definida. A precipitação anual acusa valores de 1000 mm<sup>3</sup>, e a temperatura média está entre 20 e 22 °C, com máximas superiores a 30 °C e mínimas entre 12 e 14 °C. De acordo com a classificação de Koeppen é do tipo **Aft**, onde **A** significa média do mês mais frio superior a 18 °C, **f** ausência de estação seca, e **t** ocorrência esporádica de geadas. Em sua extensão continental costeira e estuarina observam-se ambientes como a baía de Guaratuba, Serra do Mar, ilhas e manguezais, e uma diversidade florística, com variedades de pteridófitas e bromeliáceas terrestres, distribuídas em um geossistema que sofre ações de destruição ambiental. A fauna desta região da Mata Atlântica possui várias espécies de animais silvestres, considerados possíveis hospedeiros de *Dirofilaria immitis*, como *Procyon cancrivorus* Couvier, 1798 (mão-pelada), *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 (cachorro-do-mato) e *Herpailurus yagouarondi* Lacépède, 1809 (IPARDES, 1997).

### 2.2 Descrição das áreas e procedimentos de amostragem

Dois grupos de cães de origens distintas foram avaliados para *Dirofilaria immitis*. O Grupo 1 era formado pelos cães errantes capturados pela Prefeitura Municipal e mantidos no

Canil Municipal de Guaratuba. O Grupo 2 compreendeu os cães domiciliados no Bairro COHAPAR II.

### **2.2.1 Grupo 1 - Canil Municipal de Guaratuba**

Está situado no Bairro COHAPAR II e abriga os cães errantes apreendidos pelo serviço de captura da Prefeitura Municipal, vinculado a Secretaria de Saúde do Município. A construção é de alvenaria, e compreende dois canis coletivos, oito canis individuais e uma sala de manejo e atendimento clínico de animais, além da sala para eutanásia (Figura 1).

A avaliação dos cães errantes capturados pela Prefeitura Municipal de Guaratuba iniciou em maio de 2001, estendendo-se até abril de 2002. As visitas eram mensais e todos os cães que estavam no Canil eram submetidos à avaliação clínica prévia. A frequência de captura de cães errantes era semanal e abrangia o centro e os bairros da cidade de Guaratuba sem uma divisão de área pré-estabelecida. Também era dependente das variações climáticas, sendo cancelada quando havia intempéries. Os animais permaneciam no canil durante sete dias no aguardo da identificação pelo proprietário ou disponíveis para doação, após este período eram submetidos à eutanásia. Para cada animal era preenchida uma ficha própria com informações sobre idade provável, raça, sexo, porte e a data da avaliação.



Figura 1. Canil Municipal de Guaratuba, PR. A. Vista frontal. B. Entrada principal para acesso aos cães coletivos e individuais. C. Canis individuais.

### 2.2.2 Grupo 2 - Bairro COHAPAR II.

A partir de maio de 2002, a pesquisa de *Dirofilaria immitis* passou a ser realizada em cães do Bairro COHAPAR II. Este bairro originou-se de uma área de invasão, sendo caracterizado pela geografia de baixada litorânea, arborizado, composto de edificações em sua maioria constituídas de madeira, com um ou com dois pavimentos. O acesso ao bairro é feito através de ruas sem cobertura asfáltica e a infra-estrutura básica é precária (Figura 2). Mais de 95% das residências são permanentemente habitadas, isto é, são poucas aquelas com finalidade de veraneio. O nível sócio-econômico da população fixa que predomina é o de baixo poder aquisitivo, sobrevivendo do comércio informal como pesca, comércio ambulante, prestação de serviços ou pequenos estabelecimentos comerciais. A colheita das amostras de sangue neste local abrangeu o período compreendido entre maio de 2002 e abril de 2003. Nas visitas mensais eram avaliados os cães, cujos proprietários haviam concedido previamente a

permissão após justificativa e explicação do procedimento. Cada animal tinha uma ficha própria com informações sobre idade provável, raça, sexo, porte, proprietário e data da avaliação.



Figura 2. Bairro COHAPAR II, Guaratuba, Paraná. A. Condições de drenagem das águas em uma rua do bairro. B. Aspecto geral das moradias. C. Peridomicílio com abrigo de cães

### 2.3 Avaliação clínica dos cães

Cada animal foi submetido ao exame clínico prévio para avaliação das condições gerais de saúde. Este exame consistiu da avaliação da pelagem e da pele, da dentição para a determinação da idade aproximada, do estado nutricional, coloração das mucosas oral e ocular, além da avaliação dos orifícios naturais. A determinação da idade baseou-se nos critérios descritos em ROYAL CANIN (2001).

A colheita do sangue foi realizada através de venopunção da jugular, com assepsia local prévia com álcool-iodado e o animal posicionado em estação ou decúbito lateral, contido por mordaca descartável. Para cada animal foram utilizadas seringa para 5 ml e agulha

descartáveis. As amostras de sangue foram acondicionadas em frasco próprio com anticoagulante EDTA (0,03 ml de Sal Sódico do Ácido Etilenodiaminotetracético) devidamente identificadas, e mantidas em recipiente térmico de isopor com gelo, até serem armazenadas em refrigerador com temperatura de 2 a 4 °C.

## **2.4 Exames laboratoriais utilizados para a pesquisa e identificação de microfilárias no sangue**

Cada amostra de sangue foi submetida simultaneamente aos três métodos laboratoriais descritos a seguir como forma de aumentar a confiabilidade dos resultados.

### **2.4.1 Exame direto do sangue a fresco**

O objetivo deste procedimento é a detecção e avaliação do padrão de movimentação das microfilárias para identificação da espécie. Foi realizado de acordo com o protocolo de HAHN (1999):

- Após a homogeneização do sangue no frasco, uma gota com 25µl, retirada com pipeta calibrada foi colocada em lâmina para microscopia, recobrando-a com lamínula 24x36mm.
- Nas amostras positivas a presença das microfilárias era percebida pelo turbilhonamento das células sanguíneas. *Dirofilaria immitis* foi identificada pelo movimento serpentiforme e estacionário e *Dipetalonema sp* pelo movimento progressivo.
- A avaliação de cada amostra de sangue foi feita em fotomicroscópio óptico trinocular Olympus CBA sob objetiva de 4x e 10x.

### **2.4.2 Método de Knott (1939) modificado por NEWTON & WRIGHT (1956)**

O Teste de Knott modificado possibilita a realização da micrometria dos parasitas, critério utilizado para identificar e diferenciar pelo estudo dos detalhes morfológicos as microfilárias encontradas.

- Foi misturado 1ml de sangue com EDTA a 0,03% com 9 ml de solução de formalina a 2% para proceder a lise dos eritrócitos e fixar as microfilárias. Centrifugou-se a mistura a

1200 rpm durante cinco minutos, desprezando-se o sobrenadante e foi adicionada ao sedimento uma gota de azul de metileno a 0,1% e após dois minutos, transferiu-se o sedimento para lâmina de microscopia e recoberto com lamínula. A avaliação foi feita em microscópio óptico binocular Olympus CBA sob objetiva de 4x e 10x.

Para a identificação microscópica através do exame direto de sangue a fresco e método de Knott modificado foram utilizadas as características de microfilárias de *Dirofilaria immitis* descritas por SLOSS *et al.* (1999) (Tabela 1).

TABELA 1 – Características morfológicas para identificação de microfilárias de *Dirofilaria immitis*.

Características morfológicas de microfilárias de <i>Dirofilaria immitis</i> de acordo com SLOSS <i>et al.</i> , 1999	
Comprimento	295 – 325µm
Largura	5 – 7,5 µm
Cabeça	Fina
Cauda	Reta
Forma do corpo	Reto
Movimento	Estacionário
Números Relativos	Poucos a muitos

#### 2.4.3 Snap® Canine Heartworm Antigen Test Kit (IDEXX Laboratories)

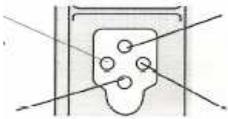
É um teste de imunoenensaio enzimático para a detecção semiquantitativa de antígeno de *Dirofilaria immitis* em sangue total, soro ou plasma de cães e gatos. Neste estudo foi aplicado às amostras de sangue total para confirmação dos resultados obtidos pelos exames de sangue direto à fresco e pelo teste de Knott modificado. Os procedimentos para a realização do *Snap® Test* seguiram as orientações fornecidas pelo fabricante:

1. A amostra de sangue com anticoagulante foi misturada gentilmente por inversão do frasco e com a pipeta plástica que acompanha o kit foram colocadas 02 gotas de sangue

no tubo próprio e adicionadas 05 gotas do Conjugado Anti-HTWM:HRPO, misturadas por inversão três a cinco vezes.

2. No poço de amostra do dispositivo foi colocado todo o conteúdo do tubo, sendo acionado o Ativador após dois minutos e a leitura realizou-se após 6 minutos de reação e a interpretação dos resultados baseou-se nas indicações do fabricante (Figura 3).

**Interpretação do resultado**

Indicador de nível alto de antígeno		Controle positivo
Controle negativo		Indicador de nível baixo de antígeno

**Resultado negativo**



Somente o controle positivo desenvolve cor

**Resultado positivo**

1.  Controle positivo e indicador de nível baixo de antígeno desenvolvem cor.
2.  Controle positivo e ambos os indicadores para antígeno desenvolvem cor.

**Reação com o controle negativo**

1.  Se a cor dos indicadores de baixo ou alto nível é mais escura do que o controle negativo o resultado é positivo
2.  Se a cor do controle negativo é igual ou mais escura que a cor dos indicadores de baixo ou alto nível de antígeno, repetir o teste.

Figura 3: Interpretação dos resultados do *Snap® Canine Heartworm Antigen Test Kit* (IDEXX Laboratories) segundo indicação do fabricante.

## **2.5 Acompanhamento clínico de cães positivos para *Dirofilaria immitis***

### **2.5.1 Exames clínicos do cão mantido sob condições controladas no UHVAC**

A Unidade Hospitalar para Animais de Companhia (UHVAC) está localizada no Campus São José dos Pinhais, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em São José dos Pinhais, Paraná. Juntamente com outras quatro Unidades que faz parte do Complexo Hospital Veterinário, que atende o Curso de Medicina Veterinária e oferece serviços em clínica, diagnóstico por imagem e exames laboratoriais de animais de companhia à comunidade em geral. O cão positivo para *Dirofilaria immitis* foi mantido no canil de isolamento para doenças infecto-contagiosas da UHVAC, isolado do exterior com tela de malha fina para evitar o contato com a fauna local de culicídeos. O animal recebeu alimento industrializado peletizado e água à vontade durante sua permanência no canil. Entre abril de 2002 e julho de 2004 o cão foi submetido à quatro avaliações completas, onde constavam o exame clínico geral do animal, acompanhado do hemograma, teste de Knott modificado, *Snap® Test*, exame coproparasitológico e parasitológico de pele, exame radiográfico e de ultra-som. O exame radiográfico de tórax foi feito no Aparelho de Radiografia marca Siemens Polidonos LX 30 500 MA e Processadora Automática Multi-U 45 x. Para o exame de ultra-som utilizou-se o aparelho para Ultra-sonografia HITACHI modelo EUB-405 5MHz e impressora SONY modelo UP-890 MD (Figura 4).



Figura 4. A/B. Vista frontal da Unidade Hospitalar para Animais de Companhia da PUCPR (UHVAC) em São José dos Pinhais, PR. C/D. Canil para doenças infecto-contagiosas, PUCPR. E/F. Exame clínico e venopunção em jugular do cão positivo para *Dirofilaria immitis*. G/H. Exame radiográfico e de ultra-som do cão positivo para *Dirofilaria immitis*.

Para o controle da microfilaremia o cão foi submetido à venopunção em jugular a cada quatro semanas, no período compreendido entre abril de 2002 e maio de 2003. Para a pesquisa da densidade de microfílarias durante o dia, foram colhidas amostras de sangue pela manhã, no meio do dia e o final da tarde. Cada amostra de sangue acondicionada em frasco próprio com anticoagulante EDTA foi mantida sob refrigeração entre 2 e 4°C até ser avaliada. A contagem de microfílarias foi feita através do exame direto de sangue à fresco. Para cada amostra de sangue foram confeccionadas quatro lâminas para totalizar 100µl.

### **2.5.2 Procedimentos clínicos adotados para o cão mantido em condições não controladas no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, Paraná**

O cão positivo para *Dirofilaria immitis* permaneceu em seu domicílio em todo o período da pesquisa o que permitia estar em contato constante com a fauna local de culicídeos (Figura 5).

Entre janeiro de 2003 e março de 2004, o animal foi submetido mensalmente ao exame clínico geral e a venopunção em jugular para avaliação da microfilaremia. Cada amostra de sangue era acondicionada em frasco próprio com anticoagulante EDTA e mantida sob refrigeração entre 2 e 4°C até ser avaliada como protocolo descrito.

Após o óbito natural do cão “Lobo”, seu cadáver foi encaminhado para exame necroscópico no Laboratório de Necropsia do Curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus São José dos Pinhais. Os fragmentos de órgãos foram processados e as lâminas para histopatologia foram confeccionadas no Laboratório de Patologia Veterinária do Curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus São José dos Pinhais. A leitura, interpretação das lâminas e registro das imagens foram feitos em fotomicroscópio óptico trinocular Olympus CBA sob objetiva de 4x, 10x e 40x.

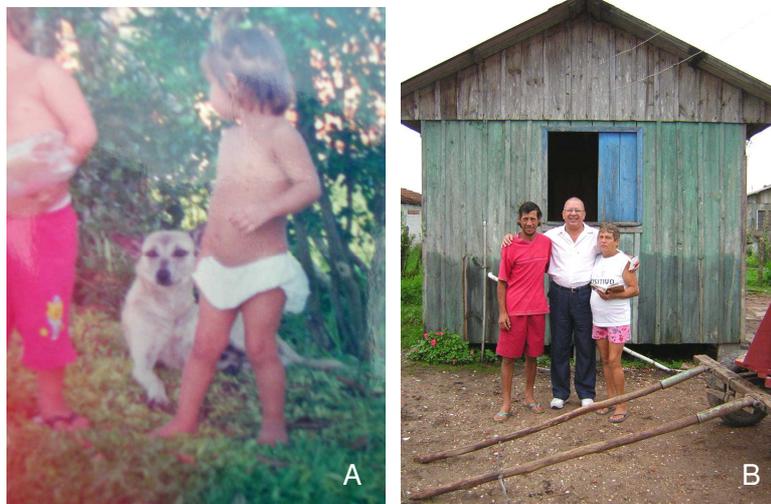


Figura 5. **A.** “Lobo”, cão microfilarêmico e positivo para *Dirofilaria immitis*. **B.** Médico Veterinário Luiz C. Leite (centro) e proprietários do “Lobo”, Sr. Romalino e Sra. Cláudia em seu domicílio no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR.

## 2.6 *Culex quinquefasciatus*

### 2.6.1 Estabelecimento da colônia de *Culex quinquefasciatus*.

Foi feita a partir da captura domiciliar e peridomiciliar de exemplares de mosquitos em Curitiba, PR. Os espécimes foram capturados com dispositivo aspirador próprio e mantidos em gaiolas teladas, sendo alimentados com mel diluído a 10% e tendo à disposição frascos com água para a oviposição. Os aglomerados de ovos desta espécie, facilmente identificados pela formação típica de “jangadas” flutuantes na superfície da água, foram então transferidos para frascos individuais com água límpida, identificados com a data da oviposição e monitorados para observação da eclosão das larvas, cuja data também foi registrada.

As larvas mantidas em frascos com água receberam alimento para peixe de aquário (Tetramin®) adequadamente triturado. Quando atingiram a fase de pupa, foram colocadas em frascos com água dentro de gaiolas teladas para a emergência do adulto e respectivo registro.

### **2.6.2 Pesquisa de cristais de oxihemoglobina em intestino médio de *Culex quinquefasciatus***

Para o repasto, exemplares de fêmeas adultas com 24 horas de vida foram colocadas em contato direto com cão saudável através de dispositivos próprios telados nas extremidades, onde permaneceram até o ingurgitamento completo. Após uma hora, os exemplares foram imobilizados em temperatura de congelador por cinco minutos e cada exemplar foi comprimido entre laminas, adicionada uma gota de corante de Shorr e levados ao microscópio para observação.

### **2.6.3 Preparo dos exemplares de *Culex quinquefasciatus* para o estudo histológico**

Para o estudo histológico foram selecionados exemplares de fêmeas com 24 horas de vida e sem repasto, fêmeas com 48 horas de vida e pós-repasto imediato e fêmeas com 72 horas de vida e após 24 horas do repasto.

Os exemplares selecionados foram preparados conforme protocolo modificado especificamente para este estudo histológico. Os exemplares foram levados à temperatura de congelador por cinco minutos para serem imobilizados e então colocados em solução fixadora de Dubosc-Brasil (ácido pícrico 1g + formaldeído 60ml + ácido acético glacial 15ml + álcool etílico p.a. a 80%) e mantidos por 8 horas em estufa Biomatic a 36°C para fixação dos tecidos. Depois de retirados do fixador passaram por desidratação em três banhos em álcool etílico p.a., permanecendo uma hora em cada um, seguidos da diafanização em dois banhos em xileno p.a., permanecendo 30 minutos em cada um. Na fase de embebição em parafina histológica fundida permaneceram em estufa a 56°C por 3 horas. A emblocagem foi feita em moldes plásticos contendo parafina histológica fundida. Os cortes histológicos de cinco a sete micrômetros foram feitos em micrótomo American Optical, Modelo 820, Série 42492.

As lâminas com os cortes seriados foram submetidas à quatro colorações: Hematoxilina-Eosina, universal para tecidos; Tricrômico de Mallory e Tricrômico de Shorr, para fibras conjuntivas e fibras musculares; Azul de Toluidina, para mucopolissacarídeos.

A avaliação das lâminas e o registro das imagens foram feitos em fotomicroscópio óptico trinocular Olympus CBA sob objetivas de 4x, 10x e 40x.

## **2.7 Preparo dos exemplares adultos de *Dirofilaria immitis* para o estudo histológico**

Os exemplares para o estudo histológico provieram de acervo particular da região de Paranaguá, litoral paranaense e estavam fixados em solução de formol a 10%.

Os exemplares selecionados foram preparados conforme protocolo modificado especificamente para o estudo histológico deste parasita. Inicialmente os exemplares foram colocados em solução fixadora de Dubosq-Brasil (ácido pícrico 1g + formaldeído 60ml + ácido acético glacial 15ml + álcool etílico p.a. a 80%) e mantidos por 2 horas em estufa Biomatic a 36°C para fixação dos tecidos. Depois de retirados do fixador passaram por desidratação em três banhos em álcool etílico p.a., permanecendo uma hora em cada um, seguidos da diafanização em dois banhos em xileno p.a., permanecendo 15 minutos em cada um. Na fase de embebição em parafina histológica fundida permaneceram em estufa a 56°C por 1 hora. A emblocagem foi feita em moldes plásticos contendo parafina histológica fundida. Os cortes histológicos de cinco a sete micrômetros foram feitos em micrótomo American Optical, Modelo 820, Série 42492.

As lâminas com os cortes seriados foram submetidas à quatro colorações: Hematoxilina-Eosina, universal para tecidos; Tricrômico de Mallory e Tricrômico de Shorr, para fibras conjuntivas e fibras musculares e Azul de Toluidina para mucopolissacarídeos.

### 3 RESULTADOS

Foi possível identificar algumas diferenças entre as populações caninas estudadas para *Dirofilaria immitis* em Guaratuba. O número de cães analisados no Canil Municipal foi maior que no Bairro, apesar de abranger o mesmo período de estudo. Entre os grupos observaram-se diferenças ainda com relação ao percentual de machos e fêmeas e porte.

#### 3.1 Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães do Canil Municipal de Guaratuba,

Foram analisadas amostras de sangue de 164 cães como resultado do serviço de captura pelo município no período de 12 meses. Deste total, 82 animais eram do sexo masculino e 82 do sexo feminino (Figura 6). Os animais SRD foram a maioria, 92,7%, variando entre um e dois o número de cães mestiços e com raça. Por esse motivo, a pelagem apresentou diversos padrões de coloração, sendo mais comuns o padrão bege, tricolor, preto/branco e preto/bege somando 57,3% dos animais. As idades variaram entre um e quinze anos, prevalecendo os animais de doía a quatro anos, 72,56% (Figura 7). A maioria era de porte pequeno e médio, totalizando 89,63% (Figura 8).

As amostras de sangue avaliadas através do exame direto à fresco, teste de Knott modificado e *Snap® Test* revelaram apenas um cão positivo para *Dirofilaria immitis*, com aproximadamente seis anos de idade, porte médio e pelagem dourada, ou seja acusando prevalência de 0,6% de infecção por *Dirofilaria immitis* nos cães errantes capturados pelo Serviço Municipal.

A prevalência de *Dipetalonema sp.* atingiu 11,6% dos animais capturados, sendo oito fêmeas e onze machos em todo o período de abrangência do estudo. Houve grande diferença fenotípica, porte, pelagem e também idade.

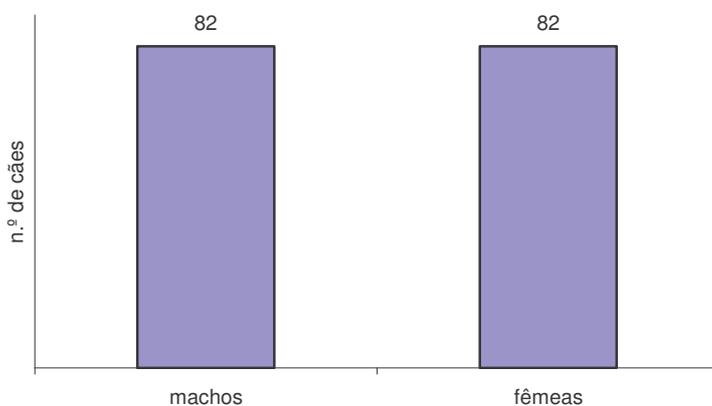


Figura 6. Frequência de cães machos e fêmeas avaliados para microfírias de *Dirofilaria immitis* no Canil Municipal de Guaratuba, PR, no período de 12 meses entre maio de 2001 e abril de 2002.

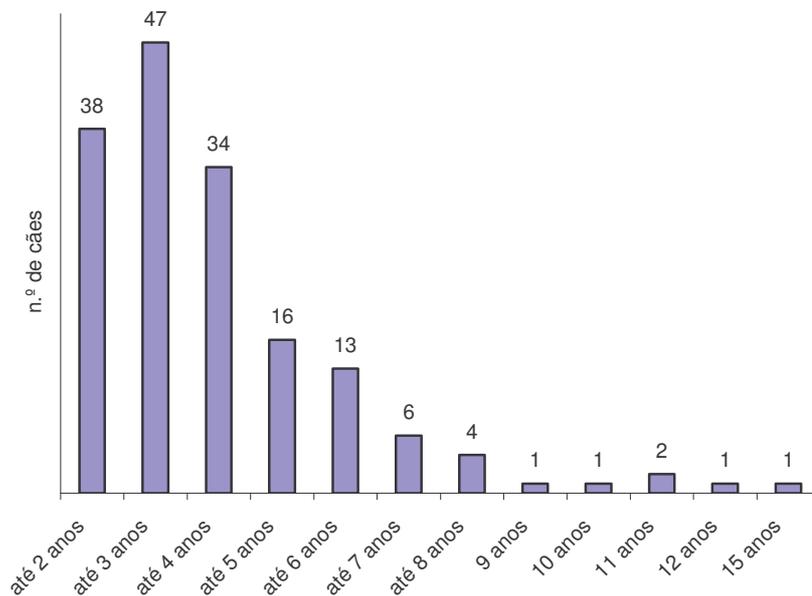


Figura 7. Idade dos cães avaliados para microfírias de *Dirofilaria immitis* no Canil Municipal de Guaratuba, PR, no período de 12 meses entre maio de 2001 e abril de 2002.

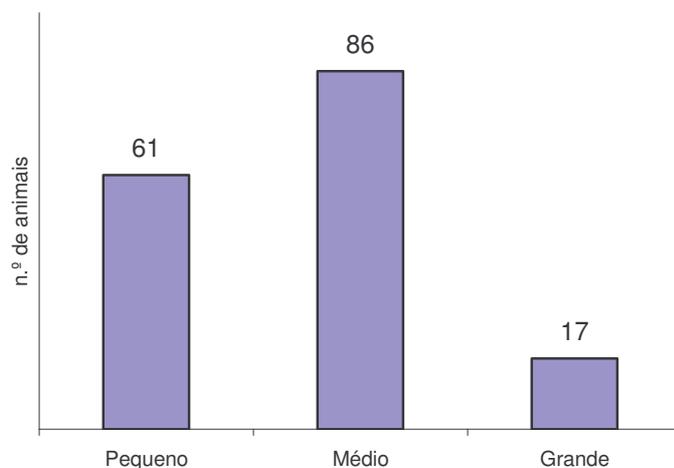


Figura 8. Porte dos cães avaliados para microfilárias de *Dirofilaria immitis* no Canil Municipal de Guaratuba, PR, no período de 12 meses entre maio de 2001 e abril de 2002.

### 3.2 Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães domiciliados do Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR

A prevalência atingiu 4,2% dos cães domiciliados investigados no Bairro COHAPAR II.

Do total de 71 cães avaliados, 44 animais eram do sexo masculino e 27 do sexo feminino (Figura 9). Prevaleram os cães SRD, 95,7%, sobre os demais animais com raça. Desta forma a pelagem apresentou diferentes padrões de coloração onde os mais comuns foram o preto, o branco, preto/branco e bege somando 52,1% dos animais. As idades variaram entre um e treze anos, e os cães com até quatro anos formaram 71,8% da população avaliada (Figura 10). A maioria era de porte pequeno e médio, totalizando 95,5% dos animais do grupo (Figura 11) (Apêndice 03).

Neste grupo de 71 animais, três cães foram diagnosticados positivos para *Dirofilaria immitis*. As amostras de sangue do cão n.º 21, macho, com quatro anos de idade, porte pequeno e pelagem preta, e do cão n.º 63, macho, com três anos, porte pequeno e pelagem

branca reagiram positivamente apenas ao *Snap® Test*, acusando resultado negativo no exame direto à fresco e teste de Knott modificado. A amostra de sangue do cão Lobo, nº. 55, analisada através do exame direto a fresco, teste de Knott modificado e *Snap® Test* reagiu de forma positiva para os três testes.

No mesmo grupo de cães a prevalência para *Dipetalonema sp.* foi de 5,6%, um pouco superior ao atingido por *Dirofilaria immitis*. Todos eram do sexo masculino, SRD, com idade entre dois anos e cinco anos e meio, de porte médio. Os casos positivos ficaram restritos aos meses de maio e julho.

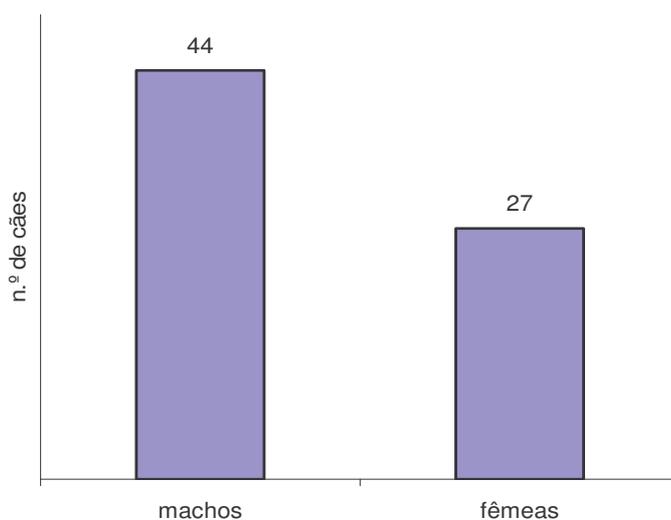


Figura 9. Frequências de cães machos e fêmeas avaliados para microfilárias de *Dirofilaria immitis* no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR, no período de 12 meses, entre maio de 2002 e abril de 2003.

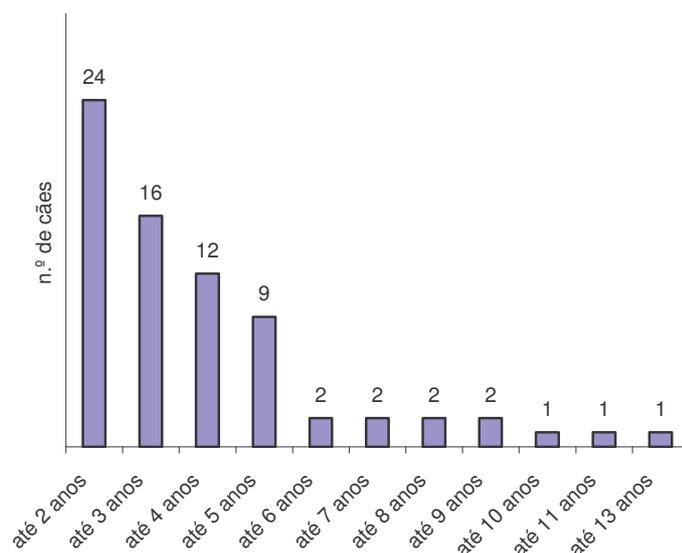


Figura 10. Idade dos cães avaliados para microfilárias de *Dirofilaria immitis* no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR, no período de 12 meses, entre maio de 2002 e abril de 2003.

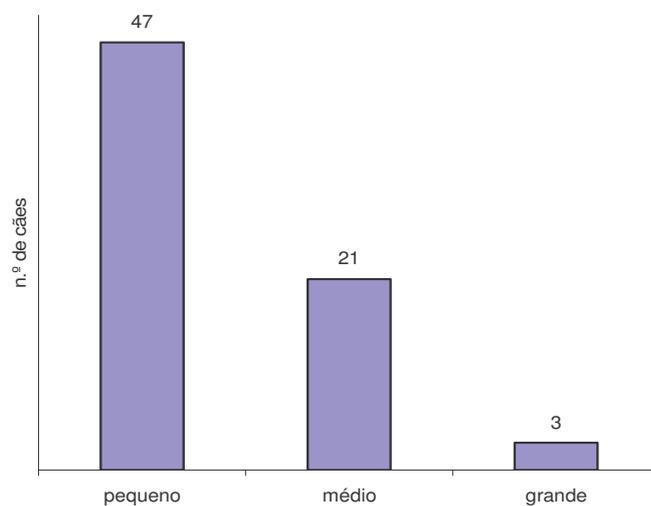


Figura 11. Porte dos cães avaliados para microfilárias de *Dirofilaria immitis* no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR, no período de 12 meses, entre maio de 2002 e abril de 2003.

### 3.3 Acompanhamento clínico dos cães positivos para *Dirofilaria immitis*

#### 3.3.1 Avaliação clínica do cão “Diro” do Canil Municipal de Guaratuba.

Foi diagnosticado com dirofilariose um cão macho, sem raça definida, de porte médio e pelagem dourada, com aproximadamente seis anos de idade capturado pelo serviço municipal de Guaratuba, o qual foi denominado de “Diro”.

A amostra de sangue do cão “Diro”, nº. 162, analisada simultaneamente através do exame direto à fresco, teste de Knott modificado e *Snap® Test* reagiu de forma positiva para *Dirofilaria immitis* nos três testes. O cão foi transferido para o canil de isolamento em São José dos Pinhais e submetido aos exames clínico geral, parasitológico, radiológico e de ultra-som, além da repetição dos exames para *Dirofilaria immitis* e hemograma (Figura 12). Os exames clínicos e respectivos exames laboratoriais foram repetidos entre maio de 2002 e julho de 2004 totalizando quatro avaliações (Quadro 2)

##### Avaliação n.º 1 em abril de 2002

- Exame clínico: o estado geral era bastante debilitado; havia alopecia difusa e lesões cutâneas perfurantes de origem traumática na região cervical. As mucosas estavam hipocoradas.
- Hemograma: Observou-se anemia regenerativa. Havia plaquetas aumentadas em número e tamanho, neutrofilia, eosinofilia e monocitose.
- Exame direto de sangue à fresco: A microfilaremia média era de 68 microfílarias de *Dirofilaria immitis*/100µl de sangue.
- Teste de Knott modificado: Positivo para microfílarias de *Dirofilaria immitis*.
- *Snap® Test*: Positivo para antígeno de *Dirofilaria immitis*.
- Parasitológico de pele: Foram observadas infestações por *Sarcoptes scabiei var. canis*, *Trichodectes canis*, *Ctenocephalides canis*. Para combater as parasitoses o

animal foi submetido ao tratamento tópico de três banhos com amitraz em intervalos de 30 dias entre cada um deles.

- Coproparasitológico: Fezes eram escuras e pastosas. Através dos exames de fezes de flutuação e sedimentação foram identificados ovos de *Ancylostoma sp.*, *Toxocara canis* e *Trichuris vulpis*. Foi feito o tratamento oral com três doses de pamoato de pirantel administrado mensalmente.
- Exame radiográfico: Aumento de contato de coração direito com o esterno (aumento do ventrículo direito), deslocamento dorsal de terço distal da traquéia. Na projeção ventrodorsal observou-se coração em “D” invertido (aumento do ventrículo direito). Em campos pulmonares não foram observadas alterações radiográficas evidentes (Figura 13).
- Exame de ultra-som : Não foram observadas alterações evidentes

#### **Avaliação n.º 2 em abril de 2003, treze meses depois**

- Exame clínico: condição física, atitude e postura normais; mucosas normocoradas e ausência de edema de extremidades; padrão respiratório normal com frequência de 30 movimentos por minuto e ausência de tosse; jugulares não dilatadas e com ausência de pulso. Percussão cardíaca revelou o coração em seus limites normais; percussão de campos pleuro-pulmonares normal. Ausculta pulmonar normal. Ausculta cardíaca revelou hiperfonese da segunda bulha com eventuais desdobramentos. Percussão e palpação abdominais revelaram hepatomegalia (fígado a 1,5 cm do rebordo costal) e esplenomegalia (baço na fossa inguinal esquerda)
- Hemograma: os valores do sangue estavam compatíveis com os de referência. Não foram observadas microfilárias de *Dirofilaria immitis*.

- Exame direto de sangue à fresco: ausência de microfilárias de *Dirofilaria immitis*.
- Teste de Knott modificado: ausência de microfilárias de *Dirofilaria immitis*.
- *Snap® Test* : Positivo para antígeno de *Dirofilaria immitis*.
- Parasitológico de pele: Negativo
- Coproparasitológico: Negativo
- Exame radiográfico: Não houve evolução no quadro das alterações observadas anteriormente no coração e nos pulmões.
- Exame de ultra-som: Não foram observadas alterações evidentes

**Avaliação n.º 3 em outubro de 2003, dezanove meses depois**

- Exame clínico: O padrão do exame físico manteve-se o mesmo.
- Hemograma: os valores do sangue estavam compatíveis com os de referência.
- Exame direto de sangue à fresco: ausência de microfilárias de *Dirofilaria immitis*.
- Teste de Knott modificado: ausência de microfilárias de *Dirofilaria immitis*.
- *Snap® Test*: Negativo para antígeno de *Dirofilaria immitis*.
- Parasitológico de pele: Negativo
- Coproparasitológico: Negativo
- Exame radiográfico: Não houve evolução no quadro das alterações observadas anteriormente no coração. Campos pulmonares apresentaram discreto padrão intersticial miliar em lobos dorso-caudais e mediais compatível com calcificação de brônquios em cão idoso. (Figura 13)
- Exame de ultra-som: Não foram observadas alterações evidentes

**Avaliação n.º 4 em julho de 2004, 27 meses depois**

- Exame clínico: O padrão do exame físico manteve-se o mesmo.

- Hemograma: os valores do sangue estavam compatíveis com os de referência. Não foram observadas microfilárias de *Dirofilaria immitis*.
- Exame direto de sangue a fresco: ausência de microfilárias de *Dirofilaria immitis*.
- Teste de Knott modificado: ausência de microfilárias de *Dirofilaria immitis*.
- *Snap® Test* : Negativo para antígeno de *Dirofilaria immitis*.
- Parasitológico de pele: Negativo
- Coproparasitológico: Negativo
- Exame radiográfico: Aumento de contato de coração direito com o esterno (aumento do ventrículo direito), endireitamento da silhueta cardíaca caudal com discreta proeminência de átrio esquerdo, deslocamento dorsal da traquéia. Na projeção ventrodorsal observa-se coração em “D” invertido (aumento do ventrículo direito). Campos pulmonares com padrão intersticial miliar em lobos dorso-caudais e mediais, compatíveis com calcificação de brônquios em animais idosos (Figura 13).
- Exame de ultra-som: Não foram observadas alterações evidentes (Figura 14).

QUADRO 2 - Demonstrativo das avaliações clínicas, laboratoriais e de imagem entre maio de 2002 e julho de 2004 do cão "Diro" positivo para *Dirofilaria immitis*, proveniente do Canil Municipal de Guaratuba, PR.

	<b>Abril 2002</b>	<b>Abril 2003</b>	<b>Outubro 2003</b>	<b>Julho 2004</b>
<b>Exame clínico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estado geral debilitado</li> <li>• Lesões cutâneas alopecicas e perfurantes</li> <li>• Mucosas hipocrômicas</li> <li>• Hiperfonese da 2ª. bulha</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Condições físicas normais</li> <li>• Mucosas normocoradas</li> <li>• Hiperfonese da 2ª. bulha</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem alterações do padrão apresentado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem alterações do padrão apresentado</li> </ul>
<b>Hemograma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia regenerativa</li> <li>• Neutrofilia, eosinofilia, monocitose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compatível com os valores de referência</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compatível com os valores de referência</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compatível com os valores de referência</li> </ul>
<b>Exame direto de sangue a fresco</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo para microfírias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>
<b>Teste de Knott modificado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo para microfírias de <i>D. immitis</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>
<b>Snap® Test</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo para <i>D. immitis</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo para <i>D. immitis</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>
<b>Parasitológico de pele</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sarcoptes scabiei var. canis</i></li> <li>• <i>Trichodectes canis</i></li> <li>• <i>Ctenocephalides canis</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>
<b>Coproparasitológico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Escuras e pastosas</li> <li>• <i>Ancylostoma sp.</i></li> <li>• <i>Toxocara canis</i></li> <li>• <i>Trichuris vulpis</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo</li> </ul>
<b>Exame Radiográfico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de ventrículo direito do coração</li> <li>• Deslocamento dorsal do terço distal da traquéia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem evolução das alterações cardíacas</li> <li>• Discreto padrão intersticial miliar em pulmão.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem evolução das alterações cardíacas</li> <li>• Discreto padrão intersticial miliar em pulmão.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de ventrículo direito e discreta proeminência de átrio esquerdo.</li> <li>• Padrão intersticial miliar em pulmão.</li> </ul>
<b>Exame de Ultra-som</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem alterações cardíacas evidentes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem alterações cardíacas evidentes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem alterações cardíacas evidentes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem alterações cardíacas evidentes.</li> </ul>

Na avaliação da periodicidade observou-se não haver variação significativa no número de microfilárias durante o dia, classificando este cão como manifestação aperiódica da densidade das microfilárias. A microfilaremia foi avaliada mensalmente, totalizando 14 análises. Nas duas análises iniciais a contagem média de microfilárias variou entre 65 e 68 unidades/100µl de sangue. A partir da terceira análise observou-se diminuição progressiva do número de microfilárias circulantes. Tendo em vista a ausência de microfilárias nas duas últimas análises, o animal foi doado para uma família, retornando para as avaliações n.º 3 e n.º 4, em outubro de 2003 e julho de 2004 respectivamente. (Figura 15)



Figura 12. A. "Diro", cão microfilarêmico positivo para *Dirofilaria immitis*, diagnosticado no Canil Municipal de Guaratuba, PR. B. Canil de isolamento da Unidade Hospitalar para Animais de Companhia da PUCPR, Curitiba, PR. C. Venopunção. D. Microfilária de *Dirofilaria immitis* em exame direto à fresco. E. Microfilária em Teste de Knott modificado. F. *Snap® Test* positivo

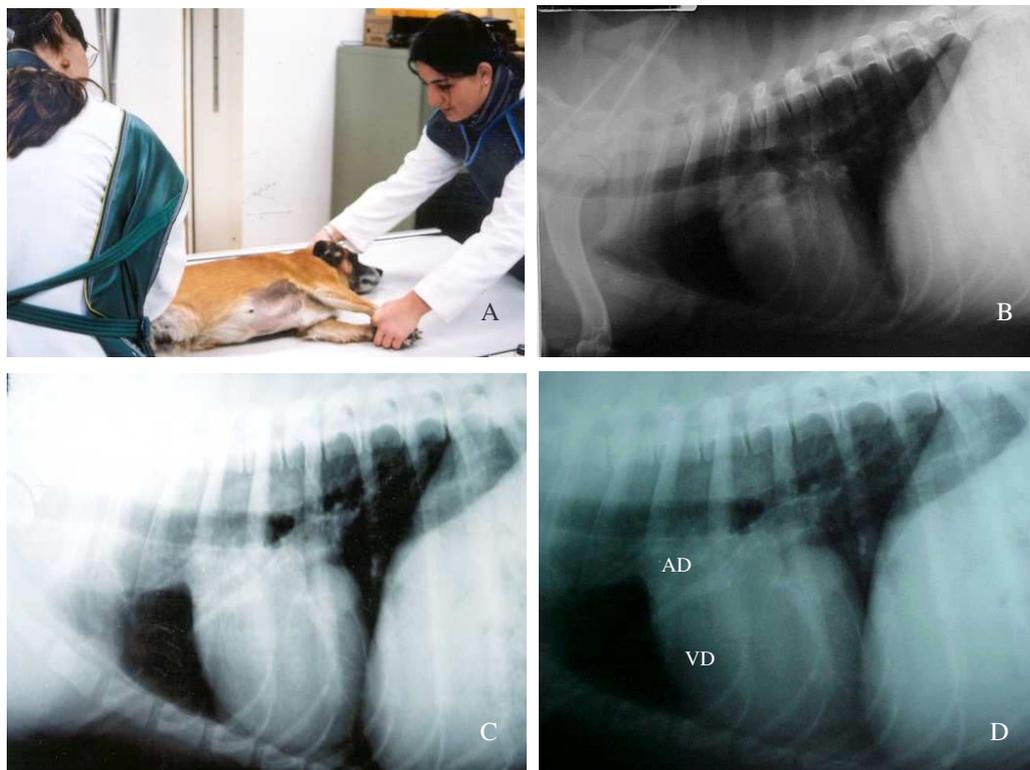


Figura 13. Exames complementares do “Diro” cão microfilarêmico positivo para *Dirofilaria immitis*, diagnosticado no Canil Municipal de Guaratuba, PR. A. Preparo para o exame radiológico. B. RX n.º 1 realizado em abril de 2002 com aumento do VD do coração. C. RX n.º 3 realizado em outubro de 2003, 19 meses após, sem evolução do quadro. D. RX n.º 4 realizado em junho de 2004, após 27 meses, com aumento do VD e discreta proeminência do AD.



Figura 14. Exames complementares de “Diro”, cão microfilarêmico positivo para *Dirofilaria immitis*, diagnosticado no Canil Municipal de Guaratuba, PR. A e B. Exame de ultra-som no UHVAC/PUCPR. C. Resultado do exame de ultra-som realizado na Avaliação n.º 4, em julho de 2004, sem alterações evidentes.

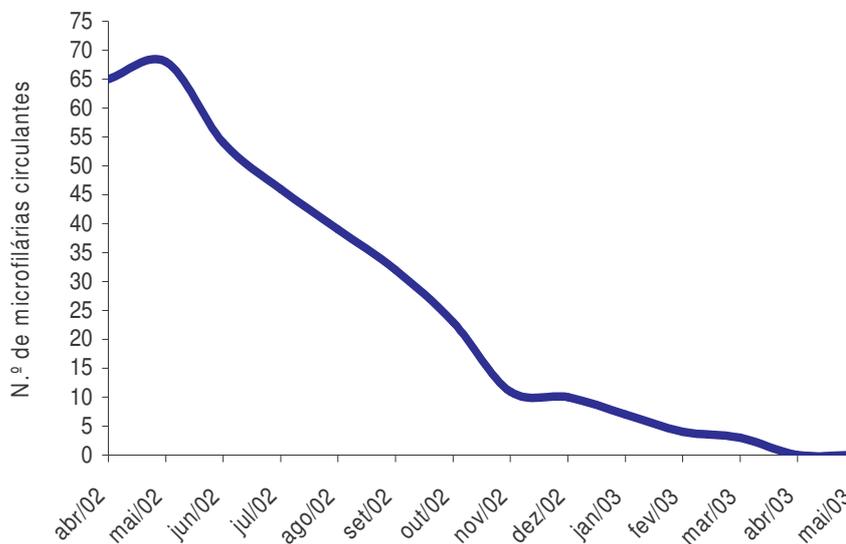


Figura 15. Número de microfíliárias circulantes de *Dirofilaria immitis* detectadas nas avaliações mensais de “Diro”, detectado no Canil Municipal de Guaratuba, PR. e mantido no UHVAC/PUCPR.

### 3.3.2 Bairro COHAPAR II

Foi diagnosticado microfilarêmico de dirofilariose um cão macho, SRD, de porte médio e com pelagem cinza, com aproximadamente 10 anos de idade, denominado “Lobo”, pertencente ao Senhor Romalino José Costa e Sra. Claudia H. Xisto. A amostra de sangue do cão Lobo, n.º 55, analisada através do exame direto à fresco, teste de Knott modificado e *Snap® Test* reagiu de forma positiva para *Dirofilaria immitis* nos três testes (Figura 16). Durante as avaliações mensais do cão, seu estado geral era de um animal magro, com pelagem áspera e sem brilho. Na última avaliação houve depressão evidente do estado geral. O animal encontrava-se debilitado e acentuadamente magro, permanecendo em decúbito a maior parte do tempo. Poucos dias após o animal veio a óbito, e foi submetido ao exame anatomopatológico com a devida permissão dos proprietários.

Ao total foram feitas 14 análises do sangue, sendo a média da primeira análise de 70 microfilárias/100µl de sangue. Na segunda análise, o número de microfilárias diminuiu para 43/100µl de sangue, havendo redução progressiva do número de microfilárias nas análises posteriores. Por ocasião do óbito, na última avaliação, em fevereiro de 2004, a média ficou em 4 microfilárias/100µl de sangue.(Figura 17)

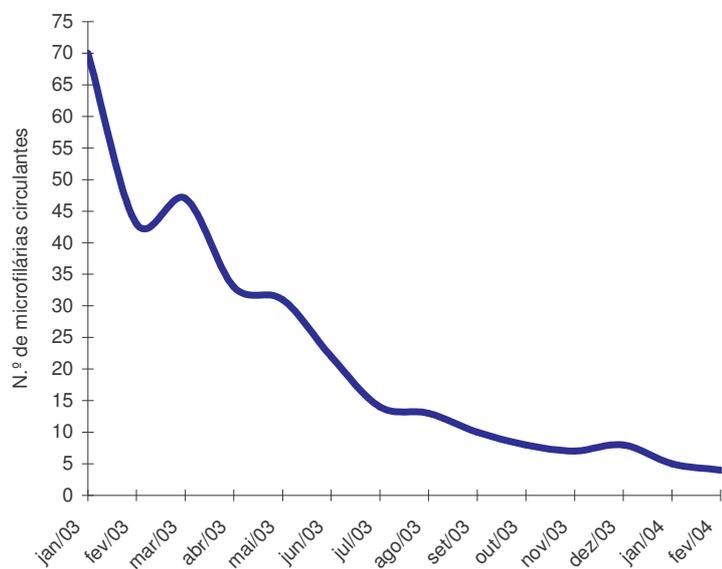
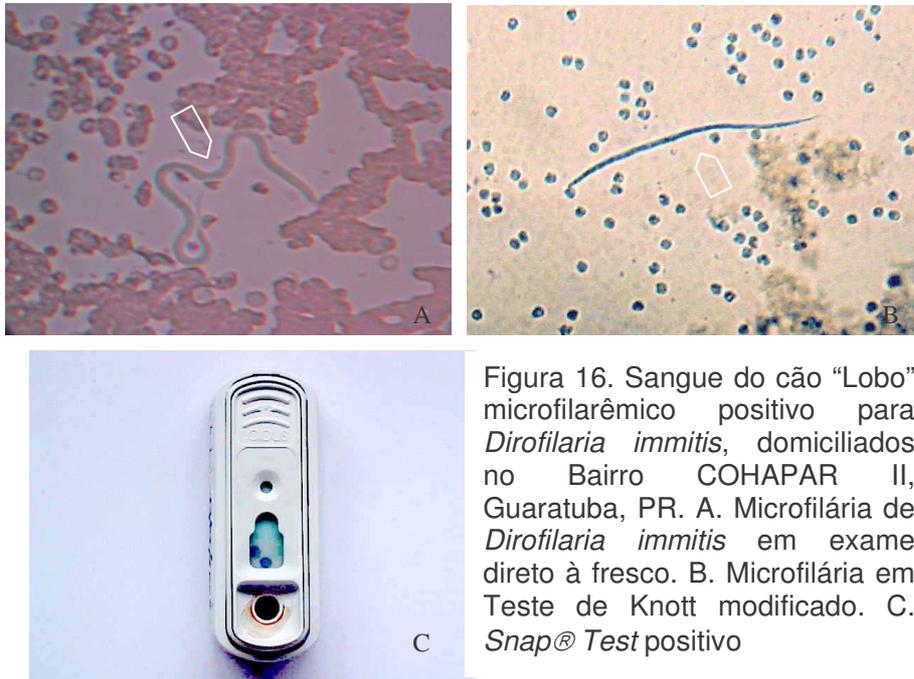


Figura 17. Número de microfíliárias circulantes de *Dirofilaria immitis* detectadas nas avaliações mensais de “Lobo”, domiciliado no Bairro COHAPAR, Guaratuba, PR.

Ao exame necroscópico observou-se externamente que o animal era acentuadamente magro, com pelagem áspera e sem brilho, com áreas difusas de alopecia. Existiam úlceras cutâneas recobertas por crostas, de tamanhos variáveis, com diferentes localizações. A mucosa oral era acentuadamente pálida, existia fibromatose gengival e ausência de dentes incisivos. Alguns dentes eram fraturados e irregularmente desgastados, com presença de tártaro. O edema pulmonar era moderado e havia líquido sero-bolhoso na luz da traquéia até a sua porção média. Existia hidropericárdio e não foram observados exemplares adultos de *Dirofilaria immitis* no coração e em vasos da base. Em átrio direito, o endocárdio apresentava pequena área de coloração pálida (Figura 18). Não existia alimento no estômago e o conteúdo intestinal era escasso e apenas na porção final. Os rins apresentavam espessamento focal das cápsulas que estavam aderidas ao parênquima nesta área. A vesícula urinária estava preenchida por urina de coloração amarela escura. Nos demais órgãos não existiam alterações macroscópicas evidentes.

Ao exame microscópico, nos cortes de pele observou-se dermatite ulcerativa moderada. O coração apresentou áreas com degeneração gordurosa, necrose focal e hipertrofia de miócitos isolados. No pulmão havia edema moderado e antracose. Também se observou nefrite intersticial não purulenta focal, nefrose moderada e micrólitos na medular renal. No fígado havia necrose focal e degeneração gordurosa e fibrose ao redor da veia centro-lobular. Em parótida existia severa reação inflamatória purulenta sendo observados cortes de microfilárias no parênquima e no interior de vaso (Figura 19). Também existia hiperplasia parenquimatosa focal na tireóide e enterite catarral descamativa. Observou-se orquite não purulenta multifocal, e degeneração testicular com azoospermia.



Figura 18. Exame necrscópico do cão microfilarêmico positivo para *Dirofilaria immitis*, diagnosticado no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR. A. Animal magro e com lesões cutâneas (seta). B. Mucosa oral pálida e dentes fraturados. C. Aspecto geral interno do cadáver. D. Hidropericárdio. E. Áreas pálidas no miocárdio em AD (circulo).

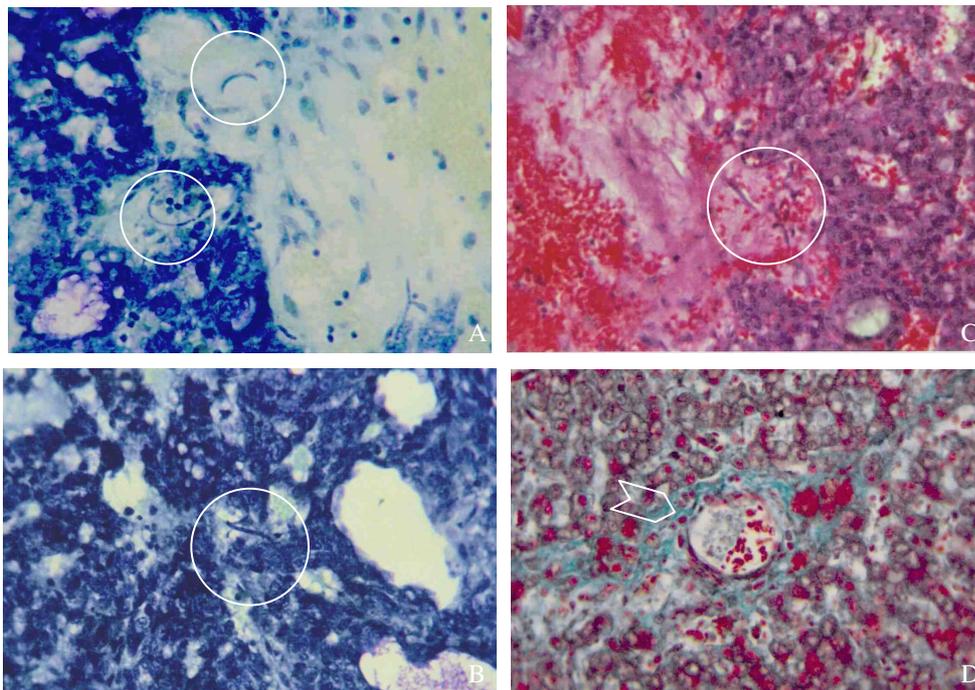


Figura 19. Exame histopatológico do cão microfilarêmico positivo para *Dirofilaria immitis*, diagnosticado no Bairro COHAPAR II, Guaratuba, PR. A/B. Parótida com cortes de microfílarias (círculo). Azul de Toluidina. Obj.40x. C. Parótida com cortes de microfílarias. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40x. D. Fígado com fibrose centro-lobular (seta). Tricrômico de Shorr. Obj. 40x.

### 3.4 Pesquisa de cristais de oxihemoglobina em intestino médio de *Culex quinquefasciatus*

No exame direto do conteúdo do intestino médio de exemplares de *Culex quinquefasciatus* após uma hora do repasto observaram-se numerosas estruturas sólidas, filiformes e pontiagudas, relativamente refringentes, compatíveis com os cristais de hemoglobina descritos na literatura (Figura 20).

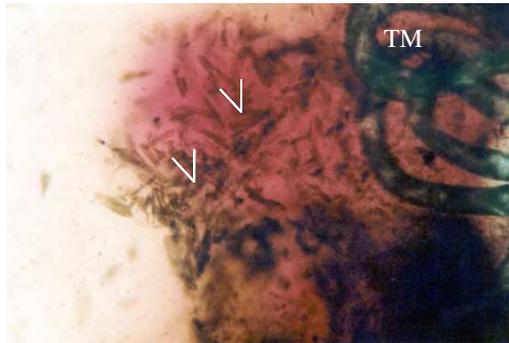


Figura 20. *Culex quinquefasciatus*. Exame microscópico direto do conteúdo do intestino médio, após uma hora do repasto em cão, onde se observam cristais de hemoglobina (seta) e túbulos de Malpighi (TM). Corante de Shorr. Obj. 10x.

### 3.5 Aspectos histológicos do intestino médio, intestino posterior e ovários de *Culex quinquefasciatus*

#### A) Fêmeas com 24 horas de vida e sem repasto

Em corte longitudinal da região abdominal observa-se parte da região posterior do intestino médio com conteúdo amorfo preenchendo parcialmente a luz, o que não está presente no intestino posterior, separado pelo piloro. No reto também não existe conteúdo. Alças de túbulos de Malpighi são observados em cortes longitudinais e transversais e os ovariolos estão situados em posições opostas junto à parede, entre essas alças (Figura 21).

A região anterior do intestino médio é revestida por monocamada de epitélio regular composto por células cúbicas com tamanho médio de 8,1  $\mu\text{m}$  e núcleo arredondado, cromatina granulosa e nucléolo único e evidente. A superfície apical das células está revestida por microvilosidades medindo 4,1  $\mu\text{m}$  em média. O epitélio da região posterior do intestino médio também é uma monocamada, com aspecto pseudoestratificado, com espessura variando entre 12,2 e 16,2  $\mu\text{m}$ . As células em geral são alongadas, com núcleo único e ovalado localizado em diferentes níveis, nucléolo único e central. A porção apical das células está revestida por microvilosidades medindo em média 4,1  $\mu\text{m}$ . O conteúdo do intestino médio em geral é aglutinado e com aspecto amorfo, variando em quantidade de escasso a moderado. O intestino posterior não apresenta conteúdo e observam-se projeções papilares revestidas por monocamada de epitélio com espessura média de 8,1  $\mu\text{m}$ , conferindo aspecto enrugado à luz. As células têm forma e tamanho irregulares com núcleo único e ligeiramente alongado e

nucléolo evidente. As vilosidades apicais possuem tamanho médio de 4,1  $\mu\text{m}$ . No reto não há conteúdo e são observadas apenas as glândulas anexas retais que se projetam para a luz (Figura 22).

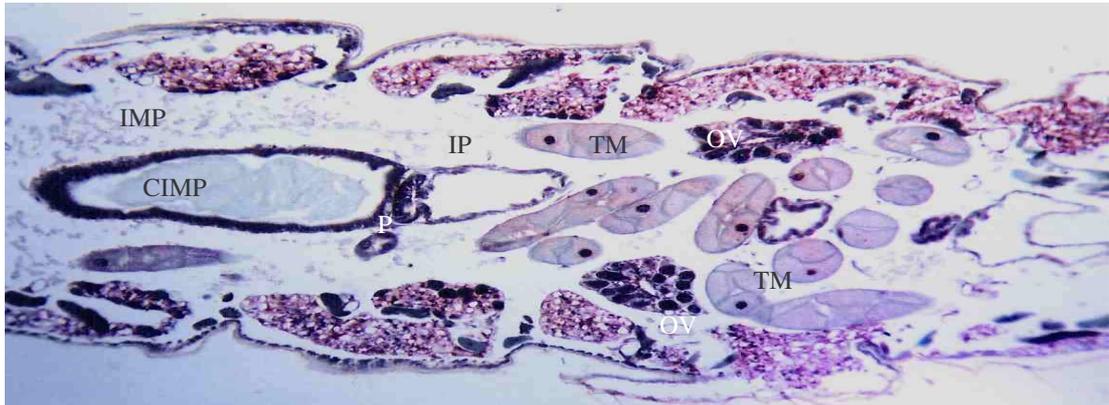


Figura 21. *Culex quinquefasciatus*, fêmea com 24 horas de vida e sem repasto. Corte longitudinal da região abdominal. Região posterior do intestino médio (IMP). Conteúdo do IMP (CIMP). Intestino posterior (IP) Túbulos de Malpighi (TM). Píloro (P). Ovariolo (OV). Hematoxilina-Eosina, Obj.10x.

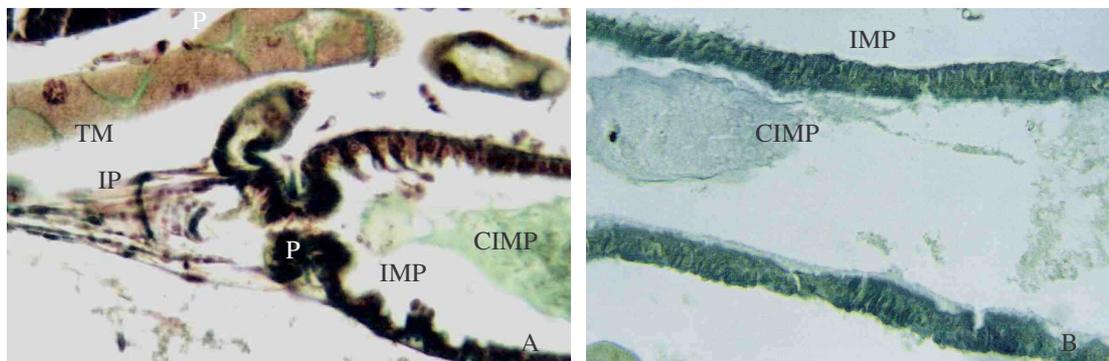


Figura 22. *Culex quinquefasciatus*, fêmea com 24 horas de vida e sem repasto. Corte longitudinal da região abdominal. Intestino médio posterior (IMP). Conteúdo do IMP (CIMP). Intestino posterior (IP) Túbulos de Malpighi (TM). Píloro (P). Glândulas retais (Gr). Reto (R). A/B. Tricrômico de Shorr. Obj. 40x. C. Tricrômico de Mallory. Obj.10x.

Os ovários são estruturas alongadas revestidas pela bainha ovariana. Apresentam numerosos ovaríolos posicionados radialmente ao redor do cálice, estrutura tubular revestida internamente por epitélio plano. Nos ovaríolos são observados os trofócitos, células volumosas com citoplasma denso e núcleo hipercromático, não sendo possível diferenciar do oócito. Cada ovaríolo está limitado por uma bainha que em microscopia de luz está representada por tecido conjuntivo denominada de túnica (Figuras 23).

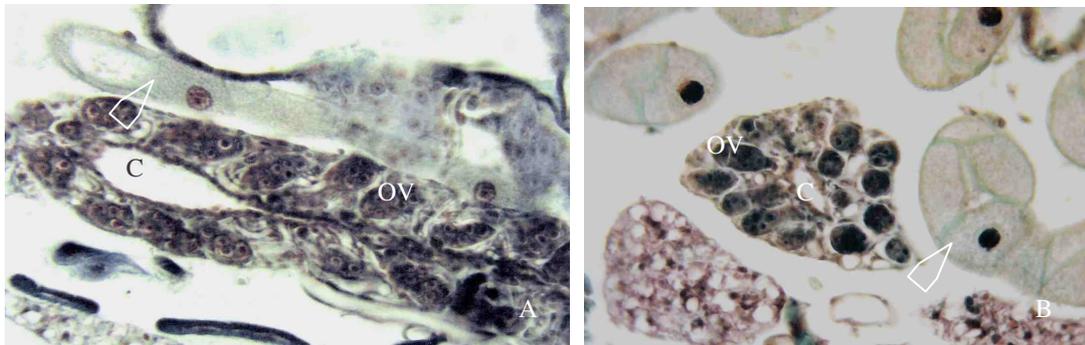


Figura 23. *Culex quinquefasciatus*, fêmea com 24 horas de vida e sem repasto. Células dos Túbulos de Malpighi (seta). Ovaríolo (OV). Cálice (C). Tricrômico de Shorr. Obj. 40x.

#### B) Fêmeas com 48 horas de vida e pós-repasto imediato

Após a hematofagia, a alteração mais evidente é a dilatação da região posterior do intestino médio pelo sangue ingerido, do qual é possível se reconhecer eritrócitos e leucócitos ainda íntegros. A região anterior do intestino médio mantém o aspecto do epitélio regular composto por células cúbicas com tamanho médio de 8,1  $\mu\text{m}$ . As células epiteliais de revestimento da região posterior do intestino médio estão distendidas lateralmente medindo em média 8,1  $\mu\text{m}$ , mantendo as vilosidades de 4,1  $\mu\text{m}$ .

Nos ovários, observam-se ovaríolos com folículos compostos por trofócitos e oócito circundados pelo epitélio folicular simples. Pode-se observar os ovaríolos conectados ao cálice pelo pedículo composto por células pequenas, cúbicas e núcleo hipercromático. (Figura 24)

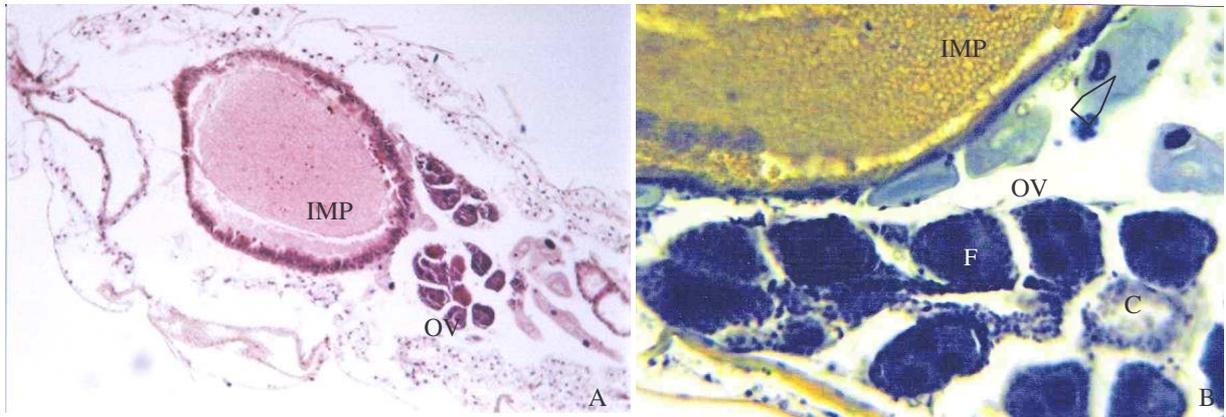


Figura 24. *Culex quinquefasciatus*, fêmeas com 48 horas de vida e pós-repasto imediato. Região posterior do intestino médio distendido por sangue (IMP). Células dos Túbulos de Malpighi (seta). Ovariolo (OV). Cálice (C). Folículos com trofócitos e oócitos (F). A. Hematoxilina-Eosina, Obj.4x. B. Tricrômico de Mallory. Obj. 40x.

#### C) Fêmeas com 72 horas de vida e 24 horas pós-repasto

Após 24 horas do repasto se observa na porção posterior do intestino médio que o sangue ingerido está envolto pela membrana peritrófica, formando uma massa compacta com coloração variando de marrom a negra, na qual não é mais possível reconhecer os componentes celulares sanguíneos ingeridos. (Figura 25 A e C). O epitélio de revestimento da região posterior do intestino médio volta a adquirir o aspecto pseudoestratificado com espessura média de 12,2  $\mu\text{m}$  e vilosidades com 8,1  $\mu\text{m}$ .

Em alguns exemplares o conteúdo digerido era também observado no intestino posterior e no reto. Apesar de estarem dilatados, no intestino posterior estavam mantidas as projeções papilares e o aspecto enrugado da luz. Também não foram observadas alterações na forma e tamanho das células de revestimento e respectivas vilosidades (Figura 25 B).

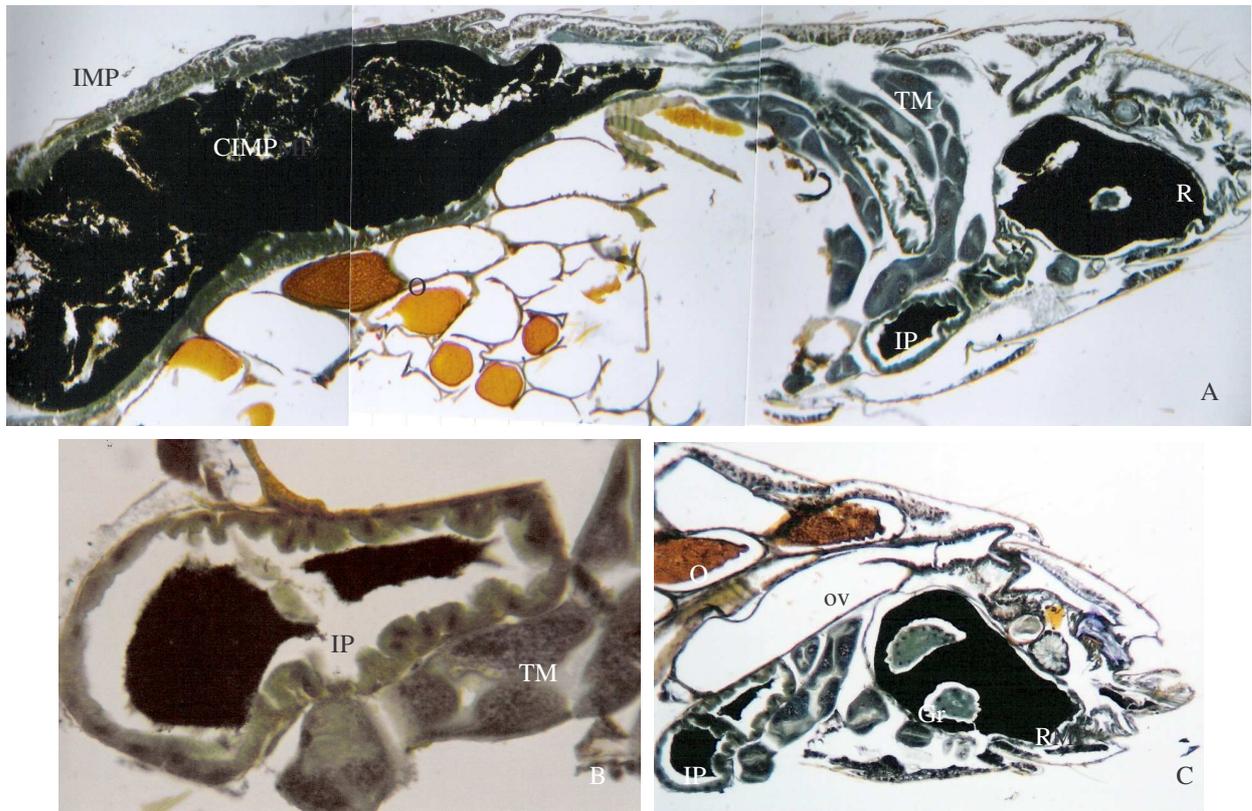


Figura 25. *Culex quinquefasciatus*, fêmeas com 72 horas de vida e após 24 horas do repasto. A. O abdômen está distendido por óvulos (O). Região posterior do intestino médio (IMP) com conteúdo envolvido pela matriz peritrófica, de coloração negra (CIMP), também presente no intestino posterior (IP) e no reto (R). B. Intestino posterior (IP) com projeções papilares revestidas por células epiteliais e conteúdo negro digerido, adjacente ao túbulo de Malpighi em corte longitudinal. C. Intestino posterior (IP) e reto (R) com conteúdo digerido negro. Observam-se cortes das glândulas do reto (Gr), óvulos (O) e oviduto (ov) ). A/C. Tricrômico de Mallory. Obj.4x. B. Tricrômico de Shorr. Obj. 40x.

O processo de oogênese mostrou estar em diferentes estágios de desenvolvimento ovariano. Em alguns exemplares observou-se a fase de folículo com oócito maduro (Figura 26). Em outros exemplares grande parte da cavidade abdominal estava distendida pelos ovários com ovos de forma elíptica (Figura 25A) e envoltos pelo corio composto por células angulares, de citoplasma homogêneo e núcleo pouco visível (Figura 27D). No interior dos ovos o vitelo era representado por estruturas circunscritas de tamanho variável e fortemente impregnadas pelos

diferentes corantes utilizados. (Figura 27C). Também foi possível observar ovos no oviduto (Figura 27A) e a espermateca repleta de espermatozoides, adjacente à glândula acessória secretora do envelope do ovo.(Figura 27B/D).

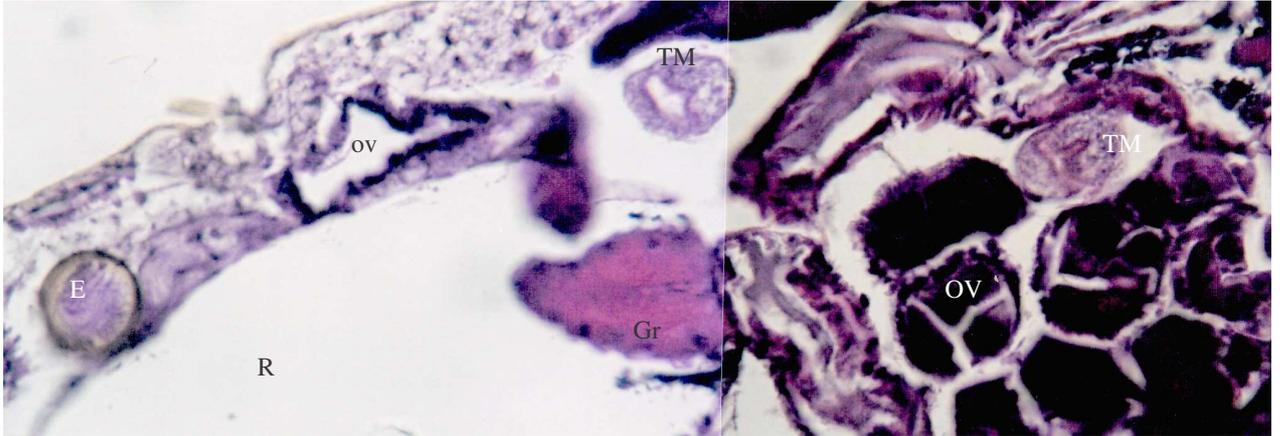


Figura 26. *Culex quinquefasciatus*, fêmeas com 72 horas de vida e após 24 horas do repasto. Região abdominal mostrando parte do ovário com ovaríolos (OV) em fase de oócito maduro. No reto (R) não há conteúdo ainda e observa-se glândula anexa do reto (Gr) projetando-se para a luz. Túbulos de Malpighi (TM) em corte transversal. Oviduto (ov) e espermateca com espermatozoides (E). Hematoxilina-Eosina, Obj.10x.

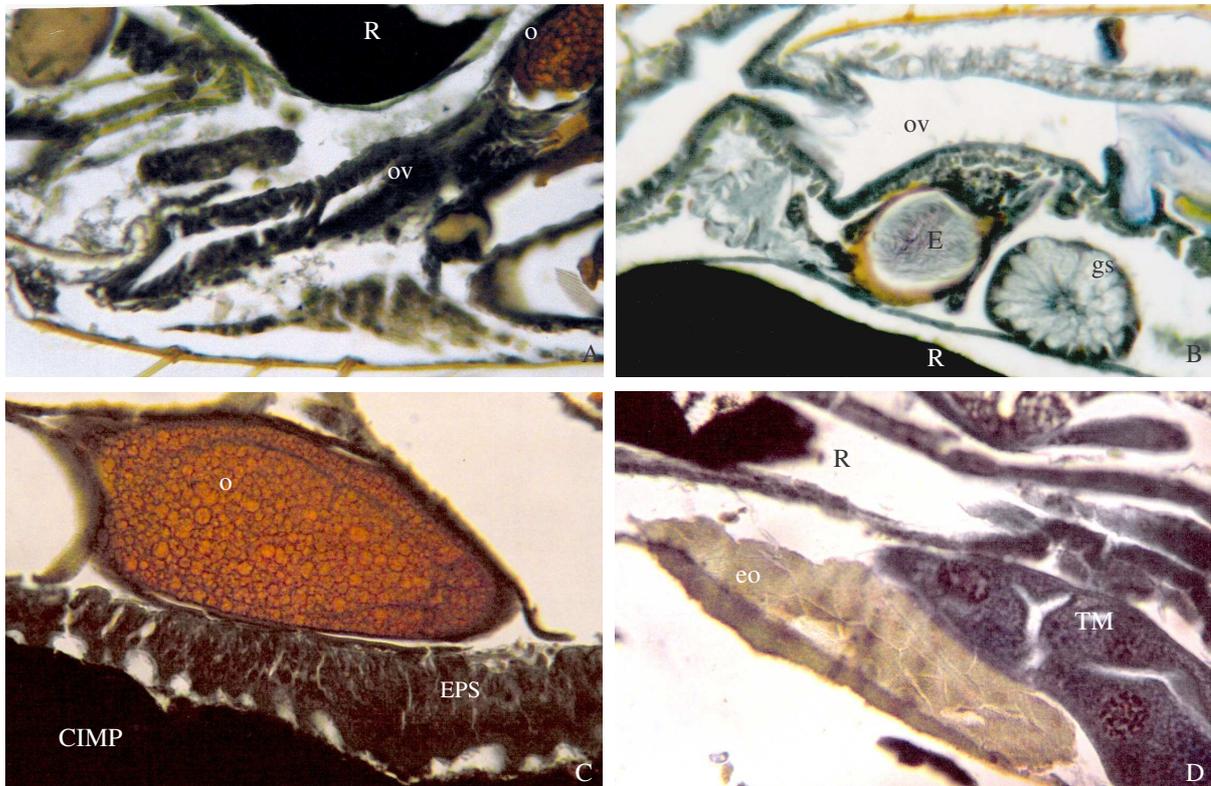


Figura 27. *Culex quinquefasciatus*, fêmeas com 72 horas de vida e após 24 horas do repasto. Região abdominal, porção terminal A. Observa-se oviduto (ov) com óvulo em sua luz e o conteúdo negro digerido no reto (R). B. A espermateca adjacente ao oviduto (ov), à glândula secretora do envelope do óvulo (gs) e ao reto (R) está repleta de espermatozoides. C. Região posterior do intestino médio com epitélio pseudoestratificado (EPS) e conteúdo envolvido pela matriz peritrófica (CIMP) adjacente ao óvulo. D. Envoltório do ovo (eo) formado por células angulares. Reto (R) com conteúdo digerido e túbulos de Malpighi (TM) em corte longitudinal. A/B/C. Tricrômico de Mallory. Obj.40x. D. Tricrômico de Shorr. Obj. 40x.

### 3.6 Aspectos histológicos de fêmea adulta de *Dirofilaria immitis*

O parasita é recoberto por cutícula lisa com espessura variando entre 16,3 e 20,3  $\mu\text{m}$ . Sob coloração de hematoxilina-eosina observa-se camada superficial fortemente basofílica com espessura média de 6,1  $\mu\text{m}$ . A partir da cutícula são emitidas projeções internas longitudinais diametralmente opostas com espessura média de 34,8  $\mu\text{m}$ . Com localização subcuticular existe uma camada formada por células musculares dispostas paralelamente entre

si e perpendiculares à superfície com 93,4  $\mu\text{m}$  de espessura média. Junto ao canal alimentar, esta camada torna-se mais delgada e passa despercebida quando próxima ao útero que apresenta diferentes fases de desenvolvimento embrionário. Em alguns exemplares está distendido pela presença de ovos e em outros exemplares com microfílarias (Figura 28).

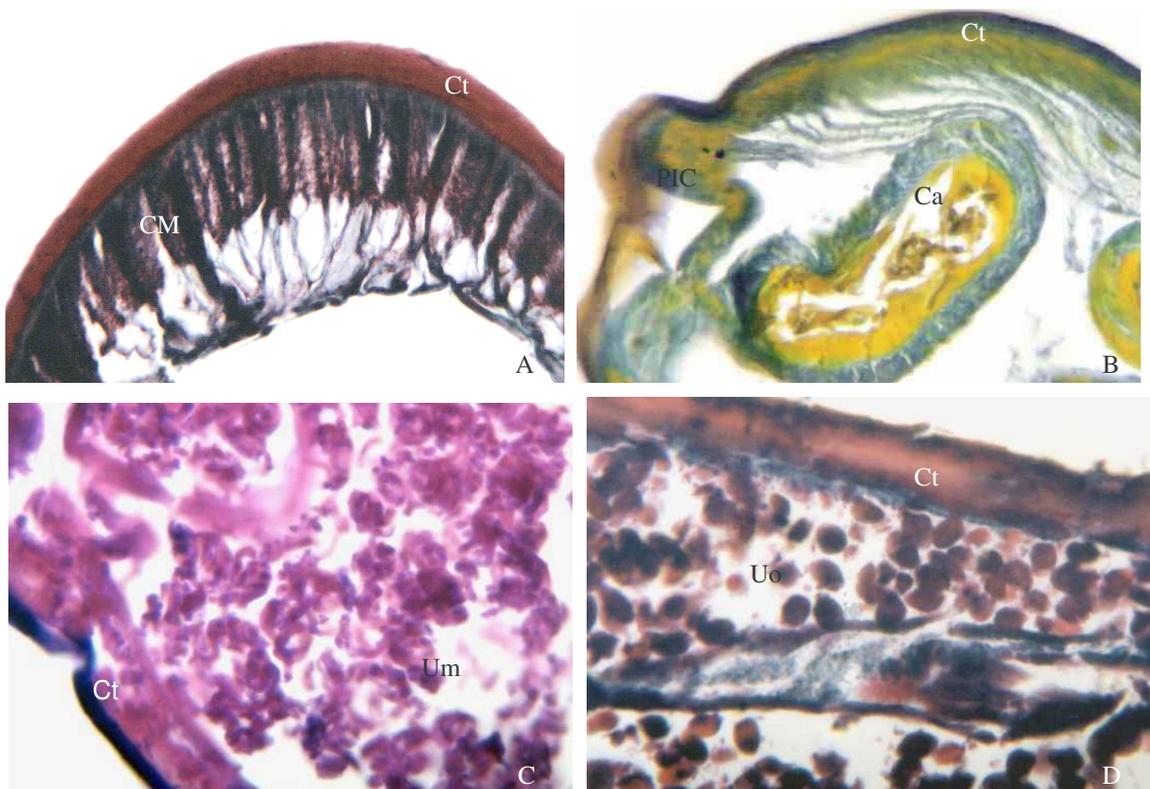


Figura 28. Aspecto microscópico de fêmea adulta de *Dirofilaria immitis*. A. Cutícula lisa (Ct) e camada muscular (CM) proeminente composta por células dispostas perpendicularmente à superfície. B. Projeção interna da cutícula (PIC) e canal alimentar (Ca). C. Útero repleto de microfílarias. D. Útero contendo ovos. A/D. Tricrômico de Shorr. Obj. 40x. B. Tricrômico de Mallory. Obj.10x. C. Hematoxilina-Eosina. Obj. 40x.

#### 4 DISCUSSÃO

No diagnóstico das filarioses caninas a detecção e identificação das microfilárias é de grande importância para definir o agente específico. Resultados falso-positivos e falso-negativos podem levar a diagnósticos equivocados e para minimizar este problema as amostras de sangue das duas populações caninas avaliadas em Guaratuba foram submetidas simultaneamente ao exame direto de sangue total, Teste de Knott modificado e *Snap® Test* para pesquisa de antígeno de *Dirofilaria immitis*. O exame direto a fresco é o método mais comum e rápido para demonstrar a presença de microfilárias e pode ser utilizado na rotina da clínica veterinária que em geral possui um microscópio óptico utilizado para outros exames. Para identificá-las as técnicas de concentração em filtro ou o Teste de Knott modificado são as recomendadas (SLOSS *et al.*, 1999). Esta última é facilmente executável podendo também ser realizada em laboratórios e clínicas veterinárias. Em regiões endêmicas de *Dipetalonema sp.* podem ser encontradas microfilárias circulantes deste parasita, o que muitas vezes leva ao diagnóstico equivocado de dirofilariose canina, seja como resultado positivo ou resultado negativo. Microfilárias deste parasita foram observadas em 5,6% dos cães do Bairro e em 11,6% dos cães do Canil e desta forma o teste de Knott modificado mostrou-se de grande utilidade pois foi possível diferenciar morfológicamente as microfilárias, tornando o resultado mais preciso. Em muitos casos as infecções por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema sp.* podem desenvolver-se juntas no mesmo cão, o que não foi observado no presente estudo. Algumas diferenças puderam ser percebidas nas populações caninas avaliadas para *Dirofilaria immitis* em Guaratuba. A população canina avaliada no período de 12 meses foi maior no Canil Municipal de Guaratuba, totalizando 164 animais, devido à captura estar relacionada à execução de um programa municipal de controle de cães errantes e obedecer a um cronograma prévio, alterado apenas em condições de intempéries. No Bairro COHAPAR II, a

colheita de sangue para a avaliação esteve na dependência da autorização prévia dos proprietários, que em muitas circunstâncias recusaram-se a concedê-la, o que justifica o número de 71 animais avaliados, inferior à metade da população do Canil Municipal de Guaratuba.

As características da população canina que são avaliadas para *Dirofilaria immitis* são inerentes a cada região geográfica. Em estudos epidemiológicos da dirofilariose canina, são discutidas as características fenotípicas dos cães positivos para *Dirofilaria immitis*, como descrevem os diferentes pesquisadores. ALMEIDA *et al.* (2001) estudaram a influência da raça, cor, comprimento do pelo, sexo e idade no parasitismo por *Dirofilaria immitis* de uma população de 613 cães dos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, BA. Foram positivos 10,4% e o maior percentual foi em cães de seis a dez anos. A presença de microfíliarias foi maior nos cães com definição de raça (11,1%), principalmente dogue alemão e boxer e em animais de pelo curto (17,3%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as cores dos pelos e a ocorrência da infecção nos cães. Do total de 263 cães positivos para dirofilariose em Seul, Coreia, YOON *et al.* (2002) observaram que houve predomínio de animais com raça (71,8%), do sexo feminino (56,6%), entre 3 e 4 anos de idade (64,6%), que eram mantidos no ambiente externo (88,2%) e não haviam sido submetidos à profilaxia (85,2%).

No Bairro COHAPAR II o número de cães do sexo masculino foi maior. Por serem animais com domicílio fixo, deve-se levar em conta que tradicionalmente os proprietários tem preferência por machos para evitar o incômodo gerado pelo período de estro e também de gestação a que as fêmeas estão sujeitas. No Canil Municipal de Guaratuba, a população canina era formada por animais errantes capturados aleatoriamente tanto na região central como na periferia da cidade, e neste caso coincidiu de haver o mesmo número de machos e fêmeas.

Em ambos os grupos avaliados em Guaratuba houve predomínio de animais SRD e por esse motivo padrões de coloração e comprimento de pelagem, assim como o porte foram características extremamente variáveis. Em geral os cães com raça definida despertam maiores cuidados por parte de seus proprietários, no sentido de serem mantidos confinados ou despertam o interesse de adoção no caso de ser um animal errante. A população humana de baixo-poder aquisitivo parece ser indiferente ao fator raça e acaba acolhendo os cães SRD, mas dão preferência a animais de portes pequeno e médio, como mostra o percentual de 95,5% encontrado, provavelmente devido ao consumo menor de alimento e a necessidade de menor espaço para abrigá-los. Na área analisada, os cães tendem a atingir idade avançada e em ambos os grupos foram observados animais senis, com idade superior a dez anos. Nas duas populações avaliadas pode-se considerar que não houve diferença acentuada no percentual de animais com idade de até quatro anos.

A infecção por *Dirofilaria immitis* com microfíliarias circulantes foi inferior a 1% no total de 235 cães dos dois grupos. Em cada um dos grupos foi encontrado apenas um cão microfilarêmico positivo para *Dirofilaria immitis*, apesar do número de cães avaliados no Canil Municipal de Guaratuba ser superior ao dobro dos cães do Bairro COHAPAR II.

O cão positivo para *Dirofilaria immitis* detectado no grupo do Canil Municipal de Guaratuba era microfilarêmico, macho, sem raça definida, de porte médio e pelagem dourada, com aproximadamente seis anos de idade, cuja amostra de sangue reagiu de forma positiva para *Dirofilaria immitis* quando submetida aos três testes utilizados na pesquisa. Para acompanhar a evolução da doença, o cão foi transferido para o canil de isolamento em São José dos Pinhais, PUCPR e mantido sem contato com a fauna local de culicídeos uma vez que se desconhecem os seus gêneros da região e eventuais vetores da doença. Na primeira avaliação clínica e laboratorial deste animal, seu estado geral era debilitado, possivelmente atribuído às más condições a que o cão errante está sujeito, sendo privado de cuidados

básicos de alimentação e abrigo. Tal condição leva à imunossupressão e desencadeamento de quadros de ectoparasitoses, endoparasitoses intestinais e conseqüente anemia e infecções secundárias, como demonstrados pelos exames parasitológicos e hemograma realizados na primeira avaliação. O animal foi submetido ao tratamento para ectoparasitas com *amitraz* e para endoparasitas a desverminação foi feita com *pamoato de pirantel*. Ambos os fármacos não possuem efeito sobre microfilárias e parasitas adultos de *Dirofilaria immitis*, e não tiveram influência na evolução da doença. A permanência no canil de isolamento, sob cuidados e com alimentação adequada, levou à melhora evidente do estado geral.

Nas avaliações mensais da microfilaremia houve a diminuição progressiva do número de microfilárias circulantes e em 13 meses, na segunda avaliação clínica e laboratorial, o resultado foi negativo para o exame direto a fresco e teste de Knott modificado enquanto que o teste antígeno reagiu de forma positiva. Após 19 meses, na terceira avaliação clínica e laboratorial, o teste antígeno acusou resultado negativo assim permanecendo na quarta avaliação. A periodicidade das microfilárias no sangue está relacionada às alterações na densidade de microfilárias na circulação periférica do cão de acordo com o período do dia. WALTERS (1995) descreve três formas de manifestação: aperiódica, subperiódica e periódica. A forma aperiódica mostra alteração mínima na densidade periférica durante as 24 horas. Apesar da permanência constante de microfilárias no sangue, na forma subperiódica, são detectadas em densidade variável em diferentes períodos do dia. Na forma periódica existe alternância entre baixa e alta densidade de microfilárias, podendo a concentração maior acontecer tanto no período diurno quanto noturno, representando uma evolução na adaptação do parasita para maximizar a ingestão pelo vetor. Quando não estão no sangue, permanecem nos capilares pulmonares. Além das variações diárias, pode haver flutuações sazonais, observadas por SAWYER (1975) em dois cães naturalmente infectados por *Dirofilaria immitis*, cuja densidade de microfilárias no sangue foi maior no verão. No cão microfilarêmico do Canil

Municipal de Guaratuba a densidade de microfilárias foi pesquisada através da avaliação do sangue coletado pela manhã, no meio do dia e ao final da tarde e observou-se não haver variação significativa no número de microfilárias, classificando este animal na manifestação aperiódica da densidade das microfilárias. Assim sendo, o cão que apresentar microfilárias circulantes em qualquer período do dia pode ser fonte de infecção para culicídeos potenciais vetores com hábitos matutinos, vespertinos e noturnos, teoricamente triplicando a possibilidade de infecção de potenciais vetores.

Em áreas onde a dirofilariose não é comum, os testes de rotina não são realizados e as infecções são detectadas quando o animal manifesta clinicamente doença cardíaca. A radiografia complementa os demais testes por ser o método mais objetivo na avaliação da gravidade da doença cardiopulmonar. Os sinais característicos são ramificações interlobulares e periféricas dilatadas e tortuosas, principalmente nos lobos diafragmáticos. Nos casos graves há evolução para dilatação de átrio e ventrículo direitos (KNIGHT *et al.*, 1999; BROOKS, 2001). Os achados nos exames radiográficos do cão com dirofilariose detectado no Canil foram discretos e observou-se alteração do padrão apenas na quarta avaliação, 28 meses depois, com aumento de VD e proeminência do átrio, além da evidência do padrão intersticial miliar no pulmão. O aumento de ventrículo direito provavelmente está relacionado à idade, uma vez que a lesão desenvolveu-se no intervalo de 28 meses e 15 e 9 meses após a microfilaremia resultar negativa e posteriormente o teste antígeno negativo respectivamente. A evidência do padrão intersticial miliar observado por ocasião da quarta avaliação também pode estar relacionado à idade, uma vez que não houve manifestação clínica de neoplasia ou broncopneumonia.

O exame de ultra-som do cão "Diro" não mostrou alterações cardíacas ou a presença de parasitas em nenhuma das avaliações realizadas, apesar de existirem inicialmente microfilárias circulantes. A ecocardiografia pode fornecer provas definitivas da infecção por

*Dirofilaria immitis* uma vez que a parede do corpo dos parasitas adultos é altamente ecogênica e definida. Além disso é útil na avaliação dos efeitos anatômicos e funcionais da doença sobre o coração. KNIGHT *et al.*(1999) consideram que não é um método eficaz para os casos de infecções com poucos parasitas. Como no cão “Diro” não foram observados parasitas adultos de *Dirofilaria immitis* através do exame de ultra-som e também não foram encontradas lesões cardiopulmonares compatíveis com dirofilariose é possível que os parasitas fossem em número reduzido e estivessem mortos à algum tempo. A redução da microfilaremia pode estar ligada à ausência de parasitas adultos, ao término da vida da microfilária cuja média está em torno de 2 anos na circulação e também à resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro. Não deve se considerar esta ausência de microfilárias como falha no exame direto, pois na segunda avaliação clínica o *Snap® Test* acusou ainda a presença do antígeno circulante, resultando negativo apenas na terceira avaliação, seis meses após a microfilaremia negativa.

No Grupo 2 do Bairro COHAPAR II foram detectados três cães positivos para *Dirofilaria immitis*. Dois cães, machos, de porte pequeno e pelagem curta, com três e quatro anos de idade respectivamente reagiram positivamente apenas ao *Snap® Test*, acusando resultado negativo no exame direto à fresco e teste de Knott modificado, sendo amicrofilarêmicos e portadores de infecção oculta. Os testes antígenos proporcionam resultados bastante confiáveis e acusam antígenos produzidos predominantemente por fêmeas de parasitas adultos ou detectam fragmentos do tegumento de parasitas adultos no sangue circulante (WEIL, 1987; BROOKS, 2001; KNIGHT, 2002). Vários autores concordam que a ausência de microfilárias pode ocorrer por infecção pré-patente, por parasitas de um único sexo, terapia filaricida e fatores imunomediados. A incidência das infecções ocultas é variável, mas tem aumentado sistematicamente, podendo chegar a 41% (NEW ZELAND, 2004). Nos dois casos em estudo o mais provável seria a infecção pré-patente, por parasitas de um único sexo ou

fatores imunomediados, uma vez que os proprietários informaram que os animais não haviam sido submetidos à terapia profilática para ecto e endoparasitas. Fica evidente a necessidade de associar mais de um exame laboratorial para a detecção da infecção por *Dirofilaria immitis*, já que se conhece a manifestação da doença como forma oculta. Principalmente em áreas de baixa prevalência, mas que reúnem as condições para a manutenção do vetor e do portador, é uma forma de assegurar um resultado mais confiável e monitorar a evolução da doença na região.

O terceiro cão positivo do grupo do Bairro COHAPAR II, “Lobo”, SRD, porte médio, pelagem curta e com dez anos de idade era microfilarêmico e reagiu de forma positiva aos três testes utilizados no estudo. Este animal permaneceu em seu domicílio em todo o período do estudo estando em contato com a fauna local de culicídeos e veio a óbito 15 meses depois com lesões múltiplas associadas à senilidade e ao estado geral debilitado. O controle da microfilaremia realizado mensalmente, semelhante ao que foi observado no cão positivo do canil, revelou queda progressiva no número de microfílarías, chegando a 4 microfílarías/100  $\mu$ m por ocasião do óbito. Os proprietários informaram que em nenhum momento foi aplicada terapia profilática para parasitas neste animal. As amostras de sangue foram colhidas sempre ao final da tarde e não foi possível determinar a densidade de microfílarías nos três períodos do dia, como foi feito no cão do canil, porque os proprietários recusaram-se a autorizar mais que uma venopunção. Além das variações diárias, pode haver flutuações sazonais observadas por SAWYER (1975) em dois cães naturalmente infectados por *Dirofilaria immitis*, cuja densidade de microfílarías no sangue foi maior no verão dos Estados Unidos. HOLZMAN *et al.* (1992), observaram que a densidade de microfílarías de *Dirofilaria immitis* foi baixa em coiotes (*Canis latrans*) capturados no outono, enquanto que naqueles capturados no inverno foi alta. Flutuações sazonais na densidade de microfílarías não foram percebidas nas avaliações

mensais da microfilaremia dos dois cães positivos de Guaratuba, tendo em vista a diminuição progressiva no número de microfíliarias circulantes.

O exame anatomopatológico do “Lobo”, cão microfilarêmico domiciliado no Bairro COHAPAR II mostrou como as precárias condições do ambiente, no que diz respeito a abrigo e alimentação inadequada por se tratar de proprietários de baixo poder aquisitivo, associados à senilidade contribuíram para o comprometimento do estado geral do animal. A depressão sistêmica progressiva manteve o animal em decúbito até o óbito o que levou ao desenvolvimento das lesões cutâneas ulcerativas. As lesões crônicas observadas em gengiva, dentes e rins foram resultantes da idade avançada do animal, confirmadas pelo exame microscópico. O edema pulmonar com hidropericárdio estariam associados à anemia, hipoproteinemia e também a permanência em decúbito, pois o quadro do edema não era acentuado o suficiente para indicar comprometimento cardíaco. Chamou a atenção a parotidite purulenta severa com presença de cortes de microfíliarias, apesar de não terem sido encontrados parasitas adultos e a microfilaremia ser baixa. Assim como em outros animais, existem vários relatos de infecções extracardíacas por microfíliarias e formas adultas de *Dirofilaria immitis* em cães. HENRY (1992) em um caso de mucocele salivar associada a dirofilariose em um cão encontrou microfíliarias no fluido aspirado da mucocele, sendo a identificação confirmada pelo teste de imunoenensaio e pela presença do parasita adulto dentro da mucocele. Também foram descritos endoftalmite parasitária por formas imaturas de *Dirofilaria immitis* (GWIN *et al.*, 1977; JOHNSON, 1989). Em 1994, ORTEGA-MORENO *et al.*, descreveram na Espanha infecção por microfíliarias de *Dirofilaria immitis* na mama de uma cadela com a doença manifesta. Relatos de lesões em tecido nervoso por *Dirofilaria immitis* são freqüentes. COOLEY *et al.*(1987) descreveram encefalomielite causada por microfíliarias em um cão de dois anos. PATTON *et al.* (1970) encontraram uma fêmea adulta grávida em uma área de necrose isquêmica no hemisfério cerebral direito de um cão de quatro anos.

BOZEMANN *et al* (1974) encontraram parasitas adultos e vivos no ventrículo lateral do cérebro de um cão e na veia do ventrículo lateral direito de um gato. HAMIR (1987) descreveu o caso de um cão de 10 anos de idade, onde existia uma parte livre do parasita adulto no ventrículo e o restante estava inserido no parênquima nervoso envolto por reação inflamatória. Em todos esses relatos os animais apresentavam também exemplares adultos no coração. BLASS *et al.* (1989) diagnosticaram dirofilariose extracardíaca em um cão adulto da raça Lulu da Pomerânia com tetraparesia recorrente. Encontraram uma fêmea adulta de *Dirofilaria immitis* localizada no espaço epidural entre C2 e C3. A pesquisa de microfírias com o teste de Knott após a cirurgia foi negativa.

A pesquisa de antígeno através do *Snap® Test* mostrou-se eficiente e acusou dois animais amicrofilarêmicos no total de cães pesquisados. Desta forma ficou estabelecida a existência de um provável foco de dirofilariose no Bairro COHAPAR II. O Bairro, sob análise reúne as condições potencialmente viáveis para manutenção do vetor e conseqüentemente da doença. Temperaturas médias elevadas e fontes de águas disponíveis, aliadas a condições sócio-econômicas que inviabilizam a pressão de serviços públicos de melhor qualidade. Apesar dos fatores propícios, a dirofilariose pode ser considerada uma zoonose de reduzida importância quantitativa no Bairro COHAPAR II, porém qualitativamente os casos positivos indicam a necessidade de monitoramento dos cães e da população dos vetores em potencial.

As regiões costeiras tropicais e subtropicais de mundo todo, onde há alta densidade pluviométrica e calor, apresentam prevalência acentuada de dirofilariose canina, o que não exclui a possibilidade de haver áreas distantes do litoral com incidência da doença. A isso se deve a alta mobilidade dos cães microfilarêmicos que acompanham seus proprietários em suas viagens, constituindo fonte de infecção para os mosquitos locais (McALL, 2000; ALMOSNY *et al*, 2002; RODRIGUEZ-SILVA *et al*, 2004).

Os casos de dirofilariose registrados no Bairro COHAPAR II, em Guaratuba, apesar da baixa prevalência pode levar à disseminação da doença para áreas distantes do litoral, pois é comum parte da população residente de forma temporária em períodos de veraneio estar acompanhada de seus cães, potenciais portadores da dirofilariose. Além disso o Bairro reúne condições favoráveis ao desenvolvimento da fauna local de culicídeos, que conta com o gênero *Culex*, entre os potenciais vetores de dirofilariose como identificado por SILVA *et al.* (2003).

Para considerar a espécie de mosquito competente na transmissão de parasitas há de se compreender seus mecanismos internos, gerais e específicos, de defesa contra a infecção pelos agentes patogênicos. Na década de 1970 foram realizados numerosos estudos sobre as células da hemolinfa de artrópodos, sua classificação e funções, e participação na defesa contra agentes estranhos ao organismo do inseto, semelhante ao que acontece com os leucócitos em vertebrados. A partir do ano de 1980 os estudos na mesma área enfocaram a resposta celular e humoral contra os nematóides, principalmente o processo de melanização, tanto em nível ultraestrutural como em nível bioquímico, ficando demonstrada a interação entre os hemócitos e a melanização contra estes parasitas.

A morfologia de *Culex quinquefasciatus* é muito similar à de outros Culicidae. A região anterior do intestino médio é revestida por epitélio cúbico com microvilosidades e mantém o mesmo aspecto nas três circunstâncias em que foi avaliado, sem repasto, pós-repasto imediato e 24 horas após o repasto. OKUDA *et al.* (2002) estudaram a morfologia funcional do intestino médio de fêmea adulta de *Culex quinquefasciatus* durante o repasto. Quando sem conteúdo a luz da porção anterior apresentava o epitélio com espessura irregular o que não foi confirmado pelo presente estudo, onde ficou evidente o aspecto regular e homogêneo do epitélio cúbico com microvilosidades que reveste a porção anterior do intestino médio. Os mesmos autores descrevem o epitélio da porção posterior como uma monocamada de aparência regular composto por células colunares medindo aproximadamente 25µm de altura com núcleo central

e volumoso e nucléolo central. No presente estudo o epitélio da região posterior do intestino médio também é uma monocamada, mas com aspecto pseudoestratificado onde as células são colunares e núcleos alongados e únicos localizados em diferentes níveis medindo entre 12,2 a 16,2  $\mu\text{m}$  mais as vilosidades com 4,1  $\mu\text{m}$ . Após a ingestão do sangue, a alteração mais evidente foi a distensão do intestino médio posterior onde as células digestivas com padrão colunar pseudoestratificado, no mosquito não alimentado, distenderam-se lateralmente após o repasto, passando a aproximadamente metade do tamanho original, em torno de 8,1  $\mu\text{m}$ , mas com as microvilosidades mantendo a mesma dimensão.

OKUDA *et al.* (2002) descrevem a distensão acentuada das células desta região após o repasto que passam a medir 2,5  $\mu\text{m}$ , adquirindo a forma cubóide. É possível que esta diferença do tamanho das células do intestino médio posterior esteja relacionada à quantidade do sangue ingerido. Quanto maior a quantidade, maior a compressão sofrida pelo epitélio. Os mesmos autores sugerem que aparentemente a distensão seria causada por redução da densidade das microvilosidades, mas foi observado no presente estudo que as microvilosidades mantiveram-se com o mesmo tamanho.

NAYAR & SAUERMAN (1975) descreveram em *Culex quinquefasciatus* a formação de cristais de oxihemoglobina no intestino médio após a coagulação do sangue ingerido. LOWRIE (1991) e AHID *et al.* (2000) relataram o mesmo fenômeno após uma hora do repasto, o que foi também observado no presente estudo. Em seus estudos experimentais estes autores relacionaram a presença de microfilárias mortas e com dano na cutícula às formações pontiagudas dos cristais de oxihemoglobina o que seria uma forma individual de defesa contra estes parasitas.

Em todos os exemplares estudados, após 24 horas do repasto o sangue ingerido estava totalmente envolto pela matriz peritrófica e formava uma massa compacta com

coloração variando de marrom a negra. ROMOSER *et al.* (2000) constataram que a matriz peritrófica está sempre presente em *Culex*, confirmado pelo presente estudo.

A formação da matriz peritrófica em artrópodos hematófagos é um processo fisiológico de defesa contra infecção por parasitas além de ter papel fundamental na digestão do sangue ingerido. Em mosquitos, de forma geral, o processo de secreção da matriz peritrófica inicia-se após a coagulação do sangue e leva 48 horas para ser completado apesar de existirem diferenças consideráveis entre as espécies (LEHANE, 1996). Neste estudo com *Culex*, em alguns exemplares observou-se que após 24 horas do repasto, o conteúdo já estava totalmente envolvido pela matriz e apresentava-se preenchendo o intestino posterior e o reto, o que leva a crer que a secreção da matriz peritrófica nesta espécie estava completada em 24 horas. Desta forma é possível considerar que *Culex quinquefasciatus* possui três mecanismos de defesa contra microfilárias relacionados diretamente com o intestino médio que seria a formação de cristais de oxihemoglobina, a coagulação do sangue e a secreção da matriz peritrófica em um período de tempo menor. Em caso de repasto em cão microfilarêmico, os cristais de oxihemoglobina podem causar dano à cutícula de microfilárias e conseqüentemente leva-las à morte, enquanto que a coagulação do sangue pode restringir sua movimentação. A formação completa da matriz peritrófica acontece no mesmo período de 24 horas que a microfilária leva para se deslocar aos túbulos de Malpighi, o que pode influenciar de forma importante este processo e comprometer a evolução da larva até a fase infectante.

Neste período de 24 horas pós-repasto em alguns exemplares de *Culex quinquefasciatus* o conteúdo digerido já era também observado no intestino posterior e no reto. Apesar de estarem dilatados, no intestino posterior estavam mantidas as projeções papilares e o aspecto enrugado da luz. Também não foram observadas alterações na forma e tamanho das células de revestimento e respectivas vilosidades.

O epitélio de revestimento da região posterior do intestino médio volta a adquirir o aspecto pseudoestratificado com o tamanho das células não atingindo o tamanho anterior, mas as vilosidades praticamente dobram de tamanho. OKUDA *et al.* (2002) confirma a volta do epitélio como colunar e as vilosidades mais longas que a da célula antes do repasto. É provável que a partir do momento que o sangue está sendo digerido, as vilosidades aumentam de tamanho para ampliar a superfície de absorção para os elementos que são importantes para o organismo e principalmente para a oogênese.

Nas fêmeas com 24 horas de vida e sem repasto os ovários são estruturas pequenas cujos ovariolos tem tamanho reduzido onde se observam apenas os trofócitos. Com 48 horas de vida e pós-repasto imediato fica evidente o aumento do tamanho dos ovariolos em que os oócitos são reconhecíveis havendo evidencia do epitélio folicular. Após 24 horas do repasto o processo de oogênese mostrou estar em diferentes estágios de desenvolvimento ovariano. Em alguns exemplares observou-se a fase de folículo com oócito maduro. Em outros exemplares, grande parte da cavidade abdominal estava distendida pelos ovários com ovos de forma elíptica e envoltos pelo corio composto por células angulares, de citoplasma homogêneo e núcleo pouco visível. Foi possível também observar ovo já no oviduto. Se no período de 24 horas pós-repasto é possível ter oviposição e o ambiente fornece as condições para a eclosão de larvas e seu desenvolvimento até o adulto e ainda existem animais portadores, esta população de potencial vetor de dirofilariose pode ampliar-se rapidamente, o que favorece a disseminação da doença não só para os animais, mas também para o ser humano.

A importância do estudo histológico da fase adulta de *Dirofilaria immitis* reside no fato da descrição histológica auxiliar na identificação do parasita quando se faz a avaliação histopatológica do granuloma parasitário. O parasita é recoberto por cutícula lisa e multilaminar com espessura variando entre 16,3 e 20,3  $\mu\text{m}$ . Sob coloração de hematoxilina-eosina observa-se camada superficial fortemente basofílica com espessura média de 6,1  $\mu\text{m}$ . A partir da

cutícula são emitidas projeções internas longitudinais diametralmente opostas com espessura média de 34,8 µm. Essas estruturas são características e diferenciam *Dirofilaria immitis* de outras filárias especialmente de *Dirofilaria repens* que causa lesões granulomatosas semelhantes. Nos diferentes exemplares de parasitas estudados foi possível observar o útero distendido por ovos, ou por ovos embrionados ou já com as microfírias. O aspecto histológico descrito neste estudo é compatível com as descrições de; SKIDMORE *et al.*, 2000; NISSEN & WALKER, 2003, apesar de que em muitos casos os parasitas mortos dentro do granuloma já apresentavam degeneração avançada.

Nos Estados Unidos, NICHOLSON *et al.* (1992) observaram que os casos em animais concentravam-se nos estados da costa e que a distribuição dos casos humanos era semelhante. A frequência e distribuição estão relacionadas à prevalência canina, vetores na área, atividades que expõe às picadas, independentemente de serem proprietários de cães. Além disso, se houver um cão reservatório na região outros animais podem infectar-se. Nos animais selvagens, os relatos se resumiram a achados acidentais ou estudos de prevalência. Não foram realizados estudos de infecção experimental para observar a evolução da doença e caracterizar a espécie animal como reservatório da doença na região. Tais estudos mostraram-se necessários como ficou evidente no estudo experimental de infecção de ferret (*Mustela putorius furo*) por *Dirofilaria immitis* realizado por SUPAKORNDEJ *et al.* (1994). Ficou demonstrado que esta espécie é tão susceptível quanto o cão e está adaptada ao convívio humano, podendo vir a ser uma fonte de infecção.

Em poucos casos descritos pela literatura científica de dirofilariose pulmonar humana houve utilização de exames sorológicos. Foram usados apenas após o diagnóstico histopatológico do granuloma, na tentativa de identificar o parasita. O aconselhável em regiões endêmicas é que se adote como rotina o uso de exame sorológico para *Dirofilaria immitis* em pacientes com lesões pulmonares circunscritas com suspeita de neoplasias.

FORATINNI (1998) fez uma interpretação bastante pertinente a respeito do relacionamento entre as chamadas infecções emergentes e o conceito de vetores emergentes. Estes são descritos não só como as formas novas como aqueles com acentuada mudança de comportamento. A influência humana sobre o ambiente tem papel fundamental e processos como urbanização, moradia, modificações ecológicas e climáticas contribuem para este fenômeno. O resultado da emergência ou reemergência pode se traduzir por problemas epidemiológicos. *Culex quinquefasciatus* constitui uma espécie de grande importância em saúde pública e sanidade animal. Está disseminado no Brasil em praticamente todos os centros urbanos, em geral associado às condições precárias de saneamento, sujeito a sofrer pressão seletiva que possa induzir adaptação a essa nova circunstância. É considerado como vetor potencial de parasita uma vez que estudos experimentais de infecção com *Dirofilaria immitis* tiveram sucesso com linhagens de diferentes regiões do país. Por características inerentes, algumas delas apresentadas neste estudo, é parcialmente resistente as microfilárias desta espécie permitindo o seu desenvolvimento até larva infectante. Em regiões cuja prevalência é alta este processo adaptativo de contato constante com animais infectados pode evoluir para torná-lo vetor efetivo deste patógeno. Em se conhecendo o vetor potencial da região com prevalência da doença, cuidados com o animal, medidas profiláticas sob orientação do médico veterinário, eliminação das condições favoráveis à manutenção do vetor e informações para a população são fundamentais para o controle da doença.

Deve-se ainda levar em conta as características do ciclo de vida de *Dirofilaria immitis*. Do momento da infecção do cão até a presença de microfilárias no sangue são necessários no mínimo seis meses, o que pode gerar períodos sazonais antagônicos com relação a flutuação da densidade populacional de vetores potenciais.

## 5 CONCLUSÕES

1. No município de Guaratuba foi detectada prevalência de 1% de *Dirofilaria immitis* entre cães errantes capturados pelo Serviço de Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de Guaratuba. Em cães domiciliados em um bairro periférico da cidade a prevalência do mesmo parasita foi de 4,2% na população amostrada, indicando um foco potencial de dirofilariose na região. Pode-se considerar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos avaliados no que diz respeito a raça, pelagem, idade e porte.
2. Os exames laboratoriais para diagnóstico de infecção por *Dirofilaria immitis* disponíveis para uso na rotina da clínica médica veterinária não devem ser utilizados de forma individualizada, mas em conjunto no sentido de oferecer maior precisão, já que se conhece a manifestação da doença como forma oculta. Em áreas de baixa prevalência, mas que reúnem as condições para a manutenção do vetor e do portador, é uma forma de assegurar um resultado mais confiável e monitorar a prevalência da doença na região.
3. A utilização do exame direto a fresco e teste de Knott modificado permitiu estabelecer a prevalência de 11,6% de *Dipetalonema sp.* entre cães errantes capturados pelo Serviço de Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de Guaratuba. Em cães domiciliados em um bairro periférico da cidade a prevalência do mesmo parasita foi de 5,6% na população amostrada. Em ambos os casos, o percentual para este parasita foi maior que aquele alcançado para *Dirofilaria immitis*. Tendo em vista que o exame laboratorial mais comum na rotina da clínica médica veterinária para detecção de microfilárias é o exame de sangue a fresco, a prevalência maior de *Dipetalonema sp.* nesta região pode

induzir a diagnóstico equivocado de *Dirofilaria immitis* e conseqüentemente de tratamento desnecessário.

4. Em ambos os animais parasitados acompanhados clinicamente, a curva de microfilaremia sofreu redução, apesar de estarem em condições de manejo totalmente opostas, com presença e ausência de cuidados, com um deles chegando a óbito por causas não associadas à dirofilariose. Pode-se considerar que a redução foi conseqüência do ciclo de vida da *Dirofilaria immitis* no interior do hospedeiro. É necessário no entanto acompanhar maior número de cães positivos para a dirofilariose para melhor estabelecer os resultados aqui apresentados.
5. O exame radiológico evidenciou lesões no coração desenvolvidas após o desaparecimento da microfilaremia e do antígeno circulante, possivelmente associadas à idade. O exame de ultra-som não evidenciou lesões cardíacas resultantes da dirofilariose e tampouco a presença de parasitas, confirmando a reduzida eficiência deste exame nos casos da doença com poucos parasitas adultos.
6. É possível considerar que *Culex quinquefasciatus* possui três mecanismos de defesa contra microfírias relacionados diretamente com o intestino médio que seriam a formação de cristais de oxihemoglobina, a coagulação do sangue ingerido e a secreção da matriz peritrófica em um período de tempo inferior ao processo de migração das microfírias até os túbulos de Malpighi.
7. A descrição microscópica das estruturas internas de *Culex quinquefasciatus* servirão como parâmetro auxiliar para o estudo das patologias causada por agentes patogênicos neste vetor.
8. A descrição microscópica de estruturas internas de *Dirofilaria immitis* servirão como parâmetro auxiliar para o diagnóstico histopatológico diferencial de granulomas parasitários em animais e no ser humano.

## 6 REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N. & SZYFRES, B. 1986. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2<sup>a</sup>. Ed. Organización Panamericana de la Salud, Washington, EUA, 989 pp.
- AHID, S. M. M; LOURENÇO-DE OLIVEIRA, R. 1999. Mosquitos vetores de dirofilariose canina na região nordeste do Brasil. **Rev. Saúde Públ.** 33(6):560-565.
- AHID, S. M. M; PÁDUA, S. S. V.; LOURENÇO-DE OLIVEIRA, R. 2000. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. **Mem. Inst. Osw. Cruz.** 95(6):769-775.
- ALMEIDA, M. A. O.; BARROS, M. T. G.; SANTOS, E. P.; AYRES, M. C. C.; GUIMARÃES, J. E.; GONDIM, L. F. P. 2001. Parasitismo de cães por microfilárias *Dirofilaria immitis*: influência da raça, sexo e idade. **Rev. Bras Saúde Prod. An.** 1:59-64.
- ALMIRON, W. R.; BREWER, M. M. 1995. Host preference of Culicidae(Díptera) collected in central Argentina. **Rev. Saude Publ.** 29(2):108-114.
- ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L.; LABARTHE, N. V.; O'DWYER, L. H.; SOUZA, A. M.; ALVES, L. C.; SERRÃO, M. L. 2002. Dirofilariose. pp. 112-135 *In: Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. 1.<sup>a</sup> Edição. L.F.Livros de Veterinária Ltda. Rio de Janeiro. 225 pp.
- ALVES, L. C.; SILVA, L. A.; FAUSTINO M. G.; McCALL, J. W.; SUPAKONDERJ, P.; LABARTHE, N.; SANCHES, M.; CAIREZ, O. 1999. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94(5):587-590.
- ARAÚJO, R. T.; MARCONDES, C. B.; BASTOS, L. C.; SAROR, D. C. 2003. Canine dirofilariasis in the region of Conceição Lagoon, Florianópolis, and in the Military Police kennel, São José, State of Santa Catarina, Brazil. **Vet. Parasitol.** 113:239-242.

- ATKINS, C. E. 2003. Comparison of results of three commercial heartworm antigen tests kits in dogs with low heartworm burdens. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 222(9):1221-1223.
- BASKIN, G. B.; EBERHARD, M. L. 1982. *Dirofilaria immitis* infection in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Lab. Anim. Sci.** 32(4):401-402.
- BEERNTSEN, B. T.; CHRISTENSEN, B. M. 1990. *Dirofilaria immitis* effect of hemolymph polypeptide synthesis in *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae. **Experim. Parasitol.** 71:406-414.
- BLASS, C. E.; HOLMES, R. A.; NEER, M. 1989. Recurring tetraparesia attributable to a heartworm in the epidural space of a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 194(6):787-788.
- BLOOM, B. R. 1979. Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. **Nature.** 279:21-26.
- BOMAN, H. G.; HULTMARK, D. 1987. Cell-free immunity in insects. **Ann. Ver. Microbiol.** 41:103-126.
- BOZEMANN, W. F.; PHILLIPS, E. H. 1974. *Dirofilaria immitis* in the brain of the dog and cat. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 164(5):518-519.
- BRADLEY, A. J.; START, A. M.; SATIR, P. 1982. The ultrastructure of the larval Malpighian tubules of the salina-water mosquito *Aedes taeniorhynchus*. **Tissue & Cell.** 14:759-773.
- BRADLEY, T.; NAYAR, J. K. 1987. An ultrastructural study of *Dirofilaria immitis* infection in the Malpighian tubules of *Anopheles quadrimaculatus*. **J. Parasitol.** 73(5):1035-1043.
- BRADLEY, T.; SAUERMAN, D. M.; NAYAR, J. K. 1984. Early cellular responses in the Malpighian tubules of the mosquito *Aedes taeniorhynchus* to infection with *Dirofilaria immitis* (dog heartworm). **J. Parasitol.**, 70:82-88.

- BRADLEY, T. J.; NAYAR, J. K. 1985. Intracellular melanization of the larva of *Dirofilaria immitis* in the Malpighian tubules of the mosquito *Aedes sollicitans*. **J. Invert. Pathol.** 45:339-345.
- BRITO, A. C.; FONTES, G.; ROCHA, E. M. M.; REGIS, L. 1999. Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceió, Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94(4):575-576.
- BRITO, A. C.; VIANNA, L. S.; DUARTE, E. M. M.; FONTES, G.; ROCHA, E. M. M.; REGIS, N. 2000. *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Maceió, Alagoas Northeast region of Brasil. **Arq. Bras. Vet. Zoot.** 52(3):150-152.
- BRITO, A. C.; VILA-NOVA, D. A.; COSTA, L. G.; ALMEIDA, W. A. P.; VIANA, L. S.; LOPES JR., R. R.; FONTES, G.; ROCHA, E. M. M.; REGIS, L. 2001. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cad. Saúde Pública.** 17(6):1497-1504.
- BRODEY, R. S. 1971. Hypertrophic osteoarthropathy in the dog: a clinico-pathologic survey of 60 cases. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 159:1242-1256.
- BROOKS, W. C. 2001. Diagnosis of heartworm disease. <http://www.VeterinaryPartner.com/Content.plx?P>. Date published: 1/1/2001.
- BURCH, G.; BLAIR, H. E. 1951. A rapid test for diagnosis of *Dirofilaria immitis*. **Vet. Med.** 46:128-130.
- CAMPOS, J. R. M.; BARBAS, C. S.; FILOMENO, L. T.; FERNANDEZ, A.; MINAMOTO, H.; FILHO, J. V.; JATENE, F. B. 1997. Human pulmonary dirofilariasis: analysis of 24 cases from São Paulo, Brazil. **Chest.** 112(3):729-733.
- CARLETON, R. E.; TOLBERT, M. K. 2004. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and gastrointestinal helminths in cats euthanized at animal control agencies in northwestern Georgia. **Vet. Parasitol.** 119(4):319-26.

- CARLSON, B. L.; NIELSEN, S. W. 1983. *Dirofilaria immitis* infection in a gray fox. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 183(11):1275-1276.
- CASTEX, M.; SUAREZ, E.; MARCHETTI, M. C. 1990. Food sources of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Díptera, Culicidae) in Machurrucutu, Havana Province, Cuba. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 85:241-242.
- CAVALLAZZI, R. S.; CAVALLAZZI, A. C.; SOUZA, I. V.; CARDOSO, J. J. D. 2002. Dirofilariose pulmonar humana: relato de sete casos. **J. Pneumologia** . 28(2): ?. 2002
- COCIANCICH, S.; BULET, P.; HETRU, C.; HOFFMAN, J. A. 1994. The inducible antibacterial peptides of insects. **Parasitol. Today**, 10:132-139.
- COOLEY, A. J.; CLEMMONS, R. M.; GROSS, T. L. 1987. Heartworm disease manifested by encephalomyelitis and myositis in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 190(4):1635-1637.
- CORNEGLIANI, L.; VERCELLA; B. O. S.; COLOMBO, S. 2003. Two cases of cutaneous nodular dirofilariasis in the cat. **J. Small Anim. Pract.** 44(7):316-318.
- CORTAZAR, C.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; BLANCO, J. C.; ARRIOLABENGOA, A.; CALVETE, C. 1994. Factors affecting *Dirofilaria immitis* prevalence in red foxes in northeastern Spain. **J. Wildl. Dis.** 30(4):545-547.
- COSTA, R. C.; COUTO-LIMA, D.; SERRÃO, M. L.; LABARTHE, N. 2004. An update of the prevalence of canine dirofilariasis in a focus área of the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 13(1):23-28.
- COURTNEY, C. H.; ZENG, Q. Y. 2001. Relationship between microfilaria count and sensitivity of direct smear for diagnosis of canine dirofilariasis. **Vet. Parasitol.** 94(3):199-204.
- CRAIG, D. 2003. Update on canine and feline heartworm tests. **Compendium** 25(1):30-41.

- CHEN, C. C.; LAURENCE, B. R. 1985. The encapsulation of the sheaths of microfilariae of *Brugia pahangi* in the haemocoel of mosquitoes. **J. Parasitol.** 71(6):834-836.
- CHRISTENSEN, B. M. 1978. *Dirofilaria immitis*: effect on the longevity of *Aedes trivittatus*. **Exper. Parasitol.** 44:116-123.
- CHRISTENSEN, B. M. 1981. Observations on the immune response of *Aedes trivittatus* against *Dirofilaria immitis*. **Transc. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 75(3):439-443.
- CHRISTENSEN, B. M.; FORTON, K. F. 1986. Hemocyte-mediated melanization of microfilariae in *Aedes aegypti*. **J. Parasitol.** 72(2):220-225.
- CHRISTENSEN, B. M.; HUFF, B. M.; LI, J. 1990. Effect of gamma irradiation on the hemocyte-mediated immune response of *Aedes aegypti* against microfilariae. **J. Invert. Pathol.** 56:123-127.
- CHRISTENSEN, B. M.; SUTHERLAND, D. R.; GLEASON, L. N. 1984. Defense reactions of mosquitoes to filarial worms: Comparative studies on the response of three different mosquitoes to inoculated *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* microfilariae. **J. Invert. Pathol.** 44:267-274.
- CHRISTENSEN, B. M.; TRACY, J. W. 1989. Arthropod-transmitted parasites: mechanisms of immune interaction. **Amer. Zool.** 29:387-398.
- CHUNG, J.; RIEHLE, M.; PASKEWITZ, S. M. 1995. Effect of mosquito age and reproductive status on melanization of Sephadex Beads in *Plasmodium*-refractory and susceptible strains of *Anopheles gambiae*. **J. Invert. Pathol.** 66:11-17.
- CRAWFORD, M. A.; FOIL, C. S. Vasculitis: clinical syndromes in small animals. 1989. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.** 11:400-415.
- DACORSO, P. F.; LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J. 1953. Ocorrência de infestação por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em cães necropsiados na Escola Nacional de Veterinária. **Veterinária (Rio de Janeiro).** 7(3):22-27.

- DASHIELL, G. F. 1961. A case of dirofilariasis involving the lung. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 10:35-38.
- DEEM, S. L.; HEARD, D. J.; LaROCK, R. 1998. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease and glomerulonephritis in a black-footed cat (*Felis nigripes*). **J. Zoo. Wild Disease.** 29(2):199-202.
- DeFRACESCO, T. C.; ATKINS, C. E.; MILLER, M. W.; MEURS, K. M; KEENE, B. W. 2001. Use of echocardiography for the diagnosis of heartworm disease in cats: 43 cases (1985-1997). **J. Am. Vet. Méd. Assoc.** 218(1):66-69.
- DE MAGALHÃES, P. S. 1887. Descrição de uma espécie de filaria encontrada em coração humano precedida de uma contribuição para o estudo de filariose de Wucherer e do respectivo parasita adulto, a *Filaria bancrofti* (Cobbold) ou *Filaria sanguis hominis* (Lewis). **Rev. Cursos Prat. Theoricos Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.** 3:129-215.
- DILLON, R. Dirofilariose em gatos e cães: a diferença está no hospedeiro. 2001. **Boletim Técnico Pfizer Saúde Animal.** Junho. pp.1-8.
- DISSANAIKE, A. S.; RAMALINGAM, S.; FONG, A.; PATHMAYOKAN, S.; THOMAS, V.; KAN, S. P. 1977. Filaria in the vitreous of the eye of human peninsular Malayan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 26(6):1143-1147.
- DUQUE-ARAUJO, A. M.; LABARTHE, N.; LUVISARIO, S. L.; REINA, D. 1995. Filariose canina no Estado de São Paulo – Brasil. *In: IV Congresso Ibérico de Parasitologia.* Anais. pp.93-94. Santiago de Compostela: Sociedade Ibérica de Parasitologia.
- FAUST, E.; AGOSIN, M.; GARCIA-LAVERDE, A. 1952. Unusual findings of a filarial infection in a man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1:239.
- FELDMEIER, H.; BIENZLE, U.; SCHUH, D.; GEISTER, R.; GUGGENMOOS, H. 1986. Detection of *Dirofilaria immitis* microfilariae in periferal blood. A quantitative comparison of the efficiency and sensitivity of four techniques. **Acta Trop.** 43(2):131-138.

- FERNANDES, C. G. N.; RODRIGUES-SILVA, R. MOURA, S. T.; OLIVEIRA, R. M. F. 2000. Aspectos epidemiológicos da dirofilariose canina no perímetro urbano de Cuiabá, Mato Grosso: emprego do *Immunoblot* e do teste de Knott modificado. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Scienc.** 37(6):1-10.
- FERREIRA, F. A.; BARBOSA, F. C.; MASTRANTONIO, E. C.; FARACIO, A. D. 1999. Ocorrência da dirofilariose canina na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **Veterinária Notícias**, Uberlândia. 5:57-61.
- FOLLEY, D. A. 1978. Innate cellular defense by mosquito hemocytes. In: BULLA, A. L.; CHENG, T.C. **Comparative Pathobiology**. New York, Plenum Press. v.4, p.113-144.
- FORATTINI, O. P. 1998. Mosquitos Culicidae com vetores emergentes de infecção. **Rev. Saúde Pública.** 32(6):497-502.
- FORATTINI, O. P. 2002. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 860p.
- FORATTINI, O. P.; GOMES, A. C.; NATAL, D.; KAKITANI, I.; MARUCCI, D. 1987. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale da Ribeira, São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública** 21:171-187.
- FORRESTER, D. J.; JACKSON, R. F.; MILLER, J. F.; TOWNSEND, B. C. 1973. Heartworms in captive California sea lions. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 163(6): 568-9.
- FORTON, K. F.; CHRISTENSEN, B. M.; SUTHERLAND, D. R. 1985. Ultrastructure of the melanization response of *Aedes trivittatus* against inoculated *Dirofilaria immitis* microfilariae. **J. Parasitol.** 71(3):331-341.
- FRANK, J. R.; NUTTER, F. B.; KYLES, A. ; ATKINS, C. E.; SELLON, R. K. 1997. Sistemic arterial dirofilariosis in five dogs. **J. Vet. Intern. Med.** 11(3):189-194.

- GAMBLE, K. C.; FRIED, J. J.; RUBIN, G. J. 1998. Presumptive dirofilariasis in a pale-head saki monkey (*Pithecia pithecia*). **J. Wildl. Dis.** 29(1):50-54.
- GOGGIN, J. M.; BILLER, D. S.; ROSRT, C. M.; DeBEY, B. M.; LUDLOW, C. L. 1997. Ultrasonographic identification of *Dirofilaria immitis* in the aorta e liver of a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 210(11):1635-1637.
- GOODWIN J. C. 1998. The serologic diagnosis of heartworm infection in dogs and cats. **Clin. Tech. Small Anim. Pract.** 13(2):83-87.
- GRAUER, G. F. 1989. Experimental *Dirofilaria immitis*-associated glomerulonephritis induced part by *in situ* formation in immune complexes in the glomerular capillary wall. **J. Parasitol.** 75:585-593.
- GUEVARA, R. F. S.; FUENTES, R. N.; RODRIGUEZ, D. H.; ROMERO, H. Q. 1996. Frecuencia de *Dirofilaria immitis* en perros de seis ciudades do México. **Veterinária México.** 27 (1):34-36.
- GUO, X.; BEERNTSEN, B. T.; ZHAO, X.; CHRISTENSEN, B. M. 1995. Hemocyte alterations during melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the mosquito *Armigeres subalbatus*. **J. Parasitol.** 81(2):200-207.
- GUPTA, A. P. 1979. Hemocyte types: their structures, synonymies, interrelationships and taxonomic significance. *In*: GUPTA, A .P. **Insect Hemocytes, development, forms, function and technics.** Cambridge University Press, p. 85-127.
- GUPTA, M. K.; PRASAD, K. D.; SINGH, K. K.; HAQUES, S. 1999. Ocurrance of dirofilariosis in lions and tigers. **J. Vet. Parasitol.** 13(1):77-78.
- GUTIERREZ, Y.; CATELLIER, M. J.; WICKER, D. L.; CATALLAER, M. 1997. Extrapulmonary *D. immitis*-like infections in the Western Hemisphere. **Am. J. Sur. Pathol.** 20(3):299-305.

- GWADZ, R. W.; KASLOW, D.; LEE, J. Y.; MALOY, W. L.; ZASLOFF, M. ; MILLER, L. H. 1989. Effects of magainins and cecropins on the esporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. **Infect. Immun.** 57:2628-2633.
- GWIN, R. M.; GELATT, K. N.; PEIFFER, R. L. 1977. Ophthalmic nodular fasciitis in the dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 170:611-614.
- HAHN, N.E. 1999. Parasitas do Sangue. *In*: SLOSS, M.W.; ZAJAC, A.M.; KEMP, R. L. **Parasitologia Clínica Veterinária**. Manole, SP. p.101-120.
- HAMIR, A. N. 1987. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) in the brain of a dog. **Vet. Record.** 28: 207-8.
- HARRISON, E. J.; THOMPSON, J. J. 1965. Dirofilariasis of human lung. **Am. J. Clin. Pathol.** 43:224-234.
- HARVEY, W. R. 1980. Water and ions in the gut. *In* : **Insect biology in the future**. M.Locke and D.S. Smith. Academic Press, N.Y. p.105-124.
- HARWELL, G.; CRAIG, T. M. 1981. Dirofilariasis in a red panda. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 179(11):1258.
- HAYASAKI, M; OKAJIMA, J; SONG, K. H.; SHIRAMIZU, K. 2003. Diurnal variation in microfilaremia in a cat experimentally infected with larvae of *Dirofilaria immitis*. **Vet. Parasitol.** 111(2/3):267-272.
- HENRY, C. J. 1992. Salivary mucocele associated with dirofilariosis in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 200(12):1965-1966.
- HIRANO, H.; KIZAKI, T.; SACHIKATA, T.; MATSUMURA, T. 2002. Pulmonary dirofilariosis – clinicopathological study. **Kobe J. Med. Sci.** 48(3-4):79-86.
- HOLZMAN, S.; CONROY, M. J.; DAVIDSON, W. R. 1992. Diseases, parasites and survival of coyotes in outh-central Georgia. **J. Wildl. Dis.** 28(4):572-580.

- HOOVER, J. P.; CAMPBELL, G. A.; FOX, C. F. 1996. Comparison of eight diagnostic blood tests for heartworm infection in dogs. **Canine Pract.** 21(1):11-19.
- IBGE. 2004. Disponível em <http://www.ibge.gov.br> . Acesso em 26 mai. 2005.
- IPARDES. 1997. Disponível em <http://www.pr.gov.br/ipardes>. Acesso em 20 mai. 2005.
- JOHNSON, B. W. 1989. Retinitis and intraocular larval migration in a group of border collies. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 25:623-629.
- JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. 1993. **Pathology of domestic animals.** Academic Press, New York. Volume 3. 4<sup>o</sup>. Ed.
- KAAYA, G. P.; RATCLIFFE, N. A . 1982. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans. **J. Morph.** 173:351-365.
- KAISER, I.; WILLIAMS, J. F. 2004. *Dirofilaria immitis*: worm burden and pulmonary artery proliferation in dogs from Michigan (United States). **Vet. Parasitol.** 120(1-2):125-9.
- KIM, M. K.; KIM, C. H.; YEOM, B. W.; PARK, S. H.; CHOI, S. H.; CHOI, J. S. 2002. The first human case of hepatic dirofilariosis. **J. Korean Med. Sci.** 17(5):686-690.
- KLEIN, J. B.; STODDARD, E. D. 1977. *Dirofilaria immitis* recovered from a horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 171(4):354-355.
- KNIGHT, D. H. 2002 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Am. Heartworms Soc. Bull.** 29(3):4-11.
- KNIGHT, D. H. Diretrizes 1999 para diagnóstico, prevenção e tratamento da infecção por verme do coração (*Dirofilaria immitis*) em cães. **Am. Heartworms Soc. Bull.** 26(2):1-8.

- KOTANI, T.; POWERS, K. G. 1982. Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. **Am. J. Vet. Res.** 43(12):2199-2206.
- LABARTHE, N.; PEREIRA, N. R.; SOARES, A. M.; BORDINI, E.L.; ROTTA, A.; GUERREIRO, J. 1998. Prevalência de microfilária de *Dirofilaria immitis* em diferentes populações caninas do Estado do Rio de Janeiro. **Cães e Gatos.** 27:24-25.
- LABARTHE, N.; FERREIRA, A. M. R.; GUERRERO, J.; NEWCOMB, K.; PAES-DE-ALMEIDA, E. 1997. Survey of *Dirofilaria immitis* (Leydi, 1856) in random source cats in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil, with descriptions of lesions. **Vet. Parasitol.** 71(4):301-306.
- LABARTHE, N.; SERRÃO, M. L.; MELO, Y. F.; OLIVEIRA, S. J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 1998. Mosquito frequency and feeding habits in a enzootic canine dirofilariasis área in Niteroi, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 93(2):145-154.
- LACKIE, A. M. 1981. Imune recognition in insects. **Dev. Comp. Immunol.** 5:191-204.
- LAGROTTERIA, D. D.; CROWTHER, M. A.; LEE, C. H.; PEREGRINE, A. 2003. A 44-year-old woman with dry cough and solitary nodule. **JAMC.** 160(7):696-697.
- LAI, C. H.; TUNG, K. C.; OOI, H. K.; WANG, J. S. 2000. Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as a vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial competence. **Vet. Parasitol.** 90(3):231-237.
- LAI-FOOK, J. 1973. The structure of the hemocytes of *Calpodes ethlius* (Lepidoptera). **J. Morphol.** 139:79-104.
- LEE, J. C.; LEE, C. Y.; SHIN, S. S.; LEE, C. G. 1996. A survey of canine heartworm infections among German shepherds in South Korea. **Korean J. Parasitol.** 34(4):225-231.
- LEE, K. J.; PARK, G. M.; YONG, T. S.; IM, K.; JUNG, S. H.; JEONG, N. Y.; LEE, W. Y.; YONG, S. J.; SHIN, K. C. 2000. The first Korean case of human pulmonary dirofilariasis. **Yonsei Med.** 41(2):285-288.

- LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. E. 1996. **Biology of Insect midgut**. Chapman & Hall, New York. 288 pp.
- LEHANE, M. J. 1996. Digestion and fate of the vertebrate bloodmeal in insects. *In: The immunology of host-ectoparasitic arthropod relationships*. Wikel S.K.UK. 131-149.
- LI, J.; NAPPI, A. J. 1992. N-acetyltransferase activity during ovarian development in the mosquito *Aedes aegypti* following blood feeding. **Insect Biochem. Molec. Biol.** 22:49-54.
- LI, J.; TRACY, J. W.; CHRISTENSEN, B. M. 1989. Hemocyte monophenol oxidase activity in mosquitoes exposed to microfilariae. **J. Parasitol.** 75:1-5.
- LINDSEY, J. R. 1965. Identification of canine microfilariae. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 146(10):1106-1114.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DEANE, L. M. 1995. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhyncus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 90(3):387-388.
- LOWRIE, R. C., Jr. 1991. Poor vector efficiency of *Culex quinquefasciatus* following infection with *Dirofilaria immitis*. **J. Am. Mosq. Cont. Ass.** 7:30-36.
- LUDDERS, J. W.; GRAUER, G. F.; DUBIELZIG, R. R.; RIBBLE, G. A. ; WILSON, J. W. 1988. Renal microcirculatory and correlated histologic changes associated with dirofilarias in dogs. **Am. J. Vet. Res.** 49(6):826-830.
- LUDLAM, K. W.; JACHOWSKI, L. A.; OTTO, G.F. 1970. Potencial vectors of *Dirofilaria immitis*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 157(1-12):1355-9.
- MACEDO, F. C.; LABARTHE, N.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 1998. Susceptibility of *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) to *Dirofilaria immitis* (Leydi, 1856), an emerging zoonosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 93(4):435-437.

- MANELLA, C.; DONOGHUE, A. R. 1998. Feline heartworm disease and its diagnosis. **Feline Pract.** 26(2):5-9.
- MANSOUR, A. E.; McCALL, J. W.; McTIER, T. L. 1996. Epidemiology of feline dirofilariasis. Infections induced by simulated natural exposure to *Aedes aegypti* experimentally infected with heartworms. In: Soll MD, Knighth DH, eds. Proceedings of the heartworm symposium'95. Batavia, IL: American heartworm Society. pp 87-95.
- MARANHO, A.; NASCIMENTO, C. C.; SARTORI, F. I. 1997. Infecção por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em lobo marinho sul-americano (*Arctocephalus australis* – ZIMMERMAN, 1783). Anais do I Congresso e VI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens – ABRAVAS. 28 de julho a 01 de agosto. Pirassununga, São Paulo. P. 21.
- MARKS, C. A.; BLOMOMFIELD, T. E. 1998. Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban Melbourne. **Vet. Parasitol.** 78(2):147-154.
- MARTINI, M.; CAPELLI, G., POGLAYEN, G. 1996. The validity of some haematological and ELISA methods for the diagnosis of canine heartworm disease. **Vet. Res. Commun.** 20(4):330-339.
- MATSUDA, K.; BAEK, B. K.; LIM, C. W. 2003. Eurasian otter (*Lutra lutra*), a definitive host of *D. immitis*. **J. Zoo. Wildl. Med.** 34(2):200-201.
- McCALL, J. W.; SUPAKORNDEJ, N. 2001. Evaluation of feline heartworm antibodies test kits. **Proc. Heartworm Symp.**
- McCALL, J. W. 1998. Dirofilariasis in domestic ferret. **Clin. Tech. Small Anim. Pract.** 13(2):109-112.
- McGREEVY, P. B.; BRYAN, J. H.; OOTHUMAN, P.; KOLSTRUP, N. 1978. The lethal effects of the cibarial and pharyngeal armatures of mosquitoes on microfilaria. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 72:361-368.

- MEDWAY, W.; WIELAND, T. C. 1975. *Dirofilaria immitis* infection in foca. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 167(7):549-550.
- MERRIL, J. R.; LOGAN, W. D. 1980. The dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) in a man: na epidemic pending or in progress?. **JAMA.** 243:1066-1068.
- METCHNIKOFF, E. Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. Paris, 1892 (Reprinted by Dover Publications, Inc., New York, 1968, as *Leitures on the Comparative Pathology of Inflammation*) microorganisms and parasitoides. *In: The physiology of Insecta.* Academic Press, N.Y. and London. p.448-536, 1974.
- MIMORI, T.; TADA, I.; TAKEUCHI, T. 1986. *Dirofilaria* infection in the breast of a woman in Japan. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** 17(2):165-167.
- MORI, S.; HIROTSU, Y.; MIZOGUCHI, A.; KAWABATA, M.; NAKAMURA-UCHIYAMA, F.; NAWA, Y.; OSAME, M. 2004. Pulmonary dirofilariasis with serologic study on familial infection with *Dirofilaria immitis*. **Intern. Med.** 43(4): 327-30.
- MRUGESHKUMAR, K. S. 1999. Human pulmonary dirofilariasis: review of literature. **Southern Med. J.** 92(3):276-279.
- MUNKIRS, D. D.; CHRISTENSEN, B. M.; TRACY, J. W. 1990. Hight-pressure liquid chromatografic analysis of hemolymph plasma catecholamines in immune-reactive *Aedes aegypti*. **J. Invert. Pathol.** 56:267-279.
- MUPANOMUNDA, M.; WILLIAMS, J. F.; MACKENZIE, C. D.; KAISER, L. 1997. *Dirofilaria immitis*: Heartworm Infection Alters Pulmonary Artery Endothelial Cell Behavior. **J. Appl. Physiol.** 82(2):389-398.
- MURATA, K.; YANAI, T.; AGTSUMA, T.; UNI, S. 2003. *D. immitis* infection of a snow leopard (*Uncia uncia*) in a japanese zoo with mitochondrial DNA analysis. **J. Med. Vet. Sci.** 65(8):945-947.

- MURO, A.; GENCHI, C.; CORDERO, M.; SIMON, F. 1999. Human dirofilariasis in the European Union. **Parasitol.Today**. 15(9):386-89.
- NAKAGAKI, K.; HAYAMA, S. I.; KANDA, E. 2000. Prevalence of dirofilarial infection in racoon dogs in Japan. **Parasitol. Int.** 49(3):253-256.
- NAPPI, A. J. 1975. Parasite incapsulation in insects. In: **Invertebrate immunity**. K.Maramorsch and R.F.Shope, eds. Academic Press, N.Y., p. 293-325.
- NAPPI, A. J.; CHRISTENSEN, B. M. 1987. Insect immunity and mechanisms of resistencia by nematodes. In: J. A. Veech and D. W. Dickson (eds). **Vistas on nematology**. Society of Nematologists, Hyattsville, Maryland, p. 285-291.
- NASCI, R. S.; MITCHELL, C. J. 1994. Larval diet, adult size, and susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with Ross River virus. **J. Med. Entomol.** 31:123-126.
- NAYAR, J. K.; SAUERMAN JR., D. M. 1975. Physiological basis of host suscepibility of Florida mosquitoes to *Dirofilaria immitis*. **J. Ins. Phys.** 21:1965-1975.
- NEWTON, W. L.; WRIGTH, W.H. 1956. The ocurrence of a dog Filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **J. Parasitol.** 42:246-256.
- NEW ZEALAND. MAF.A report of the risk to New Zeland of canine Heartworm (*Dirofilaria immitis*) and quarantine measures wich could be considered appropriated to reduce this risk. Disponível em: <http://www.maf.govt.nz/biosecurity/pests-diseases/animals/risk/dirofilaria-immitis.htm>. Acesso em 20 mar. 2004.
- NICHOLSON, C. P.; ALLEN, M. S.; TRASTEK, V. F.; TAZELAAR, H. D. 1992. *Dirofilaria immitis*: a rare increasing cause of pulmonary nodules. **Mayo Clin. Proc.** 67(7):646-650.
- NINOMIYA, H.; WAKAO, Y. 2002. Scanning elestron microscopy of vascular corrosion casts and histologic examination of pulmonary microvasculature in dogs with dirofilariosis. **Am. J. Vet. Res.** 63(11):1538-44.

- NISSEN, M. D.; WALKER, C. J. *Dirofilariasis*. eMedicine Journal, vol.4, n.2. 2003 Disponível em:<<http://author.emedicine.com/ped/topic599.htm>>. Acesso em 20 mar. 2004.
- NOGAMI, S.; MURASUGI, E.; SHIMAZAKI, K.; MAEDA, R.; HARASAWA, R.; NAKAGAKI, K. 2000. Quantitative analysis of microfilarial periodicity of *Dirofilaria immitis* in cats. **Vet. Parasitol.** 92(3):227-232.
- OKUDA, K.; CAROCI, A. S.; RIBOLLA, P. E. M.; BIANCHI, A. G.; BIJOVSKY, A. T. 2002. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. **Tissue & Cell.** 34(3):210-219.
- ORTEGA-MORENO, J.; RIBAS-DEL-RIO, F.; RAMIREZ-GASCA, T. 1994. Microfilariae in the mammary gland in a bitch. **Vet. Rec.** 135(10):231-232.
- OYAMADA, T.; KUDO, N.; YOSHIKAWA, T. 1995. Pulmonary dirofilariasis in a japanese hare, *Lepus brachyurus angustidens*. **J. Vet. Med. Sci.** 57(5):947-949.
- PAES-DE-ALMEIDA, E. C.; FERREIRA, A. M. R.; LABARTHE, M. V.; CALDAS, M. L. R.; McALL, J. W. 2003. Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Vet. Parasitol.** 113:157-169.
- PATTON, C. S.; GARNER, F. M. 1970. Cerebral infarction caused by heartworm (*Dirofilaria immitis*) in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 156:600-604.
- PAUL-MURPHY, J.; WORK, T.; HUNTER, D.; McFIE, E.; FJELLINE, D. 1994. Serologic survey and serum biochemical reference ranges of the free-ranging mountain lion (*Felis concolor*) in California. **J. Wildl. Dis.** 30(2):205-215.
- PENCE, D. B.; TEWES, M. E.; LAACK, L. L. 2003. Helminths of the ocelot from southern Texas. **J. Wildl. Dis.** 39(3):683-9.
- PYE, A. E.; YENDOL, W. G. 1972. Hemocytes containing polyphenoloxidase in *Galleria* larvae after injections of bacteria. **J. Invert. Pathol.** 19:166-170.

- REBAR, A. H. 1981. Red cell fragmentation in the dog: an editorial review. **Vet. Pathol.** 18:415-426.
- REIFUR, L.; SOCCOL, V. T.; MONTIANI-FERREIRA, 2004. Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Vet. Parasitol.** 122(4):273-286.
- RIBEIRO, J. M. C. 2000. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Med. Vet. Entomol.** 14, 142-148.
- RO, J. Y.; TSAKALAKIS, P. J.; WHITEEE, V. A.; LUNA, M. A.; GHANG-TUNG, E. G.; GREEN, L.; CRIBBETT, L.; AYALA, A. G. 1989. Pulmonary dirofilariasis: the great imitator of primary or metastatic lung tumor. **Hum. Pathol.** 20:69-76.
- ROCGA, A.; TARRAGA, K. M.; FERREIRA, F. 1997. Ocorrência de dirofilariose canina detectada através de teste ELISA em soros de animais analisados no PROVET. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Clínicos de Pequenos Animais. Curitiba, Paraná. 16 a 21 de novembro. Pg 18.
- RODRIGUES-SILVA, R.; MOURA, H.; DREYER, G.; REY, L. 1995. Human pulmonary dirofilariasis: a review. **Vet. Inst. Med. Trop.** São Paulo. 37(6):523-530.
- RODRIGUES-SILVA, R.; GUERRA, R. J.; ALMEIDA, F. B.; MACHADO-SILVA, J. R.; PAIVA, D. D. 2004. Dirofilariose pulmonar humana no Estado do Rio de Janeiro, Brasil: Relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 37(1): 56-9.
- RODRIGUEZ, B.; ROS, A. T.; GRANT, S.; ORIHIEL, T. C. 2003. Human dirofilariasis in Costa Rica; *Dirofilaria immitis* from de periorbital tissues. **Parasite.** 10(1):87-89.
- ROMOSER, W. S.; MOLL, R. M.; MONCAYO, A. C.; LERDTHUSNEE, K. 2000. The occurrence and fate of the meconium and meconial peritrophic membranes in pupal and adult mosquitoes (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.** 37(6):893-896.

- ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. 1976. Na ultrastructural study of the in vitro phagocytosis of *Escherichia coli* by the hemocytes of *Calliphora erythrocephala*. **J. Ultrastruct. Res.** 55:193-202.
- ROYAL CANIN. **Enciclopédia do cão**. Aniwa S.A. 2001. 635pp.
- RUSSEL, R. C.; GEARY, M. J. 1992. The susceptibility of the mosquitoes *Aedes notoscriptus* and *Culex annulirostris* to infection with dog heartworm *Dirofilaria immitis* and their vector efficiency. **Med. Vet. Entom.** 6:154-158.
- SACKS, B. N.; CASWELL-CHEN, E. P. 2003. Reconstructing the spread of *Dirofilaria immitis* in California coyotes. **J. Parasitol.** 89(2):319-323.
- SAKO, T.; BURIOKA, N.; SUYAMA, H.; KINUGASA, Y.; WATANABE, M.; HIRAI, K.; SHIMIZU, E. 2000. Human pulmonary dirofilariasis presenting in a small nodule with cavity. **J. Med. Invest.** 47(3-4):161-163.
- SAMUEL, P. P.; ARUNACHALAM, N. HIRIYAN, J.; THENMOZHI, V.; GAJANANA, A.; SATYANARAYANA, K. 2004. Host-feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* Say and *Mansonia annulifera* (Theobald) (Diptera:Culicidae), the major vectors of filariae in a rural area of south India. **J. Med. Entomol.** 41(3):442-6.
- SASAI, H.; KATO, K.; SASAKI, T.; KOYAMA, S.; KOTANI, T.; FUKATA, T. 2000. Echocardiographic diagnosis of dirofilariosis in a ferret. **J. Small Anim. Pract.** 41(4):172-174.
- SATO, S.; NOGAMI, S.; NAKAGAKI, K.; INOUE, I.; SHIRAI, W.; ARAKI, K. 1994. Histopathology of the lungs of rabbits experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. **J. Comp. Pathol.** 110(4):403-406.
- SAWYER, T. K. 1975. Seasonal fluctuations of microfilariae in two dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. In: **The heartworm symposium '74**. Proceedings .....Auburn. 161:23-25.
- SCOTT, D. W.; VAUGHN, T. C. 1987. Papulonodular dermatitis in a dog with occult filariasis. **Compan. Anim. Pract.** 1:31-35.

- SCHEREY, C. F.; TRAUTVETTER, E. 1998. Dirofilariosis canina y felina – diagnóstico y tratamiento. **Waltham Focus**. 8(2): 23-30.
- SEGOVIA, J. M.; TORRES, J.; MIGUEL, J.; LLANEZA, L.; FELIU, C. 2001. Helminths in the wolf, *Canis lupus* from north-western Spain. **J. Helminthol.** 75(2):183-192.
- SERRÃO, M. L.; BATISTA, R.; PAES-DE-ALMEIDA, E.; SANTOS, P.; MELO, F., LABARTHE, N. 2000. Descrição da população de animais de companhia e epidemiologia da dirofilariose canina em Itacoatiara, município de Niterói, Rio de Janeiro. *Ver. Bras. Cienc. Vet.* 7(1):29-32.
- SERRÃO, M. L.; LABARTHE, N.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 2001. Vetorial competence of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) Rio de Janeiro strain to *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96(5):553-558.
- SHIAO, S. H.; HIGGS, S.; ADELMAN, Z.; CHRISTENSEN, B. M.; LIU, S. H.; CHEN, C. C. 2001. Effect of prophenoloxidase expression knockout on the melanization of microfilariae in the mosquito *Armigeres subalbatus*. **Ins. Mol. Biol.** 10(4):315-321.
- SILVA, M. A. N.; ZAGONEL, L. B.; LEITE, L. C. 2003. Culicidae (Diptera) vetores potenciais de filariose canina em Guaratuba, Paraná. **Anais do XI Evento de Iniciação Científica – EVINCI:** realizado em Curitiba de 29 a 31 de outubro de 2003. Curitiba. P.42.
- SKIDMORE, P. J.; DOOLEY, D. P.; DEWITT, C. 2000. Human extrapulmonary dirofilariasis in Texas. **Southwern Med. J.** 93(10):1009-1010.
- SLOSS, M. W.; KEMP, R. L.; ZAJAC, A. M. 1999. **Parasitologia Clínica Veterinária.** Editora Manole. Sexta Ed. SP Brasil. 198 pp.
- SMITH, C. R.; FOREMANN, M. M.; HEIL, J.; HAMMOND, C. 1978. Heartworm removal from the eye. **Canine Pract.** 6:48-49.

- SNYDER, D. E.; HAMIR, A. N.; HANLON, C. A.; RUPPRECHT, C. E. 1989. *Dirofilaria immitis* in a racoon (*Procyon lotor*). **J. Wildl. Dis.** 25(1):130-131.
- SNYDER, P. S.; LEVY, J. K.; SALUTE, M. E., GORMAN, S. P.; KUBILIS, P. S.; SMAIL, P. W.; GEORGE, L. L. 2000. Performance of serologic tests used to detect heartworm infection in cats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 216(5):693-700.
- SOUZA, N. F.; BENIGNO, R. N. M.; FIGUEIREDO, M.; SALIM, S. K.; SILVA, D.; GONÇALVES, R.; PEIXOTO, P. C.; SERRA-FREIRE, N. M. 1997. Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém-PA, com base na microfilaremia. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 6(1):83-86.
- STARR, T. W.; MULLEY, R. C. 1988. *Dirofilaria immitis* in the dingo (*Canis familiaris dingo*) in a tropical region of Northern Territory, Australia. **J. Wildl. Dis.** 24(1):164-165.
- STRICKLAND, K. N. 1998. Canine and feline caval syndrome. **Clin. Tech. Small Anim. Pract.** 13(2):88-95.
- STUEBEN, E. B.; 1954. Larval development of *Dirofilaria immitis* in fleas. **J. Parasitol.** 580-588.
- SUMANOCHITRAPON, W.; STRICKMAN, D.; SITHIPRASASNA, R.; KITTAYAPONG, P.; INNIS, B. L. 1998. Effect of size and geographic origin of *Aedes aegypti* on oral infection with dengue-2 virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 58:283-286.
- SUPAKORNDEJ, P.; McCALL, J. W.; JUN, J. J. 1994. Early migration and development of *Dirofilaria immitis* in the ferret, *Mustela putorius furo*. **J. Parasitol.** 80(2):237-244.
- TAKEUCHI, T.; ASAMI, K.; KOBAYASHI, S.; MASUDA, M.; TANABE, M.; MIURA, S.; ASAKAWA, M.; MURAI, T. 1981. *Dirofilaria immitis* infection in man: report of a case of infection in heart and inferior vena cava from Japan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 30:966-969.
- TALLURI, M. V.; BIGLIARDI, E.; CANCRINI, G. 1993. Comparative ultrastructural study of *Dirofilaria repens* (Nematoda: Filaroidea) development in suscetibel and refractory strains of *Aedes aegypti*. **Boll. Zool.** 60:377-33.

- THEIS, J. H.; GILSON, A.; SIMON, G. E.; BRADSHAW, B.; CLARK, D. 2001. Case report: unusual location of *Dirofilaria immitis* in a 28-years-old man necessitates orchiectomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 64(5-6):317-322.
- THURMAN, J. D.; JOHNSON, B. J.; LICHTENFELS, J. R. 1984. Dirofilariasis with arteriosclerose in a horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 185(5):532-533.
- TO, E. W. H.; TSANG, W. M.; CHAN, K. F. 2003. Human dirofilariasis of de buccal mucosa: a case report. **Int. J. Oral Maxillo. Surg.** 32(1):104-106.
- TRAGER, W. 1974. Some aspects of intracellular parasitism. **Science.** 183:269-273.
- TSUNG, S. H.; LIU, C. C. 2003. Human pulmonary dirofilariasis in Taiwan. **J. Formos. Med. Assoc.** 102(1):42-45.
- URNINATTI, P. R.; NATAL, D.; COSTA, C. B.; CERETTI, W. 2002. Estudo da variação sazonal em população de *Culex quinquefasciatus* em área periurbana da cidade de São Paulo. **Biológico.** 64(1): 1-122.
- VIANNA, E. E. S.; COSTA, P. R. P.; RIBEIRO, P. B. 1996. Longevidade e viabilidade do ciclo aquático do *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Díptera:Culicidae) em condições ambientais, em Pelotas, RS. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 5(1):53-56.
- VICNETE, N. A.; AMATO, V. S.; MORAES, JR, A. C. P.; CERRI, G. G. 1993. Dirofilariose pulmonar humana adquirida no Brasil: comunicação de um caso. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo. 35(5):457-460.
- WALTERS, L. 1995. Risk factors for heartworm infection in northern Califórnia. *In: Heartworm symposium '95.* Proceedings .....Batavia. 334:5-26.
- WANG, L. C. 1998. Comparison of a whole-blood agglutination test and ELISA for detection of the antigens of *Dirofilaria immitis* in dogs. **An. Trop. Med. Parasitol.** 92(1):73-77.

- WEIL, G. J. 1987. *Dirofilaria immitis*: identification and partial characterization of parasite antigens in the serum of infected dogs. **Exp. Parasitol.** 64:244-251.
- WIXSON, M. J.; GREEN, S. P.; CORWIN, R. M.; FRITZELL, E. K. 1991. *Dirofilaria immitis* in coyotes and foxes of Missouri. **J. Wildl. Dis.** 27(1):166-169.
- YAMAZAKI, A; KUBOTA, K.; SHIMOTA, H.; WRIGHT, J. C.; HENDRIX, C. M.; BROWN, R. G. 1998. Dirofilariasis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 194(5):644-648.
- XAVIER, M. 1946. Notificação da dirofilariose em cães provenientes do Rio e Niterói. **Congresso Brasileiro de Veterinária 3.** Porto Alegre. 249-255.
- YOON, H. Y.; YOON, C. S.; JEONG, S. W.; KIM, T. J.; PARK, S. Y.; CHUNG, B. H.; CHOI, Y. M.; LEE, W. C. 2002. Prevalence and relative risk of canine dirofilariasis among dogs in Seoul, South Korea. **Vet. Record.** 151:576-577.
- YOSHINO, M.; HISAYOSHI, T.; SASAKI, T.; YAMAUCHI, S.; OAKI, Y.; HINO, M. 2003. Human pulmonary dirofilariasis in a patient whose clinical condition altered during follow-up. **Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 51(5):211-213.
- ZACHARY, D.; BREHELIN, M.; HOFFMANN, J. A. 1975. Role of the trombocytoids in capsule formation in the dipteran *Calliphora erythrocephala*. **Cell Tissue Res.** 162:342-348.
- ZACHARY, D.; HOFFMANN, J. A. 1973. The hemocytes of *Calliphora erythrocephala* Meig (Diptera). **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.** 141:55-73.
- ZAHEDI, M.; VELLAYAN, S.; JEFFERY, J.; KRISHNASAMY, M. 1986. A case of double infection with *Brugia pahangi* Buckley and Edeson 1956, and *Dirofilaria immitis* Leidy 1856, in a malaysian clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). **Vet. Parasitol.** 21(2):135-137.
- ZHAO, X.; FERDING, M. T.; LI, J.; CHRISTENSEN, B. M. 1995. Biochemical pathway of melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the mosquito *Armigeres subalbatus*. **Devel. Comp. Immunol.** 19(3):205-215.