



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL - PPGCA
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA

EDUARDA VIANA MAFRA CARDOSO

**ANÁLISE DOS MARCADORES DE RESISTÊNCIA ÀS LACTONAS MACROCÍCLICAS
- GLICOPROTEÍNA-P (P-GP) e β -TUBULINA - EM AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE
CÃES DO ESTADO DE ALAGOAS, INFECTADOS COM *Dirofilaria immitis***

Maceió - AL

2025

EDUARDA VIANA MAFRA CARDOSO

**ANÁLISE DOS MARCADORES DE RESISTÊNCIA ÀS LACTONAS MACROCÍCLICAS
- GLICOPROTEÍNA-P (P-GP) e β -TUBULINA - EM AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE
CÃES DO ESTADO DE ALAGOAS INFECTADOS COM *Dirofilaria immitis***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Wagner José Nascimento
Porto

Coorientador: Prof. Dr. Abelardo Silva Júnior

Maceió - AL

2025

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Polo Viçosa
Bibliotecário Responsável: Stefano João dos santos

C268a Cardoso, Eduarda Viana Mafra

Análise dos marcadores de resistência às lactonas macrocíclicas – glicoproteína – P (P –GP) e β -tubulina – em amostras sanguíneas de cães do estado de Alagoas , infectados com dirofilaria immitis/ Eduarda Viana Mafra Cardoso - 2025.

61f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Ciência animal) Programa de pós – graduação em ciência animal - PPGCA - Universidade Federal de Alagoas, Campus Ceca, Polo Viçosa, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto

Coorientador: Prof. Dr. Abelardo Silva Júnior

Inclui bibliografia.

EDUARDA VIANA MAFRA CARDOSO

**ANÁLISE DOS MARCADORES DE RESISTÊNCIA ÀS LACTONAS MACROCÍCLICAS
- GLICOPROTEÍNA-P (P-GP) e β -TUBULINA - EM AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE
CÃES DO ESTADO DE ALAGOAS, INFECTADOS COM *Dirofilaria immitis***

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal e aprovada 21 agosto de 2025.



Documento assinado digitalmente
WAGNER JOSE NASCIMENTO PORTO
Data: 25/09/2025 21:11:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Wagner José Nascimento Porto, UFAL
Orientador/Presidente

BANCA EXAMINADORA:



Documento assinado digitalmente
THAIS FERNANDA DE CAMPOS FRAGA DA SILVA
Data: 24/09/2025 13:09:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Thaís Fernanda de Campos Fraga da Silva, UFAL
Examinadora Interna



Documento assinado digitalmente
THIAGO JOSE MATOS ROCHA
Data: 25/09/2025 20:54:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Thiago José Matos Rocha, UNCISAL
Examinador Externo

Maceió – AL
2025

“Antes de ter amado um animal,
parte da nossa alma permanece desacordada”

Anatole France

RESUMO

A dirofilariose, causada por *Dirofilaria immitis*, é uma parasitose de grande relevância global na medicina veterinária, afetando principalmente cães, mas também gatos e, acidentalmente, humanos. Transmitida por mosquitos culicídeos, sua prevalência é maior em regiões tropicais e subtropicais devido às condições ambientais favoráveis ao vetor. Os parasitos adultos de *D. immitis* se localizam nas artérias pulmonares e, principalmente no lado direito do coração dos cães, com a gravidade clínica diretamente relacionada à carga parasitária e à duração da infecção. O ciclo biológico do parasito no mosquito vetor é um processo complexo e termo-dependente, que impacta tanto a transmissão quanto a patogenia da dirofilariose. O diagnóstico da dirofilariose é fundamental para o controle e baseia-se na combinação de métodos diretos, como o teste de Knott modificado para detecção de microfilárias, e indiretos, como a pesquisa de antígenos de parasitos adultos. A biologia molecular, particularmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem se tornado uma ferramenta essencial por sua alta sensibilidade e capacidade de diferenciar espécies, sendo crucial para identificar infecções ocultas e auxiliar em inquéritos epidemiológicos. Em relação à profilaxia e ao tratamento da dirofilariose, as lactonas macrocíclicas (LMs), fármacos eficazes na eliminação de microfilárias e na prevenção da infecção, vem sendo utilizados rotineiramente na clínica de pequenos animais. Contudo, a emergência e disseminação de cepas de *D. immitis* resistentes às LMs representa um desafio crescente para a eficácia profilática, impactando o controle da doença globalmente. Casos de resistência já foram descritos, inclusive com evidências recentes na Europa e indícios no Brasil, sugerindo que o uso inadequado dos fármacos e mutações em genes como os da glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub) contribuem para esse fenômeno. Diante desse cenário de resistência e da lacuna de dados acerca dos marcadores genéticos em *D. immitis*, este trabalho objetivou analisar os possíveis polimorfismos nos genes glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub) em amostras de *D. immitis* circulantes no estado de Alagoas. Para tanto, 39 amostras de sangue de cães, previamente confirmadas como microfilarêmicas por técnica parasitológica ou com presença de antígenos circulantes detectados por meio de testes imunocromatográficos e provenientes de diversos municípios alagoanos, foram reavaliadas pela técnica de Knott modificada para confirmação laboratorial, e seu DNA foi extraído. Posteriormente, as amostras foram submetidas à PCR convencional, utilizando *primers* específicos para glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina. Dos ensaios realizados, 22 amostras apresentaram amplificação para ao menos um dos genes: 11 reagiram para ambos (P-gp e β -Tub), e 11 reagiram para apenas um (P-gp ou β -tub), enquanto as 17 restantes não amplificaram para nenhum. Em etapa posterior, utilizando Nested-PCR, 12 amostras amplificaram para o gene da glicoproteína-P (P-gp) e nenhuma para o gene da β -tubulina (β -Tub), das que amplificaram foi realizado o sequenciamento por Sanger. Três amostras sequenciadas apresentaram qualidade adequada para análise da posição 11, um dos loci associados à resistência, porém, não apresentaram polimorfismo. Este estudo é pioneiro na análise desses marcadores de resistência em amostras de cepas de *D. immitis* de Alagoas, gerando informações cruciais para o entendimento da dinâmica da doença e para o desenvolvimento de futuras estratégias de tratamento e prevenção na região.

Palavras-chave: Dirofilariose, Resistência a fármacos, Biologia molecular.

ABSTRACT

Heartworm disease, caused by *Dirofilaria immitis*, is a parasitic disease of great global importance in veterinary medicine, primarily affecting dogs, but also cats and, incidentally, humans. Transmitted by culicid mosquitoes, its prevalence is higher in tropical and subtropical regions due to environmental conditions favorable to the vector. Adult *D. immitis* parasites are located in the pulmonary arteries and, primarily, in the right side of the heart in dogs, with clinical severity directly related to the parasite load and duration of infection. The biological cycle of the parasite in the mosquito vector is a complex and thermodependent process, which impacts both the transmission and pathogenesis of heartworm disease. Diagnosis of heartworm disease is essential for control and is based on a combination of direct methods, such as the modified Knott test for microfilariae detection, and indirect methods, such as the detection of adult parasite antigens. Molecular biology, particularly the Polymerase Chain Reaction (PCR), has become an essential tool due to its high sensitivity and ability to differentiate species, crucial for identifying occult infections and aiding in epidemiological investigations. Regarding the prophylaxis and treatment of heartworm disease, macrocyclic lactones (MLs), drugs effective in eliminating microfilariae and preventing infection, have been routinely used in small animal clinical practice. However, the emergence and spread of ML-resistant *D. immitis* strains poses a growing challenge to prophylactic efficacy, impacting disease control globally. Cases of resistance have been described, including recent evidence in Europe and evidence in Brazil, suggesting that inappropriate use of these drugs and mutations in genes such as P-glycoprotein (P-gp) and β -tubulina (β -Tub) contribute to this phenomenon. Given this resistance scenario and the lack of data on genetic markers in *D. immitis*, this study aimed to analyze possible polymorphisms in the P-glycoprotein and α -tubulin genes in *D. immitis* samples circulating in the state of Alagoas. To this end, 39 blood samples from dogs previously confirmed as microfilaremic by parasitological techniques or with the presence of circulating antigens detected by immunochromatographic tests and originating from various municipalities in Alagoas were reevaluated using the modified Knott technique for laboratory confirmation, and their DNA was extracted. Subsequently, the samples were subjected to conventional PCR using primers specific for P-glycoprotein (P-gp) and β -tubulin. Of the assays performed, 22 samples showed amplification for at least one of the genes: 11 reacted for both (P-gp and β -tubulin), and 11 reacted for only one (P-gp or β -tubulin), while the remaining 17 did not amplify for either. In a later step, using nested PCR, 12 samples amplified for the P-glycoprotein gene and none for the β -tubulin gene and were sent for sequencing by Sanger. Three sequenced samples showed adequate quality for analysis of position 11, one of the loci associated with resistance, but did not show polymorphism. This study is a pioneer in the analysis of these resistance markers in samples of *D. immitis* strains from Alagoas, generating crucial information for understanding the dynamics of the disease and for the development of future treatment and prevention strategies in the region.

Keywords: Heartworm disease, Drug resistance, Molecular biology.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	
1	INTRODUÇÃO	6
2	OBJETIVOS	8
2.1	Geral	8
2.2	Específicos	8
3	REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1	Aspectos gerais sobre <i>Dirofilaria immitis</i>	9
3.2	Morfologia da <i>Dirofilaria immitis</i>	9
3.3	Ciclo Biológico da <i>Dirofilaria immitis</i>	11
3.4	Epidemiologia da infecção canina	14
3.4.1	Distribuição geográfica no Brasil	15
3.4.2	Distribuição geográfica em Alagoas	17
3.4.3	Hospedeiro intermediários e definitivos	18
3.5	Sinais Clínicos da Infecção Canina – Dirofilariose	19
3.6	O Diagnóstico de <i>Dirofilaria immitis</i>	20
3.6.1	Técnica de Knott Modificado	21
3.6.2	Técnica para detecção de Antígenos – ELISA	21
3.6.3	Biologia Molecular	22
3.6.4	Exames Complementares	23
3.7	Prevenção à Dirofilariose e o uso das Lactonas Macroclínicas	24
3.7.1	Iparasitocina	25
3.7.2	Milbemicina Oxima	26
3.7.3	Moxidectina	27
3.7.4	Selamectina	27
3.7.5	Outras Lactonas Macroclínicas: Abamectina, Doramectina e Nemadectina...	28
3.8	A Resistência às Lactonas Macroclínicas	29
3.8.1	Glicoproteína-P (P-gp)	30
3.8.2	β -tubulina (β -Tub)	30
3.8.3	Interação entre Glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub)	31
3.9	Considerações Finais	32
	REFERÊNCIAS	33
4	ARTIGO	42

1. INTRODUÇÃO

A Dirofilariose, causada pelo nematódeo *Dirofilaria immitis*, família Onchocercidae, gênero *Dirofilaria*, subgênero *Dirofilaria*, espécie *immitis*, é uma doença parasitária de grande relevância na medicina veterinária, acometendo principalmente os cães, *Canis lupus familiaris* (hospedeiro definitivo), além de gatos, furões e seres humanos (Leidy, 1856). Conhecida como "parasito do coração", sua transmissão ocorre por meio da picada de mosquitos culicídeos, como *Aedes* sp., *Culex* sp. e *Anopheles* sp., que atuam como hospedeiros intermediários (Cancrini, 2007). Em gatos, embora menos prevalente, a doença é clinicamente complexa devido à resposta inflamatória exacerbada (Dantas-Torres *et al.*, 2020). Em humanos, os casos são raros, mas quando ocorrem, estão associados a nódulos pulmonares ou subcutâneos (Simón *et al.*, 2012).

Os parasitos adultos normalmente são encontrados no lado direito do coração e nos vasos sanguíneos adjacentes dos cães, sendo responsáveis por condição debilitante que compromete o sistema respiratório e cardíaco. Cães sem sinais clínicos da doença podem albergar uma média de 25 parasitos. Quando os primeiros sinais clínicos como intolerância ao exercício e tosse começam a aparecer, é provável que haja cerca de 50 parasitos nos seus locais de predileção. Em cães com sinais de falência hepática aguda, apatia generalizada, anorexia, dentre outros, cerca de 100 parasitos estão concentrados na veia cava e no átrio direito (Jackson *et al.*, 1966).

O tratamento e controle da dirofilariose têm sido historicamente baseados no uso de fármacos da classe das lactonas macrocíclicas (LMs), como a ivermectina, milbemicina oxima, selamectina e moxidectina, que são eficazes na eliminação das microfilárias e na prevenção da infecção (McCall *et al.*, 2008).

Recentemente, foi descrito o primeiro caso de resistência às LMs em *D. immitis* na Europa. Um cão importado dos Estados Unidos para a Itália em 2023 apresentou infecção por uma cepa resistente, apesar do uso mensal de milbemicina oxima após sua chegada. A análise genética revelou mutações em posições específicas de nucleotídeos que indicam resistência, destacando o risco real de disseminação global de cepas resistentes. (Traversa & Prichard, *et al.*, 2024).

No Brasil, indícios de resistência também foram identificados, destacando a hipótese de que o uso inadequado ou indiscriminado desses antiparasitários favorece a seleção de cepas resistentes, resultando na fixação de mutações em genes relacionados à sensibilidade farmacológica (Bourguinat *et al.*, 2011; Prichard, *et al.*, 2021). O uso inadequado refere-se a

situações em que há indicação para o tratamento, mas a administração ocorre de forma incorreta, como por exemplo em doses subterapêuticas, intervalos de aplicação impróprios ou utilização em espécies e condições não recomendadas. Já o uso indiscriminado corresponde à aplicação do fármaco sem critério técnico ou diagnóstico prévio, muitas vezes de forma rotineira ou preventiva, sem justificativa epidemiológica. Ambas as práticas contribuem para a pressão seletiva sobre as populações parasitárias, favorecendo o surgimento e a disseminação de fenótipos resistentes (Oliveira *et al.*, 2024). Estudos recentes demonstraram que mutações no gene da glicoproteína-P (P-gp) (*P-gp*) e na β -tubulina (β -Tub) constituem potenciais marcadores moleculares de resistência às lactonas macrocíclicas (Geary *et al.*, 2011; Will, *et al.*, 2018).

Diante desse cenário, investigações sobre a presença desses polimorfismos em microfilárias circulantes tornam-se fundamentais para mapear a distribuição e a prevalência de cepas resistentes. Tal diagnóstico molecular é crucial para nortear estratégias de controle e preservar a eficácia dos tratamentos disponíveis.

Assim, considerando a crescente preocupação com o surgimento de cepas de *D. immitis* resistentes às lactonas macrocíclicas (LMs) e o histórico de uso inadequado e uso indiscriminado desses antiparasitários em cães no Brasil, hipotetiza-se que as populações de *D. immitis* circulantes no estado de Alagoas apresentam polimorfismos nos genes da glicoproteína-P (P-gp) (*P-gp*) e β -tubulina (β -Tub), os quais podem atuar como marcadores moleculares de resistência, refletindo a possível existência de cepas menos sensíveis aos regimes profiláticos convencionais.

Essa hipótese parte do pressuposto de que práticas de manejo e profilaxia incorretas ou sem critérios técnicos podem gerar pressão seletiva sobre os parasitos, favorecendo a emergência e a fixação de mutações em genes associados à sensibilidade farmacológica. A confirmação dessa hipótese fornecerá informações inéditas sobre o perfil genético de *D. immitis* na região, contribuindo para a implementação de estratégias de controle mais eficazes e embasadas em evidências moleculares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os possíveis polimorfismos existentes nos genes codificantes das proteínas glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub) como marcadores de resistência às Lactonas Macroclínicas em amostras de sangue de cães com *D. immitis* provenientes do estado de Alagoas.

2.2 Objetivos Específicos

Detectar a circulação de microfilária entre cães domésticos com base em técnicas laboratoriais de rotina, a partir de amostras sanguíneas cedidas de caninos atendidos em serviços veterinários de vários municípios do estado;

Analisar através de técnicas moleculares se as amostras de sangue de cães com presença de microfilárias, são amostras de *D. immitis*;

Verificar se os marcadores de glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub) estão presentes em todas as amostras;

Sequenciar as amostras em que os marcadores de glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub) foram encontrados;

Verificar possíveis polimorfismos nos marcadores da glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos Gerais sobre a *Dirofilaria immitis*

As microfilárias são formas larvais de nematódeos da família Onchocercidae, que incluem parasitos de importância médica e médica veterinária. Essas larvas circulam na corrente sanguínea ou nos tecidos dos hospedeiros vertebrados e são transmitidas por vetores artrópodes, como mosquitos (Bowman, 2020). Em cães/canídeos, duas espécies de *Dirofilaria* se destacam, a *D. immitis* e a *Dirofilaria repens*, sendo a *D. immitis* considerada a mais importante. Os mosquitos responsáveis por sua transmissão são os Culicídeos, principalmente *Aedes* sp., *Culex* sp. e *Anopheles* sp. atuando como hospedeiro intermediário (McCall *et al.*, 2008).

Quadro 1: Classificação sistemática do parasito.

Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Nematoda</i>
Classe	<i>Secernentea</i>
Ordem	<i>Spirurida</i>
Superfamília	<i>Filaridea</i>
Família	<i>Onchocercidea</i>
Gênero	<i>Dirofilaria</i>
Espécie	<i>Dirofilaria acutiuscula</i>, <i>Dirofilaria freitasi</i>, <i>Dirofilaria incrassata</i>, <i>Dirofilaria immitis</i>, <i>Dirofilaria magalhaesi</i>, <i>Dirofilaria repens</i>, <i>Dirofilaria spectans</i>, <i>Dirofilaria striata</i>.

Fonte da imagem: Mafra, *et al.*, 2025.

3.2 Morfologia da *Dirofilaria immitis*

A morfologia desta espécie apresenta características distintas em suas diferentes fases de desenvolvimento: microfilárias (larvas), larvas infectantes e parasitos adultos. De forma geral, a *D. immitis* é um nematódeo de corpo cilíndrico e alongado, com extremidades afiladas e de coloração branca/acinzentada, com aparência ligeiramente translúcida (Khanmohammadi, *et al.*, 2020). Seu tegumento é liso e resistente, o que confere proteção contra agressões

mecânicas e químicas. Como outros nematódeos, seu corpo é revestido por uma cutícula espessa, composta por camadas de colágeno, proporcionando resistência e flexibilidade (Anderson, 2000. Bowman, 200).

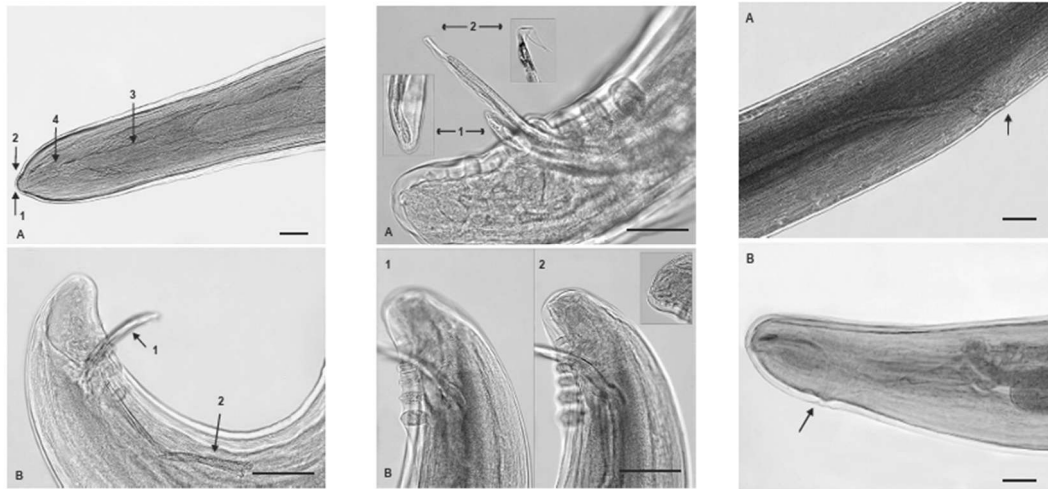
Os parasitos adultos, apresentam diferenças marcantes no tamanho e morfologia, tendo o macho de 12 a 18 cm de comprimento e cerca de 0,7 mm de diâmetro e a fêmea de 25 a 30 cm de comprimento e cerca de 1 mm de diâmetro. A cabeça do macho é arredondada e sem estruturas evidentes, como lábios ou ganchos. Sua cauda é curvada ventralmente e possui duas espículas desiguais utilizadas para cópula. Nas fêmeas, a cauda é reta ou ligeiramente afilada (Noack, 2021). Em relação ao sistema reprodutivo, as fêmeas são vivíparas, liberando microfilárias diretamente na corrente sanguínea do hospedeiro. Já os machos possuem testículos e canais deferentes que desembocam na cloaca, junto às espículas copulatórias (Bowman, 2020).

As larvas de microfilárias no estágio L1 são aquelas liberadas no sangue periférico do hospedeiro definitivo. Elas medem aproximadamente 280 a 320 μm de comprimento e 5 a 7 μm de largura, e apresentam extremidades arredondadas, bem como ausência de bainha. Movimentam-se ativamente na corrente sanguínea e isso é essencial para a transmissão no momento do repasto sanguíneo do mosquito vetor (Bowman, 2020).

As larvas de microfilárias no estágio L3, se tornam infectantes ainda dentro do mosquito vetor. Elas medem 1 mm de comprimento e apresentam um corpo fino e alongado, além de serem ativas e altamente móveis, localizando-se na região bucal do mosquito para serem inoculadas no novo hospedeiro (Noack, 2021).

Em relação às estruturas internas, os parasitos têm sistema digestório completo, com boca sem lábios evidentes, esôfago longo e intestino tubular. O sistema nervoso apresenta cordões nervosos longitudinais. O sistema excretor é composto por células excretoras especializadas, localizadas próximas ao esôfago. Quanto ao sistema reprodutivo, as fêmeas possuem um útero duplo, liberando microfilárias vivas, e os machos apresentam testículos e canais deferentes, extremidade posterior espiralada, espículos desiguais em tamanho e estrutura e angulados e papilas pré e pós-cloacais (Figura 1) (Bowman, 2020; Noack, 2021).

FIGURA 1: Morfologia de *Dirofilaria immitis*. A1: Adulto macho-extremidade anterior do corpo, abertura oral (1). Papilas cefálicas (2), esôfago (3), anel nervoso (4); A2: Espículas pequenas (1), grandes espículas (2). B1: partes distais das pequenas espículas (1) e grandes espículas (2); B2: Papilas cloacais (1) e pós cloacais (2). C: Adulto fêmea- C1: Vulva, C2: Anus



Fonte da imagem: Panayotova-Pencheva, *et al.* (2016). Fonte da legenda: Barros, 2021.

A morfologia da *D immitis* está diretamente relacionada ao seu ciclo de vida parasitário. Sua estrutura alongada facilita a circulação nos vasos sanguíneos, enquanto as microfilárias, adaptadas à corrente sanguínea, permitem a transmissão eficiente pelo mosquito vetor. O dimorfismo sexual evidente e as adaptações reprodutivas garantem a persistência da espécie nos hospedeiros, reforçando sua importância na medicina veterinária e na saúde pública (Bowman, 2020).

3.3 Ciclo biológico da *Dirofilaria immitis*

O ciclo biológico da *D. immitis* é do tipo heteroxênico, envolvendo hospedeiros intermediários (culicídeos), hospedeiros definitivos vertebrados portadores de microfilárias e hospedeiros definitivos vertebrados susceptíveis e seu ciclo é longo, com duração entre seis e nove meses, a depender de fatores ambientais e fisiológicos (Kartman, 1953; Lok, 1988).

As fêmeas adultas de *D. immitis*, localizadas predominantemente nas artérias pulmonares e, secundariamente, no ventrículo direito do coração, liberam microfilárias (L1) na corrente sanguínea. Essas microfilárias podem persistir no sangue periférico por até dois anos, aguardando serem ingeridas por um mosquito vetor durante o repasto sanguíneo (Bowman *et al.*, 2021).

Durante a hematofagia, mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* ingerem sangue contendo microfilárias. Após penetrarem a parede do intestino médio, as microfilárias

migram para os túbulos de *Malpighi*, onde ocorre a continuidade do desenvolvimento larval (McCall et al., 2008).

No interior dos túbulos de *Malpighi* do mosquito vetor, as microfilárias de *D. immitis* sofrem transformações sequenciais, evoluindo para larvas de segundo (L2) e de terceiro estágio (L3), que representam a forma infectante do parasito. Esse processo de maturação larval é fortemente influenciado pela presença de bactérias endossimbióticas do gênero *Wolbachia*, que desempenham papel essencial na manutenção metabólica e no desenvolvimento dos estágios larvais, promovendo a produção de energia necessária para a ecdise, fundamental para a continuidade do ciclo reprodutivo (Taylor et al., 2017).

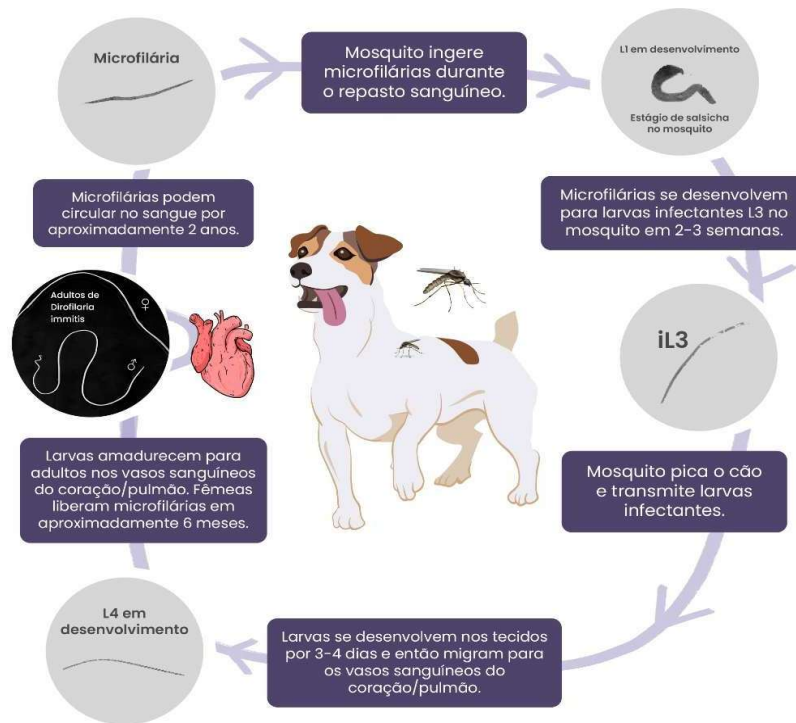
A metamorfose das larvas no vetor é um fenômeno temperatura-dependente, exigindo condições ambientais específicas para que o desenvolvimento larval ocorra com sucesso. Temperaturas abaixo de 18 °C não permitem a progressão das formas imaturas para os estágios infectantes. No entanto, quando a temperatura ambiental ultrapassa esse limiar, a transformação completa para L3 pode ocorrer em até 30 dias. Em regiões onde as temperaturas médias se mantêm acima de 27 °C, esse processo é acelerado, podendo ser concluído em um período de 10 a 14 dias (American Heartworm Society, 2020).

Uma vez atingido o estágio L3, as larvas migram ativamente em direção à cabeça e ao aparelho bucal do mosquito, onde se localizam nas proximidades do lábio superior (labro). Durante o próximo repasto sanguíneo, as larvas rompem a extremidade distal do labro e são depositadas ativamente na pele do hospedeiro definitivo, geralmente cães ou, eventualmente, seres humanos. Nesse momento, penetram o tecido subcutâneo juntamente com a hemolinfa liberada, dando início à infecção no hospedeiro vertebrado (Bowman, 2020).

Após a penetração, as larvas L3 migram através dos tecidos subcutâneos, desenvolvendo-se em larvas de quarto estágio (L4), em cerca de 3 a 12 dias. Posteriormente, elas continuam sua migração, alcançando circulação sanguínea e dirigindo-se às artérias pulmonares e ao coração, onde amadurecem, transformando-se em parasitos adultos (Bowman, 2020).

Após a maturação, os parasitos adultos se reproduzem, e as fêmeas liberam novas microfilárias na corrente sanguínea, reiniciando assim, todo o ciclo (Noack, 2021).

Figura 2: Ciclo biológico da *Dirofilaria immitis*



Fonte: Adaptado de Prichard *et al.*, 2021.

3.4 Epidemiologia da infecção canina

A dirofilariose, causada por *D. immitis*, é uma parasitose de distribuição cosmopolita, com prevalência endêmica em zonas de clima tropical, subtropical e temperado. Tais regiões favorecem a proliferação dos mosquitos vetores, que atuam como hospedeiros intermediários essenciais no ciclo do parasito. A enfermidade manifesta-se com maior frequência em localidades litorâneas de clima quente, embora sua ocorrência não seja restrita a essas áreas, com relatos de casos também em regiões interiores e afastadas da costa (Ferreira *et al.*, 1999, Fernandes *et al.*, 2000).

A manutenção da transmissão de *D. immitis* depende de múltiplos fatores epidemiológicos. Estes incluem a existência de uma população de hospedeiros definitivos (cães, principalmente) susceptíveis, a presença de reservatórios selvagens do parasito, uma densidade adequada de vetores e condições ambientais propícias para o desenvolvimento das larvas no mosquito, especialmente temperaturas entre 17 °C e 27 °C e alta umidade relativa (Suassuana *et al.*, 2003; Mattos Junior, 2008).

Estudos epidemiológicos em diversas regiões demonstram que a prevalência da dirofilariose canina é significativamente maior em cães com mais de dois anos de idade (Souza

et al., 1997; Rosa *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008; Vezzani *et al.*, 2011; Ogawa *et al.*, 2013; Labarthe *et al.*, 2014; Leão Filho *et al.*, 2024). Essa observação reflete o tempo necessário para a maturação do parasito e o acúmulo de exposições ao longo da vida do animal. A presença de microfilárias no sangue de filhotes, quando identificada, está geralmente associada à transmissão transplacentária ou, mais raramente, a transfusões sanguíneas. Contudo, é fundamental ressaltar que, nessas situações, o parasito não atinge a fase adulta, uma vez que seu ciclo biológico é obrigatoriamente dependente da passagem por hospedeiros intermediários (mosquitos vetores) para a maturação das larvas infectantes (L3) (Mantovani; Jackson, 1966; Todd; Howland, 1983).

Análises de fatores de risco para infecção por *D. immitis* revelam padrões consistentes: i) machos apresentam maior susceptibilidade, com chances de infecção até quatro vezes superiores em comparação a fêmeas; ii) cães que habitam ambientes abertos (como áreas rurais ou quintais) exibem um risco cinco vezes maior, provavelmente devido à maior exposição aos mosquitos vetores; iii) a faixa etária de 3 a 15 anos concentra a maioria dos casos, refletindo o acúmulo de exposição ao longo da vida; e iv) raças de grande porte são mais acometidas, possivelmente em função de características anatômicas ou comportamentais que favorecem a picada de vetores (Blagburn, 2013).

Apesar de os felinos domésticos serem suscetíveis à infecção por *D. immitis*, eles apresentam uma resistência natural consideravelmente superior à observada em cães. Essa resistência resulta em menor taxa de infecção, com cargas parasitárias geralmente baixas, frequentemente inferior a seis parasitos adultos. Contudo, uma vez estabelecida a infecção, mesmo um número reduzido de parasitos pode desencadear manifestações clínicas severas nos gatos. Tal gravidade decorre da intensa resposta inflamatória imunomediada, particularmente durante a migração larval e a morte dos parasitos, culminando em quadros como a Síndrome Respiratória Associada à Dirofilariose (HARD) e, potencialmente, morte súbita. Essa maior reatividade inflamatória do hospedeiro felino sugere uma sensibilidade imunológica exacerbada frente ao parasito, contrastando com a resposta imunológica geralmente mais branda observada em cães (Genchi *et al.*, 2008; Dillon *et al.*, 2017). Assim, embora os gatos apresentem menor probabilidade de infecção, os casos clínicos estabelecidos tendem a ser de maior gravidade em virtude das características particulares de sua resposta imune.

3.4.1 Distribuição geográfica no Brasil

A dirofilariose canina no Brasil possui um histórico que remonta a 1878, com os primeiros registros da enfermidade. Ao longo do século XX, especialmente entre meados e o final, os estudos epidemiológicos concentraram-se predominantemente na Região Sudeste, onde foram documentadas taxas variáveis de infecção, com maior prevalência em áreas costeiras (Labarthe *et al.*, 2002)

Nos anos 2000, levantamentos nacionais começaram a delinear as tendências evolutivas da doença. Em 2001, observou-se uma ocorrência de 2,2% no Sudeste, 2,5% no Nordeste, 2,0% no Centro-Oeste e 2,0% no Sul (Labarthe *et al.*, 2003). Regionalmente, as prevalências médias de microfilárias circulantes foram 10,6% no Nordeste, 17,2% no Sudeste, 5,8% no Centro-Oeste e 12,0% no Sul, reforçando a predominância da infecção em localidades litorâneas.

Um estudo abrangente realizado em 2014 na costa brasileira apontou um aumento expressivo na prevalência: 26,3% no Sudeste, 29,7% no Nordeste e 13,2% no Sul (Labarthe *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2017). As localidades costeiras com maior incidência incluíram Rio Grande do Sul (1,1%), Santa Catarina (12%), Paraíba (12,4%), Pará (10,7%), Alagoas (12,5%), Rio de Janeiro (21,3%) e Recife – PE (2,3%).

A infecção por *D. immitis* é, de fato, endêmica no Brasil, e a literatura recente continua a registrar sua prevalência em diversas regiões: Sul, Sudeste, Norte e Centro-Oeste (Leite *et al.*, 2007; Kannenberg *et al.*, 2019, Trancoso *et al.*, 2020; Mendes de Almeida *et al.*, 2021, Ogawa *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2019; Barbosa *et al.*, 2023, Fernandes *et al.*, 2000).

Na Região Norte, Belém do Pará já apresentava, em 1997, 10,74% de positividade para *D. immitis* (Souza *et al.*, 1997). Na Ilha do Marajó, a frequência de microfilárias em amostras atingiu 73,5% em 34 animais testados (Garcez, 2006). Mais recentemente, um estudo em Manaus demonstrou uma prevalência de 3,7% em cães domésticos (Barbosa *et al.*, 2023).

Na Região Centro-Oeste, Fernandes *et al.* (2000) encontraram 5,8% de cães com microfilárias de *D. immitis* no estado do Mato Grosso.

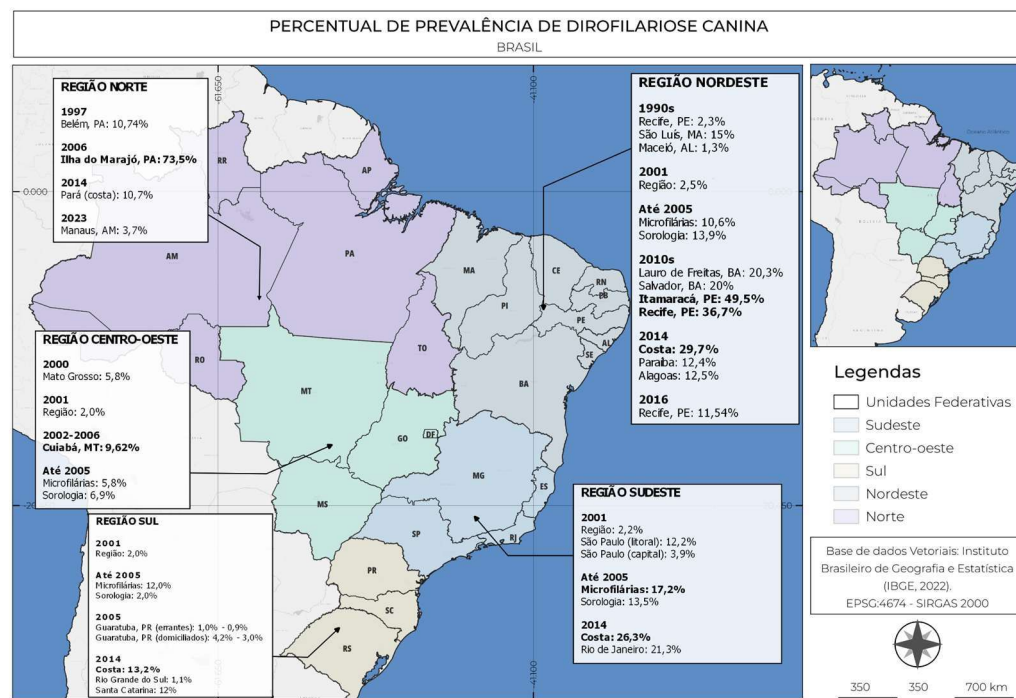
A Região Sudeste destacou-se com uma prevalência de 26,3% em 2014, percentual majoritariamente influenciado pelos dados do Rio de Janeiro (Labarthe *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2017). Em São Paulo, há variações notáveis entre o litoral (12,2%) e a capital (3,9%) (Souza *et al.*, 2001).

A Região Sul registrou 13,2% em 2014, com Santa Catarina contribuindo significativamente para esse resultado (Labarthe *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2017). Estudos anteriores em Guaratuba, Paraná, já indicavam baixas prevalências em cães

errantes (1,0% e 0,9%) e domiciliados (4,2% e 3,0%) em bairros com condições sanitárias precárias (Cirio, 2005; Leite, 2005). No entanto, dados mais recentes apontam para a persistência da doença (Kannenberg *et al.*, 2019)

Na década de 2010, a prevalência na Bahia atingiu 20,3% em Lauro de Freitas e 20% em Salvador. Em Pernambuco, Itamaracá apresentou 49,5% e Recife 36,7% (Labarthe *et al.*, 2014). Mais recentemente, em 2016, a prevalência no Recife foi de 11,54% (Ramos *et al.*, 2016).

Figura 3: Prevalência da *Dirofilaria immitis* nas cinco regiões do Brasil, desde 1997.



Fonte: arquivo pessoal

Conforme evidenciado pelas pesquisas apresentadas, a ocorrência da dirofilariose é predominantemente observada em áreas litorâneas tropicais ou subtropicais. No entanto, a doença tem sido cada vez mais relatada em áreas distantes do litoral, indicando uma expansão geográfica (Labarthe *et al.*, 1997; Calvert *et al.*, 2003; Willi *et al.*, 2012; Little *et al.*, 2014).

O surgimento de casos em áreas anteriormente consideradas livres ou de baixa prevalência pode ser atribuído a uma complexa interação de fatores, incluindo alterações climáticas, modificações ecológicas antrópicas, expansão demográfica urbana, globalização, surgimento de novas espécies de mosquitos vetores e a participação de hospedeiros silvestres na manutenção do ciclo parasitário (Genchi *et al.*, 2007; Otranto *et al.*, 2009; Morchón *et al.*, 2012)

Além dos aspectos epidemiológicos e ambientais, questões relacionadas ao manejo canino e à quimioprofilaxia também são cruciais. Fatores como o uso inconsistente ou

indiscriminado de lactonas macrocíclicas na prevenção, a absorção inadequada do princípio ativo, as diferenças biológicas entre os hospedeiros no metabolismo do medicamento e na resposta imune, bem como a suscetibilidade do parasito ao fármaco, associada à possível resistência às lactonas macrocíclicas, contribuem para a persistência e o aumento dos casos de infecção por *D. immitis* em determinadas regiões (Reifur *et al.*, 2001; Genchi *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2012; Alho *et al.*, 2014; Rinaldi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

3.4.2 Distribuição geográfica em Alagoas

Em Maceió, um estudo publicado no ano 2000 descreveu uma prevalência de 3,1% para a dirofilariose canina (Brito *et al.*, 2000). Já em 2001 o mesmo grupo descreveu uma prevalência de 1,3% de cães infectados com *D. immitis* em Maceió (Brito *et al.*, 2001). No ano de 2024, em trabalho publicado por Leão Filho e colaboradores (2024), os dados referentes à cidade de Maceió demonstraram que 18,75% dos cães analisados estavam positivos para *D. immitis*. Apesar de não ter sido possível comparar a frequência de casos encontrada no estudo, com a prevalência relatada no estudo de Brito e colaboradores, os resultados de 2024 sugerem que houve um aumento de casos na cidade de Maceió nos últimos 20 anos.

Em relação à cidade de Paripueira, um estudo publicado em 2001 demonstrou que 218 cães foram analisados e não foi encontrado nenhum cão infectado por *D. immitis* (Brito *et al.*, 2001).

Aproximadamente vinte anos após os primeiros levantamentos, o estudo de Leão Filho *et al.* (2024) revelou uma prevalência de 14,8% (27 cães) na cidade de Paripueira, localizada no litoral norte e adjacente a Maceió. A emergência de casos nessa localidade, que antes não registrava infecções, sugere uma influência de fatores ambientais e ecológicos, como as mudanças na vegetação e fauna decorrentes da expansão imobiliária e construção de condomínios residenciais entre os dois municípios. De forma mais abrangente, a mesma pesquisa indicou uma frequência de 12,7% de cães infectados distribuídos por todo o litoral alagoano, com apenas um município não apresentando casos positivos (Leão Filho *et al.*, 2024).

3.4.3 Hospedeiros intermediários e definitivos

Mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* destacam-se como hospedeiros intermediários na transmissão de *D. immitis*, agente etiológico da dirofilariose (Ludlam *et al.*, 1970). Contudo, apenas algumas espécies desses gêneros possuem efetiva capacidade vetorial,

uma vez que a competência para transmitir o parasito depende de fatores intrínsecos ao vetor, como sua habilidade em permitir o desenvolvimento completo das larvas do nematódeo (L1 a L3) e sobreviver ao processo (Labarthe *et al.*, 1998 a, b). Estudos realizados no Brasil, por exemplo, demonstram variações significativas na eficiência de transmissão entre espécies de *Aedes* e *Culex*, influenciadas por características fisiológicas e ecológicas (Ahid *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2013).

O sucesso do ciclo parasitário no mosquito está condicionado à superação de barreiras físicas e imunológicas. Durante a migração das larvas no vetor, danos teciduais podem levar à morte do inseto antes que as larvas L3 infectantes se formem (Vegni *et al.*, 1994). Além disso, a resposta imune do culicídeo, incluindo mecanismos como encapsulamento ao redor do parasito e melanização (deposição de melanina para neutralizá-lo), são obstáculos críticos à sobrevivência das larvas (Christensen *et al.*, 2005). Esses processos são regulados por vias bioquímicas complexas, como a via da fenoloxidase, que desencadeia reações de defesa específicas (Bartholomay, 2014). A interação entre a virulência do parasito e a resistência do vetor determina, assim, a eficiência da transmissão, reforçando a importância de estudos locais para identificar espécies vetoras em diferentes regiões (Serrão *et al.*, 2001).

No Brasil, após a década de 1990, estudos apontaram *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) como mais um possível vetor no Rio de Janeiro (Labarthe *et al.*, 1998b) e em São Luís, MA (Ahid *et al.*, 1999). Um estudo realizado em área litorânea de Maceió, AL, verificou a presença de exemplares de *Cx. quinquefasciatus* infectados com *D. immitis* na região de maior prevalência da infecção (Brito *et al.*, 2001).

Quanto à espécie *Cx. quinquefasciatus*, os criadouros potenciais são depósitos e recipientes temporários, assim como ralos e poços de residências, favorecendo a proliferação em áreas urbanas (Consoli e Oliveira, 1994; Costa *et al.*, 1994).

Em relação aos hospedeiros definitivos, aquele que melhor se adapta à infecção por *D. immitis*, é o cão doméstico (*Canis familiaris*) (Olsen, 1974; Labarthe *et al.*, 2002). Entretanto, canídeos silvestres podem ser acometidos, sendo capazes de desenvolver a infecção (McCall *et al.*, 2008). Eventualmente, outras espécies de mamíferos também podem se infectar (Knight, 1987; Acha & Szyfres, 1986).

Desde 1979, a infecção por *D. immitis* é reconhecida como zoonose pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Em humanos, a infecção é acidental e o ciclo biológico do parasito não se completa. Isso ocorre porque as microfilárias inoculadas por mosquitos vetores (como *Aedes* e *Culex*) geralmente não atingem a maturidade sexual, sendo eliminadas pelo sistema imunológico no tecido subcutâneo ou migrando para outros órgãos, onde formam nódulos

granulomatosos. Em casos raros, microfilárias imaturas podem alcançar o coração ou a circulação pulmonar. Quando os parasitos morrem, são transportados para o tecido pulmonar, desencadeando lesões nodulares que podem ser confundidas com neoplasias em exames de imagem (McCall *et al.*, 2008).

3.5 Sinais Clínicos da Infecção Canina – *Dirofilariose*

A dirofilariose canina manifesta-se clinicamente de forma variável, dependendo de fatores como a carga parasitária, a duração da infecção, a resposta inflamatória do hospedeiro e a localização dos parasitos adultos. Animais assintomáticos, por exemplo, geralmente hospedam uma carga parasitária baixa (≤ 5 parasitos adultos), com os parasitos localizados predominantemente nas artérias lobares e na artéria pulmonar principal. À medida que a carga parasitária aumenta, os parasitos podem se estender ao ventrículo direito (American Heartworm Society – Current Canine Guidelines, 2024). Cães com mais de 40 parasitos, ou mesmo cargas menores em indivíduos mais sensíveis, têm maior probabilidade de desenvolver a Síndrome da Veia Cava (SVC), na qual os parasitos manobram para o ventrículo direito, átrio direito e veia cava, interferindo na função valvar e no fluxo sanguíneo, produzindo hemólise, disfunção hepática e renal e insuficiência cardíaca (Atwell & Buoro, 1988; Ishihara *et al.*, 1978; Jackson, 1974, American Heartworm Society, 2024).

A Síndrome da Veia Cava (SVC), a condição clínica mais grave da dirofilariose, é caracterizada pelo deslocamento massivo de parasitos das artérias pulmonares para o átrio e ventrículo direitos, e, frequentemente, para a veia cava caudal. Essa migração provoca uma obstrução mecânica crítica da via de saída do ventrículo direito, comprometendo severamente a função da válvula tricúspide e elevando a pressão venosa. Clinicamente, a SVC manifesta-se com hemólise aguda, hemoglobinúria, disfunção hepática e renal, insuficiência cardíaca congestiva direita e, frequentemente, leva à morte súbita se não tratada prontamente (Noack, 2021; Simón *et al.*, 2012).

Em infecções severas e de evolução crônica, cães frequentemente apresentam sinais clínicos sistêmicos que refletem o comprometimento dos sistemas cardiovascular e pulmonar. Tais sinais incluem letargia, perda de peso progressiva e intolerância ao exercício. Uma tosse crônica, persistente e improdutiva, por vezes acompanhada de hemoptise, é um sinal comum e debilitante, resultante da inflamação, fibrose e danos vasculares pulmonares induzidos pelos parasitos adultos e pela resposta do hospedeiro (Jericó *et al.*, 2023; Ettinger, 2022).

Os sinais clínicos observados podem variar em intensidade, mas comumente englobam: tosse, taquipneia, dispneia, intolerância ao exercício, perda de peso, epistaxe, hemoptise, ascite, inapetência, anorexia, oligúria, hepatomegalia e esplenomegalia. Em casos avançados, além da SVC, podem ocorrer hemorragia pulmonar e até morte súbita (Jericó *et al.*, 2023; Ettinger, 2022; Simón *et al.*, 2012).

Além de todos os sinais clínicos citados, é possível a ocorrência de endoarterite proliferativa, que são exacerbadas pela morte dos parasitos – seja de forma natural ou induzida por filaricidas (como as lactonas macrocíclicas), resultando em eventos agudos como tromboembolismo pulmonar (TEP) e hipertensão arterial pulmonar (HAP), que, por sua vez, podem levar à insuficiência cardíaca congestiva (ICC) direita (Simón *et al.*, 2012). Deve-se ressaltar, ainda, que, embora raro, as larvas ou parasitos erráticos podem causar lesões em locais atípicos, como olhos, fígado, cavidade peritoneal, sistema nervoso central e subcutâneo, dada a persistência prolongada dos parasitos na circulação sistêmica (Simón *et al.*, 2012; Noack, 2021).

3.6 O Diagnóstico de *Dirofilaria immitis*

O diagnóstico baseia-se inicialmente na observação de sinais clínicos sugestivos de dirofilariose como tosse, dispnéia, intolerância a exercícios e fraqueza, associados ao histórico e a exames complementares. Na anamnese é importante obter informações sobre possíveis viagens a áreas endêmicas, assim como sobre a administração ou não de medicamentos profiláticos (dentre eles as Lactonas Macrocíclicas) para animais que residem em áreas endêmicas. A realização de exames complementares também é importante, pois podem auxiliar no diagnóstico, fornecer informações sobre o estado geral de saúde do paciente e gravidade da doença, e direcionar o clínico na escolha do tratamento adequado (Venco, 2007).

Os testes diagnósticos disponíveis para a detecção de *D. immitis* baseiam-se em técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares, que variam em sensibilidade e especificidade (Ferreira et al., 2017; Moreira et al., 2019; Trancoso et al., 2020).

3.6.1 Técnica de Knott Modificado

Os testes de análise microscópica são amplamente utilizados para a detecção de microfilárias circulantes em casos de dirofilariose canina. Entre esses métodos, destacam-se os esfregaços sanguíneos diretos, realizados a partir de veias periféricas ou capilares, e o teste de

Knott modificado, um método de concentração (Pastrav *et al.*, 2018, Newton; Wright, 1956). Ambos são valorizados por sua rapidez e baixo custo. Contudo, uma limitação inerente a esses testes reside na dificuldade de diferenciação precisa entre espécies de microfilárias (como *D. immitis* e *Dirofilaria repens*) e, em alguns estudos, na sua baixa sensibilidade para detecção noturna, embora essa última característica seja mais relevante para microfilárias com periodicidade (Kamiyngkird *et al.*, 2017)

O teste de Knott modificado é reconhecido como o método de referência para a análise morfológica e a medição das dimensões das microfilárias, características essenciais para a identificação da espécie (McCall *et al.*, 2008). A sensibilidade e a especificidade deste teste são consideráveis, atingindo, respectivamente, 85,71% e 91,66% em alguns estudos (Ranjbar-Ba *et al.*, 2007). No entanto, uma limitação crucial do teste de Knott é sua incapacidade de diagnosticar a dirofilariose cardiopulmonar em sua forma oculta. Estima-se que aproximadamente 30% dos cães afetados por *D. immitis* sejam amicrofilarêmicos, ou seja, não apresentam microfilárias circulantes, inviabilizando o diagnóstico por este método (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, 2023). Essas infecções ocultas ocorrem em casos de infecções por parasitos de um único sexo, em animais sob quimioprofilaxia que suprime as microfilárias, ou devido à resposta imune do hospedeiro que elimina as microfilárias.

Para otimizar a detecção, o teste de Knott modificado requer a coleta de uma quantidade maior de sangue (geralmente 1 mL), o que aumenta a probabilidade de encontrar microfilárias, caso presentes. O protocolo detalhado para a realização do teste de Knott modificado pode ser consultado em Soares (2022).

3.6.2 Técnica para detecção de Antígenos - ELISA

Os testes de detecção de antígenos circulantes são os métodos mais sensíveis para triagem em populações caninas assintomáticas e para avaliação de casos suspeitos, sendo recomendada a sua associação ao exame parasitológico para maior sensibilidade no diagnóstico (Diakou *et al.*, 2016). Esses métodos detectam a presença de fêmeas adultas por meio de testes imunocromatográficos de fluxo lateral e ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), sendo altamente sensíveis e específicos, o que facilita a detecção de infecções ocultas (Nelson *et al.*, 2014).

3.6.3 – Biologia Molecular

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se consolidado como uma ferramenta diagnóstica avançada e é atualmente recomendada como um teste espécie-específico para a detecção do material genético de *Dirofilaria immitis* (Ramos *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2019)

Métodos moleculares, como a PCR, oferecem alta sensibilidade, permitindo uma melhor caracterização e diferenciação entre espécies filariais. Essa capacidade é crucial, especialmente quando há necessidade de discriminar *D. immitis* de outras microfilárias morfologicamente semelhantes que infectam cães, como *D. repens* ou *Acanthocheilonema reconditum*. Além disso, a PCR consegue detectar animais com baixa parasitemia, confirmar casos que seriam falsos negativos por outros métodos e, consequentemente, fornecer uma estimativa mais precisa da real prevalência do parasito em uma população (Nuchprayoon, 2009; Kamiyngkird *et al.*, 2017). A associação de diferentes testes diagnósticos, incluindo a PCR, é reconhecida como uma estratégia epidemiológica fundamental para a detecção de animais parasitados em uma dada população e região (Paranese *et al.*, 2020). Essa abordagem integrada auxilia na realização de diagnósticos precisos e, consequentemente, contribui para a redução da transmissão de *D. immitis* para outros animais e humanos (Genchi *et al.*, 2019).

Pesquisas que avaliam a eficiência da PCR e de outros testes diagnósticos para a detecção de *D. immitis* em cães domésticos têm sido amplamente realizadas em diversas regiões do Brasil, reforçando a aplicabilidade e a necessidade desses métodos no cenário nacional (Ramos *et al.*, 2016; Kannenberg *et al.*, 2019; Moreira *et al.*, 2019; Trancoso *et al.*, 2020; Mendes-De-Almeida *et al.*, 2021).

Dessa forma, a PCR emerge como uma ferramenta sensível e precisa, capaz de discriminar microfilárias de diferentes parasitos filariais que infectam cães. Diversos métodos de PCR, utilizando diferentes *primers*, foram desenvolvidos ao longo do tempo para essa finalidade (Casiraghi *et al.*, 2006; Favia *et al.*, 1996; Mar *et al.*, 2002; Rishniw *et al.*, 2006). Seu uso é particularmente aconselhável em casos de anormalidades morfológicas de microfilárias (que não são incomuns em cães tratados incorretamente com medicamentos preventivos) ou quando infecções múltiplas com mais de uma espécie de parasito filarial dificultam a diferenciação morfológica por métodos convencionais. Além disso, a PCR é uma ferramenta indispensável para o levantamento molecular de infecções filariais em mosquitos vetores, permitindo a identificação precisa de larvas filariais nos vetores, o que é vital para estudos epidemiológicos e de controle (Cancrini *et al.*, 2006; Sang-Eun *et al.*, 2007).

3.6.4 – Exames Complementares

Para uma avaliação completa da dirofilariose e suas manifestações, diversos exames complementares são essenciais, permitindo identificar alterações condizentes com a doença, determinar sua gravidade e progressão, e avaliar o comprometimento cardiopulmonar.

A radiografia torácica é um exame crucial, utilizado para identificar alterações em artérias pulmonares e parênquima pulmonar que são sugestivas de dirofilariose (Litster *et al.*, 2005; Venco, 2007; Hock & Strickland, 2008). Sinais radiográficos podem variar conforme a espécie e a cronicidade da infecção, sendo importante ressaltar que nem sempre indicam a ocorrência de infecção ativa ou se correlacionam diretamente com a carga parasitária (Litster *et al.*, 2005; Venco, 2007; Hock & Strickland, 2008).

A ecocardiografia é um método diagnóstico complementar de grande valor, pois permite a visualização direta dos parasitos adultos de *D. immitis* nas artérias pulmonares e/ou nas câmaras cardíacas direitas, fornecendo um diagnóstico definitivo da infecção (American Heartworm Society – Current Canine Guidelines, 2024). Além de confirmar a presença do parasito, o ecocardiograma é indicado para evidenciar a dilatação ventricular direita e a disfunção cardíaca direita. Também é fundamental para estimar a carga parasitária, avaliar a presença de regurgitação tricúspide e quantificar a gravidade da hipertensão arterial pulmonar (HAP), além de possibilitar o rápido diagnóstico da Síndrome da Veia Cava (Hock & Strickland, 2008; Ware, 2010).

Já o eletrocardiograma (ECG) é utilizado para detectar arritmias e distúrbios de ritmo cardíaco, que são comuns em casos de dilatação ventricular direita e outras alterações cardíacas associadas à dirofilariose (Hock & Strickland, 2008).

O hemograma, embora não seja um exame diagnóstico definitivo por si só, pode sugerir a presença da doença quando correlacionado a outros achados. Alterações clinicopatológicas como eosinofilia, basofilia, neutrofilia e monocitose são achados hematológicos comuns na dirofilariose. A anemia regenerativa discreta tem maior probabilidade de ocorrer em cães gravemente acometidos, enquanto a trombocitopenia pode ser ocasionada pelo consumo de plaquetas no sistema arterial pulmonar, especialmente após o tratamento adulticida (Nelson & Couto, 2021).

Os exames bioquímicos de função hepática podem evidenciar elevações leves a moderadas na atividade enzimática do fígado, particularmente em pacientes que desenvolvem sinais de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) direita. Em relação à função renal, pacientes acometidos com dirofilariose frequentemente apresentam azotemia pré-renal ou secundária à

glomerulonefrite avançada. A proteinúria é encontrada em 10% a 30% dos cães afetados e é mais provável de ocorrer na doença crônica. (Nelson & Couto, 2021).

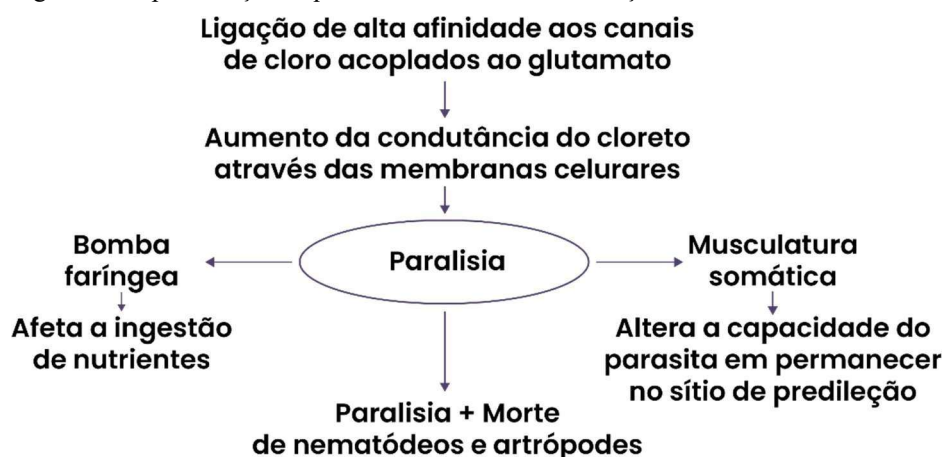
Por fim, a necropsia é um meio de diagnóstico *post-mortem* de grande importância, especialmente em casos de óbito súbito ou para fins de pesquisa e epidemiologia. Permite a identificação e contagem direta dos parasitos adultos e a avaliação macroscópica e histopatológica das lesões em órgãos como coração, pulmões e vasos, reforçando a importância da prevenção da doença e contribuindo para o entendimento da patogenia (Rocha, 2010).

3.7 Prevenção à Dirofilariose e o uso das Lactonas Macrocíclicas

Na década de 1980, as lactonas macrocíclicas (LMs) revolucionaram o controle da dirofilariose (Jackson, 1969; Otto, 1969; Fowler *et al.*, 1970). Desde então, fármacos desse grupo, como a ivermectina, milbemicina oxima e moxidectina, tornaram-se a base da quimioprevenção da dirofilariose canina devido à sua eficácia e segurança comprovadas (Hampshire, 2005; Campbell, 2012).

O mecanismo de ação das LMs baseia-se na interferência com a neurotransmissão em parasitos invertebrados. Sua principal ação ocorre sobre os canais de cloro glutamato (GluCl_s), que são encontrados em nematódeos, insetos e carrapatos. As aparasitocinas e milbemicinas se ligam irreversivelmente a esses canais, promovendo sua abertura. Esse processo resulta em uma hiperpolarização das células nervosas ou musculares do parasito e, conseqüentemente, em paralisia flácida. Nos nematódeos, os músculos da faringe, responsáveis pela ingestão de nutrientes, apresentam maior sensibilidade às LMs, e o bloqueio de seu movimento muscular impede a alimentação e sobrevivência do parasito (Webster, 2004; Spinoso, 2006; Omura, 2008; Geary; Moreno, 2012).

Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de ação das LM.



Fonte: Adaptado de Riviere, Papich, 2021.

Além de sua ação direta sobre os canais iônicos, a administração contínua desses fármacos inibe o desenvolvimento dos estágios pré-larvares no útero das fêmeas adultas de *D. immitis* (Lok *et al.*, 1988). Foi também observado que as LMs inibem a secreção de proteínas imunomoduladoras no sistema excretor das microfilárias, o que, torna o parasito mais suscetível à resposta do sistema imune do hospedeiro (Geary; Moreno, 2012).

3.7.1 Ivermectina

A ivermectina, uma mistura de 22,23-dihidroaparazitocina B1a/B1b, é derivada de *Streptomyces avermitilis* e atua ligando-se aos canais de cloreto controlados pelo glutamato. No Brasil, a primeira apresentação de ivermectina específica para uso em cães foi introduzida em 1992 (Labarthe *et al.*, 1996; Labarthe, 2002).

Sua administração mensal demonstra eficácia superior a 99% na eliminação dos estágios larvais (L3 e L4) de *D. immitis*, sendo, por isso, amplamente empregada na prevenção da dirofilariose canina (Mccall *et al.*, 2008; Bowman *et al.*, 2009; American Heartworm Society, 2024). Embora não possua ação direta sobre os parasitos adultos em doses profiláticas, a ivermectina reduz significativamente a produção de microfilárias, contribuindo para a diminuição da transmissibilidade da infecção (Mccall *et al.*, 2008; Bowman *et al.*, 2009).

Em geral, esses agentes são seguros quando administrados nas doses recomendadas. No entanto, a ivermectina é contraindicada para cães que apresentam mutações no gene *ABCB1* (anteriormente conhecido como *MDR1*), uma condição comumente observada em raças como Collie, Pastor de Shetland e Old English Sheepdog (Geyer; Janko, 2012). A presença dessa mutação compromete a funcionalidade da glicoproteína-P (P-gp), uma proteína transportadora presente na barreira hematoencefálica, aumentando a permeabilidade de determinadas substâncias neurotóxicas ao sistema nervoso central. Em casos de exposição a doses excessivas, pode ocorrer neurotoxicidade, manifestando-se por sinais clínicos como ataxia, tremores, midríase, depressão do sistema nervoso central e, em casos graves, convulsões. O mecanismo primário da toxicidade envolve a inibição dos canais de cloro mediados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), essencial para a neurotransmissão inibitória nos mamíferos (Papich, 2016).

Após a ivermectina, outras LMs foram aprovadas para quimioprofilaxia preventiva, em ordem cronológica de aprovação: milbemicina oxima, selamectina e moxidectina (Bowman; Mannella, 2011).

3.7.2 Milbemicina Oxima

A milbemicina oxima também integra o grupo das LMs, sendo um derivado semissintético das milbemicinas naturais, produzidas pela fermentação da espécie bacteriana *Streptomyces hygroscopicus* subesp. *aureolacrimosus* (Shoop *et al.*, 1995). Esse composto foi desenvolvido com o objetivo de expandir as opções de controle parasitário em medicina veterinária, apresentando estrutura similar a outras LMs, como a ivermectina.

De forma análoga à ivermectina, a milbemicina oxima atua como agonista dos canais de cloro mediados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) e pelo glutamato em nematódeos e artrópodes. Sua ação consiste em aumentar a permeabilidade da membrana celular ao íon cloreto, resultando em hiperpolarização neuronal e paralisia flácida do parasito, culminando em sua morte (Shoop *et al.*, 1995; Prichard *et al.*, 2012)

Em comparação com outras lactonas macrocíclicas, a milbemicina oxima apresenta um perfil de segurança semelhante, sendo bem tolerada em doses terapêuticas recomendadas (McCall *et al.*, 2008; Bowman *et al.*, 2009; A. H. S., 2024). Frequente em formulações combinadas com outros fármacos antiparasitários, como o praziquantel, visa ampliar o espectro de ação contra cestódeos, além dos nematódeos.

Devido à sua eficácia em baixas doses, elevada atividade lipofílica, estabilidade e segurança, as avermectinas e milbemicinas encontram-se comercialmente disponíveis em diversas apresentações, incluindo formulações para uso oral, tópico ou injetável (Novotny *et al.*, 2000; McCall *et al.*, 2005; Snyder *et al.*, 2011; Bowman *et al.*, 2011; Prichard *et al.*, 2012).

3.7.3 Moxidectina

A moxidectina é uma LM semissintética derivada das milbemicinas, produzida pela fermentação de *Streptomyces cyanogriseus* subesp. *noncyanogenus* (Shoop *et al.*, 1995). Desenvolvida como uma alternativa de amplo espectro para o controle de parasitos internos e externos, a moxidectina destaca-se por sua alta lipofilicidade e longa meia-vida em comparação com outras LMs, como ivermectina e milbemicina oxima.

Seu mecanismo de ação é similar ao das demais lactonas macrocíclicas, atuando como agonista dos canais de cloro (Shoop *et al.*, 1995). No entanto, sua elevada lipofilicidade permite um efeito prolongado devido ao acúmulo em tecidos gordurosos e à liberação gradual na corrente sanguínea, o que aumenta sua eficácia com administrações menos frequentes (American Heartworm Society, 2024). Isso inclui versões injetáveis de liberação prolongada,

capazes de proporcionar proteção por até seis meses, uma vantagem significativa em relação a outros antiparasitários do mesmo grupo (McCall *et al.*, 2008; Bowman *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a moxidectina apresenta menor risco de neurotoxicidade em cães com mutação no gene *ABCB1* (*MDR1*), tornando-se uma opção mais segura para raças sensíveis (Geyer *et al.*, 2012). Um estudo que comparou a farmacocinética entre ivermectina e moxidectina demonstrou que a meia-vida de eliminação da moxidectina (25,9 dias) foi oito vezes maior que a da ivermectina (3,3 dias) (Al-Azzam *et al.*, 2007). A moxidectina é caracterizada por um substituto olefínico na cadeia lateral na posição 25 e uma metoxima na posição 23, estruturas específicas não observadas nas outras LMs (Prichard *et al.*, 2012).

3.7.4 Selamectina

A selamectina é um composto semissintético pertencente à classe das LMs, amplamente utilizada na medicina veterinária como agente antiparasitário. Seu mecanismo de ação baseia-se na interferência com a neurotransmissão em parasitos invertebrados, atuando como um agonista dos receptores de canais de íons cloreto glutamato e GABA. Essa interação leva à hiperpolarização das células nervosas e musculares dos parasitos, resultando em sua paralisia e morte. Além de sua eficácia contra ectoparasitos como pulgas e ácaros, a selamectina apresenta atividade contra nematódeos gastrointestinais e, crucialmente, contra os estágios larvais de *D. immitis* (McTier, 2000).

No contexto da profilaxia da dirofilariose, a selamectina é um dos fármacos recomendados pelas principais diretrizes internacionais, como as da American Heartworm Society. Administrada mensalmente por via tópica (*spot-on*), a selamectina atua prevenindo o estabelecimento da infecção por *D. immitis* ao eliminar as larvas de estágio L3 e L4, que são transmitidas pelos mosquitos vetores antes que possam migrar e se desenvolver para a fase adulta no hospedeiro definitivo (American Heartworm Society, 2024). A persistência sistêmica da selamectina no plasma após a aplicação tópica permite manter concentrações eficazes durante o intervalo de 30 dias entre as doses (American Heartworm Society, 2024).

A eficácia da selamectina na prevenção da dirofilariose tem sido consistentemente demonstrada em estudos de campo e laboratoriais, mesmo em cães expostos a altas cargas infecciosas. A recomendação atual da AHS enfatiza a administração contínua e durante todo o ano de quimioprofiláticos, incluindo a selamectina, para otimizar a eficácia e reforçar a aderência do proprietário ao protocolo preventivo (American Heartworm Society, 2024). Essa estratégia é vital para o controle da doença, considerando a crescente preocupação com a

reemergência da dirofilariose e a possível resistência de cepas de *D. immitis* às lactonas macrocíclicas em algumas regiões.

3.7.5 Outras Lactonas Macrocíclicas: Abamectina, Doramectina e Nemadectina

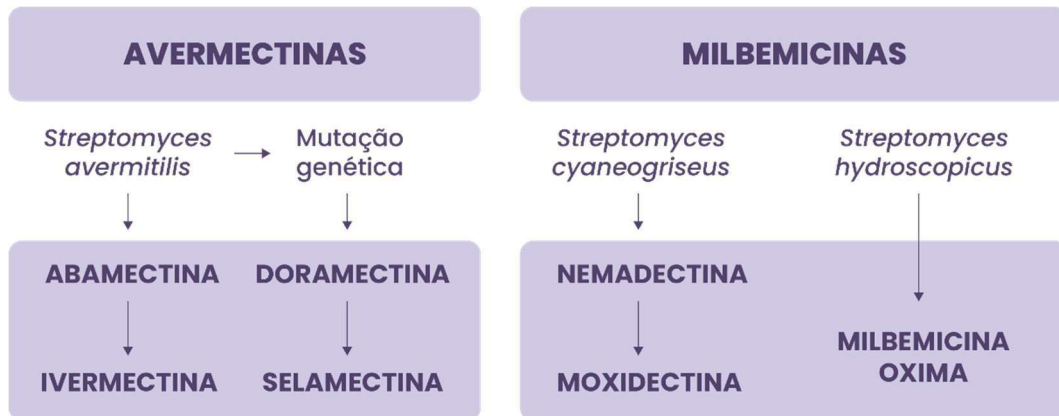
Além das LMs mais comumente empregadas na profilaxia da dirofilariose canina, como ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina e selamectina, já descritas, existem outras LMs que, embora compartilhem o mesmo mecanismo de ação geral, apresentam diferentes perfis de uso e espectro de atividade na medicina veterinária. É importante distinguir entre LMs amplamente aprovadas para a prevenção da dirofilariose e aquelas cujo uso se restringe a outras parasitoses ou espécies animais.

A doramectina é uma LM da classe das avermectinas, utilizada no controle de parasitos internos e externos em diversas espécies de animais de produção, como bovinos, suínos e ovinos. Embora possua um longo período de ação e seja eficaz contra uma variedade de nematódeos e artrópodes, a doramectina não é rotineiramente recomendada ou aprovada para a profilaxia da dirofilariose em cães e gatos, especialmente devido à falta de estudos extensivos que comprovem sua segurança e eficácia em doses preventivas para *D. immitis* nessas espécies, bem como seu perfil de toxicidade em raças sensíveis (Drugbank, 2016; Researchgate, 2015). Seu uso em pequenos animais é, em geral, *off-label* e restrito a indicações específicas, sempre com cautela.

A abamectina é outra avermectina amplamente utilizada na pecuária para o controle de verminoses gastrintestinais e pulmonares, além de ectoparasitoses como bernês, piolhos e sarnas em bovinos. Embora pertença à mesma classe de compostos com atividade contra nematódeos, sua formulação e indicações são específicas para grandes animais.

Quanto à nemadectina, as informações sobre seu uso específico como fármaco na medicina veterinária, especialmente em relação à dirofilariose em pequenos animais, são limitadas na literatura recente. Embora o termo possa remeter a uma lactona macrocíclica devido ao nome, sua aplicabilidade prática e aprovação para a quimioprofilaxia de *D. immitis* em cães e gatos não são amplamente reconhecidas nas diretrizes e publicações de referência atuais (American Health Society, 2024).

Figura 5 - Origem das lactonas macrocíclicas: da bactéria do solo aos produtos terapêuticos.



Fonte: Adaptado de Prichard, R. K. *et al*, 2012.

3.8 A Resistência às Lactonas Macrocíclicas

Há alguns anos, o surgimento de cepas de *Dirofilaria immitis* com resistência às LMs tem sido uma preocupação crescente e um desafio significativo para o controle da dirofilariose globalmente (Geary *et al.*, 2011; Pulaski *et al.*, 2014). Essa resistência, confirmada em diversas regiões, especialmente no sudeste dos Estados Unidos, compromete a eficácia das estratégias de profilaxia (McCall *et al.*, 2021; Bowman; Atkins, 2023; Bourguinat *et al.*, 2024).

A resistência às LMs em *D. immitis* é um fenômeno complexo, influenciado por fatores genéticos, ambientais e operacionais, como o uso inadequado dos fármacos (Bourguinat *et al.*, 2015; Diakou; Prichard, 2021). Estudos têm demonstrado que mutações genéticas em genes associados à ação desses fármacos, como os que codificam canais de cloreto dependentes de glutamato, podem estar envolvidas no mecanismo de resistência (Bourguinat *et al.*, 2011; Guthrie *et al.*, 2023). Adicionalmente, a falta de testes diagnósticos rápidos e precisos para detectar a resistência em campo dificulta a implementação de estratégias de manejo eficazes (Prichard *et al.*, 2011; Ballesteros *et al.*, 2018).

A resistência às lactonas macrocíclicas em *D. immitis* tem sido consistentemente associada a alterações genéticas em marcadores moleculares específicos. Dentre eles, destacam-se a glicoproteína-P (P-gp) (P-gp), um transportador de efluxo, e a β -tubulina, uma proteína estrutural, que desempenham papéis cruciais na modulação da sensibilidade do parasito aos fármacos (Lespine *et al.*, 2012; Prichard *et al.*, 2012; Diakou; Prichard, 2023).

3.8.1 Glicoproteína-P (P-gp)

A glicoproteína-P (P-gp) (P-gp) é uma proteína transportadora de efluxo pertencente à superfamília ABC (*ATP-binding cassette*). Localizada na membrana celular, a P-gp atua como uma "bomba", removendo ativamente diversas substâncias, incluindo fármacos, do interior das células. Em parasitos, a superexpressão ou mutações no gene da glicoproteína-P (P-gp) podem levar à resistência a medicamentos, pois o fármaco é rapidamente expulso da célula antes de exercer seu efeito terapêutico (Lespine *et al.*, 2012; Ardelli, 2014).

Estudos em *D. immitis* têm fornecido evidências do papel da P-gp na resistência às LMs. Por exemplo, isolados de *D. immitis* resistentes apresentaram maior expressão de glicoproteína-P (P-gp) em comparação com isolados sensíveis (Bourguinat *et al.*, 2011c). Além disso, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que mutações específicas no gene *P-gp-11* e *P-gp-618*, estavam correlacionadas com a resistência à ivermectina e à moxidectina (Bourguinat *et al.*, 2011c, Bourguinat *et al.*, 2015). A identificação desses polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene da P-gp é um importante avanço na compreensão da resistência genética em *D. immitis* (Guthrie *et al.*, 2023).

3.8.2 β -tubulina (β -Tub)

A β -tubulina (β -Tub) é uma proteína estrutural que compõe os microtúbulos, elementos essenciais do citoesqueleto celular e cruciais para a divisão e motilidade celular dos nematódeos. Embora a β -tubulina (β -Tub) seja o principal alvo de fármacos anti-helmínticos como os benzimidazóis, mutações nessa proteína também têm sido associadas à resistência à LM em alguns nematódeos, embora o mecanismo exato em *D. immitis* ainda não seja completamente elucidado (Prichard *et al.*, 2012; Diakou; Prichard, 2021).

Estudos em *D. immitis* ainda são limitados em relação ao papel direto da β -tubulina (β -Tub) na resistência às LMs. Contudo, pesquisas em outros nematódeos filariais, como *Onchocerca volvulus* e *Haemonchus contortus*, sugerem que mutações na β -tubulina (β -Tub) podem contribuir para a resistência a múltiplas classes de anti-helmínticos, incluindo LMs (Prichard *et al.*, 2012; Diakou; Prichard, 2023). Um estudo de Bourguinat *et al.* (2015) sugeriu que a β -tubulina, nas posições 561 e 2755, pode estar envolvida em mecanismos de resistência indiretos em *D. immitis*, possivelmente por meio da regulação da expressão de glicoproteína-P (P-gp) (Bourguinat *et al.*, 2011c).

3.8.3 Interação entre Glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub)

A resistência às lactonas macrocíclicas em *D. immitis* parece ser um fenômeno multifatorial, envolvendo a interação complexa entre diferentes marcadores genéticos. A Glicoproteína-P (P-gp) e a β -tubulina (β -Tub) podem atuar em vias complementares, potencializando o mecanismo de resistência:

A β -tubulina (β -Tub) pode modular a expressão da glicoproteína-P (P-gp) através de vias de sinalização celular, aumentando a capacidade de efluxo de fármacos e, assim, a resistência do parasito (Lespine *et al.*, 2012; Prichard *et al.*, 2012).

Mutações em ambos os marcadores podem amplificar o efeito de resistência, tornando o parasito menos suscetível a múltiplas classes de anti-helmínticos (Prichard *et al.*, 2012; Diakou; Prichard, 2021).

A identificação de marcadores de resistência, como a glicoproteína-P (P-gp) e a β -tubulina (β -Tub), possui implicações importantes para o controle da dirofilariose canina: a) Desenvolvimento de testes diagnósticos para detecção de mutações nesses genes, e, assim, orientar estratégias de tratamento mais eficazes e personalizadas (Bourguinat *et al.*, 2015); b) O entendimento aprofundado dos mecanismos de resistência para direcionar o desenvolvimento de fármacos que inibam a glicoproteína-P (P-gp) ou que tenham como alvo vias alternativas no parasito, superando a resistência existente (Geary *et al.*, 2011; Lespine *et al.*, 2012) e c) O uso racional de lactonas macrocíclicas, a adesão rigorosa aos protocolos de profilaxia e a rotação de classes de anti-helmínticos (quando aplicável) como estratégias essenciais para retardar o surgimento e a disseminação da resistência (Prichard *et al.*, 2012; American Heartworm Society, 2024).

3.10 Considerações Finais

Em suma, a dirofilariose canina é uma enfermidade de complexa epidemiologia e patogênese, com manifestações clínicas variadas e um diagnóstico que exige a integração de diferentes métodos. Embora a profilaxia com lactonas macrocíclicas seja a base do controle, a emergência de falhas terapêuticas e a suspeita de resistência reforçam a necessidade de um monitoramento contínuo e da caracterização de populações parasitárias regionais. Nesse sentido, a ausência de dados atualizados sobre a prevalência e sobre os aspectos moleculares da *D. immitis* no Brasil, particularmente no Nordeste, justifica a relevância de investigações locais.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N. & SZYFRES, B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. 2ª Ed. Publicación Científica. Washington: **Organización Panamericana de la Salud**, n 503, 1986. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000300038>

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of heartworm *Dirofilaria immitis* infection in dogs, 2020. <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines>.

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY CANINE Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs Revised, 2024. <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines>.

ANDERSON, R. C. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2. ed. **Wallingford: CABI Publishing**, 2000.

AHID, S. M. *et al.* Canine heartworm on São Luis Island, Northeastern Brazil: a potential zoonosis. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 2, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1999000200025>

ALHO, A. M. *et al.* Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 1-2, 2014. DOI: [10.1016/j.vetpar.2014.08.014](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.014)

ALVES, L. C. *et al.* Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000500004>

ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. 1. ed. Rio de Janeiro: L.F. **Livros de Veterinária Ltda.**, 2002.

ATWELL R. B. *et al.* Caval syndrome. In Boreman PFL, Atwell RB (eds): *Dirofilariosis*. Boca Raton, FL: **CRC Press**, 1988.

ARAUJO, R.T.; *et al.* Canine dirofilariosis in the region of Conceição Lagoon, Florianópolis, and in the Military Police kennel, Sao Jose, State of Santa Catarina, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, 2003. DOI: [10.1016/s0304-4017\(03\)00077-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00077-3)

ATKINS, C. Prevalence of naturally occurring *Dirofilaria immitis* infection among nondomestic cats housed in an area in which heartworms are endemic. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 227, n. 1, 2005. DOI: [10.2460/javma.2005.227.139](https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.139)

ATKINS, C. Canine and Feline Heartworm Disease. In: ETTINGER, S. J. F. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 8. ed. Elsevier, 2017.

BARBOSA, U. C. *et al.* *Dirofilaria immitis* is endemic in rural areas of the Brazilian Amazonas state capital, Manaus. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.L.], v. 32, n. 2, 2023. DOI: [10.1590/S1984-29612023018](https://doi.org/10.1590/S1984-29612023018)

BARBOSA, C. L. *et al.* Dirofilariose canina: situação atual no Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.1, 2006.

BARROS, A. P. M. C. *Dirofilaria sp* em amostra de citologia cutânea - relato de caso. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – **Universidade Federal Rural da Amazônia**, Belém, 2021.

BARTHOLOMAY, L.C. Infection barriers and responses on mosquito-filarial worm interactions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 2, 2014. DOI: [10.1016/j.cois.2014.08.006](https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.08.006)

BLAGBURN, B. Heartworms and Heartworm Disease: They Will Find a Way to Fool You! In: **Atlantic Coast Veterinary Conference 2013**, Auburn. College of Veterinary Medicine: Auburn University, 2013.

BOURGUINAT, C. *et al.* P-glycoprotein-like protein, a possible genetic marker for iparastotin resistance selection in *Onchocerca volvulus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 158, n. 2, 2008. DOI: [10.1016/j.molbiopara.2007.11.017](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.017)

BOURGUINAT, C., *et al.* Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, 2011a. DOI: [10.1016/j.ijpara.2021.08.006](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.006)

BOURGUINAT, C. *et al.* Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 4, 2011b. DOI: [10.1016/j.vetpar.2011.01.024](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.024)

BOURGUINAT, C. *et al.* Genetic polymorphism in *Dirofilaria immitis*. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 4, 2011c. DOI: [10.1016/j.vetpar.2011.01.023](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.023)

BOURGUINAT, C. *et al.* Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 3-4, 2015. DOI: [10.1016/j.vetpar.2015.04.002](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.002)

BOWMAN, D. D. *et al.* Survey of 11 western states for heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection, heartworm diagnostic and prevention protocols, and fecal examination protocols for gastrointestinal parasites. **Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine**, v. 8, n. 4, 2007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18183548/>

BOWMAN, D. D. *et al.* Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.093>

BOWMAN, D. D.; ATKINS, C. E. Heartworm biology, treatment, and control. **The Veterinary Clinics of North American. Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, 2009. DOI: [10.1016/j.cvsm.2009.06.003](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.003)

BOWMAN, D. D. *et al.* **Georgis - Parasitologia veterinária**. Tradução de Adriana Pittella Sudré - Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

- BOWMAN, D. D. *et al.* Macrocyclic lactones and *Dirofilaria immitis* microfilariae. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 4, 2011. DOI: [10.1053/j.tcam.2011.07.001](https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.07.001)
- BOWMAN, D. D. Heartworms, macrocyclic lactones, and the specter of resistance to prevention in the United States. **Parasites and Vectors**, v. 5, n., 2012. DOI: [10.1053/j.tcam.2011.07.001](https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.07.001)
- BOWMAN, D. D. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 11th ed. Elsevier, 2020.
- BRITO, A. C. *et al.* Prevalence of canine filariasis by *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in Maceio, Alagoas State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, 2001. DOI: [10.1590/s0102-311x2001000600021](https://doi.org/10.1590/s0102-311x2001000600021)
- BRITO, A. C. *et al.* *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Maceió, Alagoas, Northeast region of Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n.3, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352000000300005>
- BROWN, H. E. *et al.* Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in the United States. **Parasites and Vectors**, v. 5, 2012. DOI: [10.1186/1756-3305-5-245](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-245)
- CALVERT, C. A. *et al.* *Dirofilariose*. In: **Birchard, S. J.; Scherding, R. G. Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. São Paulo: Editora Roca, 2003.
- CANCERINI G. *et al.* Natural vectors of dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscany region, central Italy. **J. Med. Entomol.** 43, 2006. DOI: [10.1603/0022-2585\(2006\)43\[574:nvdir\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[574:nvdir]2.0.co;2)
- CANCERINI G. *et al.* Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships. **Mappe Parassitologiche**, v. 8, 2007. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20083097530>
- CARVALHO G. A. *et al.* Evaluation of Larval Development of *Dirofilaria immitis* in Different Populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 3, 2013. DOI: [10.4236/ojvm.2013.36045](https://doi.org/10.4236/ojvm.2013.36045)
- CASIRAGHI, M. *et al.* A simple molecular method for discrimination common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). **Vet. Parasitol.**, v.141, 2006. DOI: [10.1016/j.vetpar.2006.06.006](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.006)
- CHRISTENSEN, B. M. *et al.* Melanization immune responses in mosquito vectors. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 4, 2005. DOI: [10.1016/j.pt.2005.02.007](https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.02.007)
- CONSOLI, R. A.G. B., e OLIVEIRA, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. [online]. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, 1994.
- DANTAS-TORRES F. *et al.* Overview on *D. immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 282, 2020. DOI: [10.1016/j.vetpar.2020.109113](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109113)

- DANTAS-TORRES F. *et al.* Tratamento adulticida contra dirofilariose: uma perspectiva tropical. **Parasites & Vectors**, v.16, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05690-8>
- DIAKOU A. *et al.* *Dirofilaria* infections in dogs in diferente areas of Greece. **Parasit. Vect.**, v. 9, n. 1, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1797-6>
- DILLON, A. R, *et al.* Heartworm-associated respiratory disease (HARD) induced by immature adult *Dirofilaria immitis* in cats. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 2, 2017. DOI: [10.1186/s13071-017-2452-6](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2452-6)
- ESCCAP FRANCE, 2023. La dirofilariose cardiopulmonaire ou « maladie du ver du cœur ». ESCCAP France, 2023. <https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/dirofilariose-filaires-ver-coeur.html>
- ETTINGER, S. J., *et al.* **Tratado de Medicina Veterinária: Doenças do Cão e do Gato.** Grupo GEN – Guanabara Koogan. Rio de Janeiro - RJ, 2022. E-book. ISBN 9788527738880.
- FAVIA, G. *et al.* Polymerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*, v. 113, 1996. DOI: [10.1017/s0031182000067615](https://doi.org/10.1017/s0031182000067615)
- FERNANDES, C. G. N., *et al.* Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, Estado de Mato Grosso - Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 5, 1999. <https://doi.org/10.1590/S1413-95961999000500007>
- FERNANDES, C. G. N. *et al.* 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. Sci.**, v. 37, n. 6, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962000000600009>
- FERREIRA, A. F. *et al.* Ocorrência da dirofilariose canina na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **Vet Notícias**, v. 5, n. 1, 1999.
- FERREIRA, C. *et al.* Molecular characterization of *Dirofilaria* spp. circulating in Portugal. **Parasites Vectors** v.10. n. 1-8, 2017. DOI: [10.1186/s13071-017-2180-y](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2180-y)
- GEARY, T. G. *et al.* Evidence for macrocyclic lactone anthelmintic resistance in *Dirofilaria immitis*. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 4, 2011. DOI: [10.1053/j.tcam.2011.09.004](https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.09.004)
- GENCHI, C. *et al.* Efficacy of moxidectin for the prevention of adult heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Parassitologia**, v. 43, n. 3, 2001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11921542/>
- GENCHI, C. *et al.* Is heartworm disease really spreading in Europe? **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 2-3, 2005. DOI: [10.1016/j.vetpar.2005.04.009](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.009)
- GENCHI, C. *et al.* Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infections in dogs and cats. In: **CRINGOLI, G. (Ed.). Mappa Parassitologica**, 2007. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20083097550>

GENCHI, C. *et al.* Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. In: **CRINGOLI, G. (Ed.). Mape Parassitologiche**, 2007. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20083097549>

GENCHI, C. *et al.* Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: a statistical elaboration of the duration of the infection and life expectancy in asymptomatic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 3, 2008. DOI: [10.1016/j.vetpar.2008.09.005](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.005)

GENCHI, C. *et al.* Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, 2009. DOI: [10.1016/j.vetpar.2009.03.026](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.026)

GENCHI, C. *et al.* Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of *Dirofilaria* in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 4, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.012>

GENCHI, C. *et al.* Canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in Western Europe: survey of veterinary awareness and perceptions. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 206. 2014. DOI: [10.1186/1756-3305-7-206](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-206)

GENCHI, M *et al.* *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: A questionnaire study in Italy. *Vet Parasitol*, v. 267, 2019. DOI: [10.1016/j.vetpar.2019.01.014](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.01.014)

HAGIWARA, M. K. Y. *et al.* Prevalência de microfilárias em diferentes populações caninas. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 21, n. 1, 1984. <https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v21i1p37-41>

ISHIHARA K. *et al.* Clinicopathological studies on canine dirofilarial hemoglobinuria. **Jap J Vet Sci.**, v. 40, 1978. DOI: [10.1292/jvms1939.40.525](https://doi.org/10.1292/jvms1939.40.525)

JACKSON R. F. *et al.* The venae cavae syndrome. **Proceedings of the Heartworm Symposium 1974**, Auburn, AL. American Heartworm Society, 1974. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/19760829870>

JACKSON R. F. *et al.* Distribution of heartworms in the right side of the heart and adjacent vessels of the dog. **J Am Vet Med Assoc.**, 1966. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6008241/>

JERICÓ, M. M., *et al.* **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. Grupo GEN – Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ, 2015. <https://repositorio.usp.br/item/002649418>

KAMYINGKIRD K., *et al.* Prevalence and risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs e cats in Songkhla and Satun provinces, Thailand. **Agricult. Nat**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.05.003>

KANNENBERG, A. K. *et al.* Occurrence of filarid parasites in household and sheltered dogs in the city of Joinville – Santa Catarina, Brazil. **Ciencia Anim. Bras.**, v. 20, 2019. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-53529>

KARTMAN, L. On the growth of *Dirofilaria immitis* in the mosquito. **Am J Trop Med Hyg**. v.2, n.6, 1953. DOI: [10.4269/ajtmh.1953.2.1062](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1953.2.1062)

KHANMOHAMMADI M. *et al.* Morphological Description, Phylogenetic and Molecular Analysis of *Dirofilaria immitis* Isolated from Dogs in the Northwest of Iran. **Iran J Parasitol.** v. 15, n. 1, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32489376/>

KNOTT, J. W. A method for making microfilarial surveys on day blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 2, 1939. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(39\)90101-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(39)90101-X)

LABARTHE, N. V. *et al.* Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in the State of Rio de Janeiro, Brazil. In: **XVII World Small Animal Veterinary Association**, 1992.

LABARTHE, N. V. *et al.* Survey of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in random source cats in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil, with descriptions of lesions. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 4, 1997. [10.1016/s0304-4017\(97\)00041-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00041-1)

LABARTHE, N. V. *et al.* Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niteroi, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, 1998a. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000200002>

LABARTHE, N. V. *et al.* Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niteroi municipality, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, 1998b. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000400001>

LABARTHE, N. V. *et al.* Dirofilariose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: **Almosny NRP. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinaria Ltda, 2002.

LABARTHE, N. V. *et al.* Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Vet. Ther**, v. 4, 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12756637/>

LABARTHE, N. V. *et al.* Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. **Parasite & Vectors**, v. 7, n. 493, 2014. DOI: [10.1186/s13071-014-0493-7](https://doi.org/10.1186/s13071-014-0493-7)

LARSSON, M.H. Prevalência de microfilárias de *Dirofilaria immitis* em cães do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 27, n.2, 1990. DOI: [10.11606/issn.0000-0000.272183-186](https://doi.org/10.11606/issn.0000-0000.272183-186)

LEÃO FILHO, W. F. B. *et al.* *Dirofilaria immitis* in dogs from the coastal tourist region of the state of Alagoas, Brazil. **Braz J Vet Parasitol**, v. 33, n. 3, 2024. DOI: [10.1590/S1984-29612024055](https://doi.org/10.1590/S1984-29612024055)

LEIDY, J. A New Species of Nematode Worm from the Heart of the Dog. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 8, 1856.

LITTLE, S. E. *et al.* Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma spp.*, and *Ehrlichia spp.* in the United States, 2010-2012. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 257. 2014. DOI: [10.1186/s13071-020-04514-3](https://doi.org/10.1186/s13071-020-04514-3)

- LITTLE, S. E. *et al.* Pre-treatment with heat facilitates detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1- 2, 2014. DOI: [10.1016/j.vetpar.2014.01.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.007)
- LOK, J. B. *et al.* Abnormal patterns of embryogenesis in *Dirofilaria immitis* treated with iparazitocin. **Journal of Helminthology**, v. 62, n. 3, 1988. DOI: [10.1017/s0022149x00011482](https://doi.org/10.1017/s0022149x00011482)
- LUDLAM, K. W., *et al.* Potential vectors of *Dirofilaria immitis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 157, 1970. <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/157/10/javma.1970.157.10.1354.xml>
- MAIA, A. L. P.; *et al.* Ocorrência de *Dirofilaria immitis* em cães da Ilha do Marajó e Nordeste Paraense, detectada por métodos parasitológico e sorológico. **Revista da Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, v. 27, 2007.
- MANTOVANI, A.; JACKSON, R. F. Transplacental transmission of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. **The Journal of Parasitology**, v. 52, n. 1, 1966.
- MAR, P. H. *et al.* Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). **Vet. Parasitol.**, v. 106, 2002. DOI: [10.1016/s0304-4017\(02\)00032-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00032-8)
- MCCALL. *et al.* Heartworm disease in animals and humans. **Adv Parasitol.** v. 66, 2008. DOI: [10.1016/S0065-308X\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00204-2)
- McTIER, T. L., *et al.* Evaluation of the effects of selamectin against adult and immature stages of fleas (*Ctenocephalides felis felis*) on dogs and cats. **Vet Parasitol.**, v. 23, n. 91, 2000. DOI: [10.1016/s0304-4017\(00\)00292-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00292-2)
- MENDES-DE-ALMEIDA F. *et al.* Infection with *Dirofilaria immitis* and other infections in cats and dogs from Rio de Janeiro, Brazil: the need for prophylactic enforcement. **Act. Parasitol.**, v. 66, n. 3, 2021. DOI: [10.1007/s11686-021-00345-z](https://doi.org/10.1007/s11686-021-00345-z)
- MORCHON, R. *et al.* Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and their Vectors in Europe - New Distribution Trends. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 196. 2012. DOI: [10.3389/fphys.2012.00196](https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00196)
- MOREIRA, H. R. *et al.* *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Algodão Island, Brazilian Amazon. **Pesqui. Vet. Bras.** v. 39, n. 7, 2019. <https://doi.org/10.1590/1678-6160-PVB-5916>
- NELSON, R. W., COUTO, G. C., *et al.* **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Editora Mundial, 5ª edição - Elsevier, 2015.
- NELSON, R. W. COUTO, C. G., *et al.* **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 5th ed. Grupo GEN – Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 2021. E-book.
- NELSON, R. W. COUTO, C. G., *et al.* **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 6th ed. Grupo GEN – Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 2023.

- NOACK, S., *et al.* Heartworm disease – Overview, intervention, and industry perspective. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 16, 2021. DOI: [10.1016/j.ijpddr.2021.03.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.03.004)
- NUCHPRAYOON, S. DNA-based diagnosis of lymphatic filariasis. **South. Asi. J. Trop. Med. Publ. Heal.**, v.40, n. 5, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19842372/>
- OGAWA, G.M. *et al.* Canine heartworm disease in Porto Velho: first record, distribution map and occurrence of positive mosquitoes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400017>
- OLIVEIRA, G. G. D. *et a.* Resistência parasitária a anti-helmínticos e saúde única: desafios e oportunidades na integração de abordagens de saúde humana e animal. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação (REASE)**, São Paulo, v. 10, n. 11, 2024. DOI: <https://doi.org/10.51891/rease.v10i11.17248>
- OLSEN, W. O. Animal Parasites: Their life cycles and ecology. **Baltimore: University Park Press**, 1974.
- OTRANTO, D. *et al.* Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. **Parasites and Vectors**, v. 2, n 1, 2009. DOI: [10.1186/1756-3305-2-S1-S2](https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S2)
- PANAYOTOVA-PENCHEVA, *et al.* *Dirofilaria immitis* infection in carnivores from Bulgaria: 2012-2013 update. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2015 Online first. 10.15547/bjvm.918.
- PARANESE, R. *et al.* Comparison of diagnostic tools for the detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. **Pathogens**, v. 9, 2020. DOI: [10.3390/pathogens9060499](https://doi.org/10.3390/pathogens9060499)
- PASTRAV, I. R. *et al.* Peripheral venous vs. capillary microfilariaemia in a dog co-infected with *Dirofilaria repens* and *D. immitis*: a comparative approach using triatomine bugs for blood collection. **Vet. Parasitol.**, v. 257, 2018. DOI: [10.1016/j.vetpar.2018.05.017](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.017)
- PRICHARD, R. K. *et al.* Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: risks for prevention of heartworm disease. **Int J Parasitol.** v. 51, n. 13-14, 2021. DOI: [10.1016/j.ijpara.2021.08.006](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.006)
- RAMOS, R. A. N. *et al.* Filarioids infection dogs in northeastern Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 226, 2016. DOI: [10.1016/j.vetpar.2016.06.025](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.025)
- RANJBAR-BA, S. *et al.* Evaluation of Different Methods for Diagnosis of *Dirofilaria immitis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 10, n 11, 2007. DOI: [10.3923/pjbs.2007.1938.1940](https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.1938.1940)
- REIFUR, L. *et al.* Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Parana state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, 2004. DOI: [10.1016/j.vetpar.2004.05.017](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.05.017)
- RINALDI, L. *et al.* Mapping and modeling *Dirofilaria* infections in Europe. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. S1, 2014. DOI: [10.1186/1756-3305-7-S1-O2](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-S1-O2)

- RISHNIW, M. *et al.* Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. **Vet. Parasitol.**, v. 135, 2006. DOI: [10.1016/j.vetpar.2005.10.013](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.013)
- RIVIERE, J. E., PAPICH, M. G. **Adams Booth - Farmacologia e Terapêutica Veterinária**. Grupo GEN, 2021. E-book. ISBN 9788527738309.
- ROSA, A. *et al.* Prevalence of canine dirofilariosis in the City of Buenos Aires and its outskirts (Argentina). **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 3-4, 2002. DOI: [10.1016/s0304-4017\(02\)00286-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00286-8)
- SANG-EUN, L. *et al.* Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea. **Vet. Parasitol.**, v. 148, n. 1, 2007. DOI: [10.1016/j.vetpar.2007.04.015](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.015)
- SERRÃO, M. L. *et al.* Vectorial competence of *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) Rio de Janeiro strain, to *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000500001>
- SILVA, A. M. A., *et al.* Dirofilariose canina no município de Coari, Amazonas, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, 2008. <https://doi.org/10.5380/avs.v13i2.11613>
- SIMÓN F., *et al.* Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. **Clin Microbiol Rev.**, v. 25, n. 3, 2012. DOI: [10.1128/CMR.00012-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00012-12)
- SIQUEIRA-BATISTA, R. **Parasitologia - Fundamentos e Prática Clínica**. Grupo GEN – Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ, 2020. E-book. ISBN 9788527736473.
- SOARES, L. *et al.* Parasitological, serological and molecular diagnosis of *Dirofilaria immitis* in dogs in Northeastern Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 236-237, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108233>
- SOUZA, N. F., LARSSON, M. H. M. A. *et al.* Frequência de dirofilariose canina (*D. immitis*) em algumas regiões do Estado de São Paulo por meio da detecção de antígenos circulantes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.53, n. 3, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000300009>
- SOUZA, N. F. B., *et al.* Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém-PA, com base na microfilaremia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 1, 1997.
- TAYLOR, M. A., *et al.* **Parasitologia Veterinária**, 4ª edição. Grupo GEN – Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ, 2017.
- TODD, K. S.; HOWLAND, T. P. Transplacental transmission of *Dirofilaria immitis* microfilariae in the dog. **The Journal of Parasitology**, v. 69, n. 2, 1983. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6854475/>

TRANCOSO, T. A. L., *et al.* Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet.** v. 29, n. 1, 2020. DOI: [10.1590/S1984-29612020009](https://doi.org/10.1590/S1984-29612020009)

TRAVERSA D., *et al.* First case of macrocyclic lactone-resistant *Dirofilaria immitis* in Europe - Cause for concern. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.**, v. 25, 2024. DOI: [10.1016/j.ijpddr.2024.100549](https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2024.100549)

VEGNI TALLURI, M.; CANCRINI, G. An ultrastructural study on the early cellular response to *Dirofilaria immitis* (Nematoda) in the Malpighian tubules of *Aedes aegypti* (refractory strains). **Parasite**, v. 1, n. 4, 1994. DOI: [10.1051/parasita/1994014343](https://doi.org/10.1051/parasita/1994014343)

VERGNAUD, M. Étude de la prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire chez le Chien en Nouvelle-Calédonie. **Médecine vétérinaire et santé animale**, 2023. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04309289v1>

VEZZANI, D. *et al.* Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2-3, 2011. DOI: [10.1016/j.vetpar.2010.10.046](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.046)

WANG, D. *et al.* Factors influencing U.S. canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) prevalence. **Parasite and Vectors**, v. 7, 2014. DOI: [10.1186/1756-3305-7-264](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-264)

WILLI, L. M. V. LABARTHE, N. V., *et al.* Polimorfismos da glicoproteína-P (P-gp) e da β -tubulina (β -Tub) podem ser usados como marcadores genéticos de resistência em *Dirofilaria immitis* do Rio de Janeiro, Brasil? **BMC Res Notes**, v. 11, n. 152, 2018. DOI: [10.1186/s13104-018-3259-z](https://doi.org/10.1186/s13104-018-3259-z)

WILLI, L. *et al.* *Dirofilaria immitis* em paisagens distintas no estado do Rio de Janeiro. In: **XVII Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária**, 2012.

ANÁLISE DOS MARCADORES DE RESISTÊNCIA ÀS LACTONAS MACROCÍCLICAS - GLICOPROTEÍNA-P (P-GP) e β -tubulina (β -Tub)- EM AMOSTRAS DE SANGUE DE CÃES DO ESTADO DE ALAGOAS INFECTADOS COM *Dirofilaria immitis*

Eduarda Viana Mafra Cardoso¹, Camila Rose Bezerra de Lima¹, Jean Phellipe Marques³, Ranna Letícia Santos de Barros¹, Clarício Alvim Bugarim Neto¹, Patrícia Karla de Luna Magalhães¹, Fernanda Danielle Maria Gonçalves², Flávia Silva Damasceno¹, Abelardo Silva-Júnior¹, Wagnner José Nascimento Porto¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – PPGCA, Universidade Federal de Alagoas – UFAL

² Médica Veterinária Autônoma

³ LACEN/AL - Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas

RESUMO

A dirofilariose, causada pelo nematódeo *Dirofilaria immitis* e popularmente conhecida como "verme do coração", é uma zoonose de relevância para a abordagem de Uma Só Saúde, acometendo principalmente cães (*Canis lupus familiaris*), além de gatos e seres humanos. Desde 2003, observa-se um aumento da infecção em cães no Brasil e, mais recentemente, relatos de resistência às lactonas macrocíclicas (LMs), utilizadas na profilaxia e tratamento da infecção. Este estudo teve como objetivo investigar a presença de polimorfismos nos genes da glicoproteína-P (P-gp) e da β -tubulina (β -Tub), associados à resistência às LMs, em amostras de *D. immitis* provenientes do estado de Alagoas. Foram analisadas 39 amostras sanguíneas previamente testadas por métodos parasitológicos e/ou imunológicos, oriundas de diferentes municípios e cedidas por laboratórios clínicos. Após a triagem pela técnica de Knott modificada, procedeu-se à extração de DNA e à amplificação por PCR convencional utilizando primers específicos. Das 39 amostras, 22 apresentaram amplificação para pelo menos um dos genes-alvo, sendo 11 positivas para ambos. Em etapa posterior, utilizando Nested-PCR, 12 amostras amplificaram para o gene da glicoproteína-P (P-gp) e nenhuma para o gene da β -tubulina (β -Tub). As 12 amostras foram enviadas para sequenciamento por Sanger. Três amostras sequenciadas apresentaram qualidade adequada para análise da posição 11, um dos loci associados à resistência. No entanto, não foram identificados polimorfismos nessa posição. As três amostras eram oriundas da região metropolitana de Maceió. Assim, até o momento, não há evidências da circulação de cepas com mutações associadas à resistência às lactonas macrocíclicas no estado de Alagoas.

Palavras-chave: Dirofilariose, Polimorfismo genético, Resistência antiparasitária.

ABSTRACT

Dirofilariasis, caused by the nematode *Dirofilaria immitis* and popularly known as "heartworm," is a zoonosis relevant to the One Health approach, primarily affecting dogs (*Canis lupus familiaris*), as well as cats and humans. Since 2003, there has been an increase in infection in dogs in Brazil, and more recently, reports of resistance to macrocyclic lactones (MLs), used for prophylaxis and treatment of the infection. This study aimed to investigate the presence of polymorphisms in the P-glycoprotein and β -tubulin genes associated with ML resistance in *D. immitis* samples from the state of Alagoas. Thirty-nine blood samples previously tested by parasitological and/or immunological methods, originating from different municipalities and provided by clinical laboratories, were analyzed. After screening using the modified Knott technique, DNA extraction and conventional PCR amplification were performed using specific primers. Of the 39 samples, 22 showed amplification for at least one of the target genes, with 11 positive for both. In a subsequent step, using nested PCR, 12 samples amplified the P-glycoprotein gene and none for the β -tubulin gene. All 12 samples were sent for sequencing by Sanger. Three sequenced samples presented adequate quality for analysis of position 11, one of the loci associated with resistance. However, no polymorphisms were identified at this position. All three samples originated from the metropolitan region of Maceió. Therefore, to date, there is no evidence of the circulation of strains with mutations associated with resistance to macrocyclic lactones in the state of Alagoas.

Keywords: Dirofilariosis, Genetic polymorphism, Antiparasitic resistance

INTRODUÇÃO

A dirofilariose, causada pelo nematódeo *Dirofilaria immitis*, é uma parasitose de significativa relevância global, afetando principalmente cães, mas também gatos, furões e, raramente, humanos (Dantas-Torres *et al.*, 2020). Transmitida por mosquitos culicídeos (*Aedes* sp., *Culex* sp., *Anopheles* sp.), sua prevalência é maior em regiões de clima tropical e subtropical devido às condições ambientais favoráveis ao vetor e à presença de hospedeiros definitivos (Silva & Langoni, 2009; Holanda *et al.*, 2020; Leão Filho *et al.*, 2024). Em canídeos, a infecção pode variar de subclínica a quadros graves, com parasitos adultos localizados nas artérias pulmonares, causando sinais como tosse crônica, dispneia, intolerância ao exercício e, em casos avançados, insuficiência cardíaca direita (Ames *et al.*, 2020).

O diagnóstico da dirofilariose baseia-se frequentemente, na detecção de microfilárias (por exemplo, pelo teste de Knott modificado) e na pesquisa de antígenos de parasitos adultos (testes imunocromatográficos/enzimáticos). Atualmente, a biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem se tornado uma ferramenta essencial, aumentando a sensibilidade e precisão diagnóstica, sendo crucial para identificar infecções ocultas e diferenciar espécies (Favia *et al.*, 1997). O controle e tratamento são historicamente centrados nas lactonas macrocíclicas (LMs), eficazes na eliminação de microfilárias e na prevenção da infecção (McCall *et al.*, 2008; American Heartworm Society, 2024).

No entanto, o surgimento de cepas de *D. immitis* resistentes às LMs representa um desafio crescente e de grande preocupação para a eficácia profilática, impactando globalmente, o controle da doença (Savadelis, 2022). Estudos indicam que essa resistência está associada a mutações em genes como os da glicoproteína-P (P-gp) (P-gp) e β -tubulina (β -Tub) (Prichard *et al.*, 2021). Diante da relevância da dirofilariose e da crescente preocupação com a resistência parasitária às LMs, é fundamental aprofundar o conhecimento sobre a possível existência de cepas resistentes às LMs, especialmente em áreas onde dados moleculares são escassos. Assim, objetivou-se com este estudo analisar a presença de polimorfismos nos genes glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub) como possíveis marcadores de resistência às LMs em amostras de *D. immitis* circulantes no estado de Alagoas. A relevância deste trabalho se destaca por ser o primeiro a examinar amostras de *D. immitis* de Alagoas por PCR e sequenciamento para análise desses genes marcadores de resistência, gerando informações inéditas e essenciais para futuras pesquisas sobre novas formas de tratamento e prevenção da dirofilariose na região.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos e Legais para Obtenção das Amostras

As 39 amostras analisadas neste estudo foram cedidas por laboratórios particulares de análises clínicas veterinárias do estado de Alagoas, provenientes de pacientes atendidos por essas instituições, em tubos com anticoagulante, refrigerados em caixas térmicas, para análise no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os pesquisadores receberam as amostras exclusivamente para fins de processamento laboratorial, sem qualquer envolvimento na coleta.

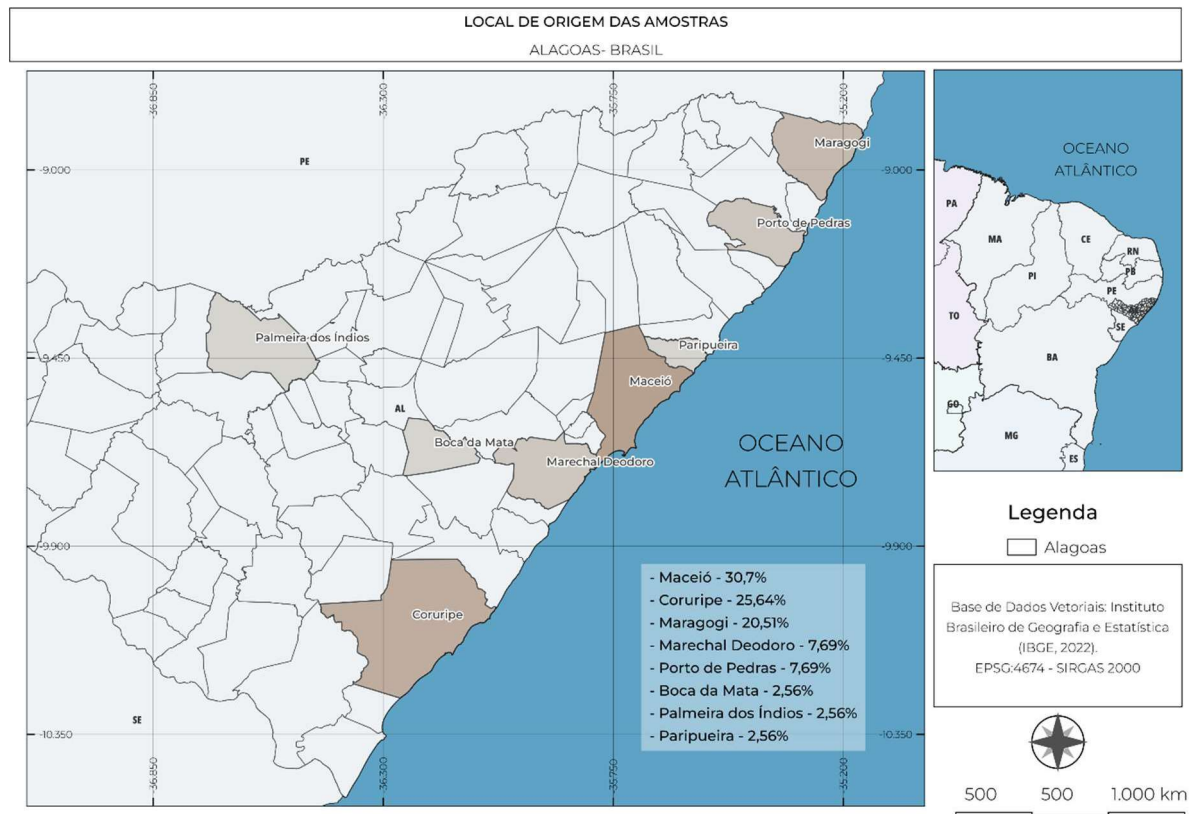
De acordo com o item 6.1.10 da Resolução Normativa nº 55, de 05 de outubro de 2022, que institui a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), quando o material biológico não for proveniente diretamente de atividades de ensino ou pesquisa, como nos casos de sobras de amostras biológicas obtidas durante procedimentos clínicos ou cirurgias eletivas realizadas com finalidade terapêutica, os responsáveis pela atividade devem seguir as diretrizes éticas e legais pertinentes, mas sem necessidade de autorização da CEUA.

Área de Estudo e Amostragem

Este estudo foi conduzido com amostras sanguíneas provenientes de cães naturalmente infectados por *D. immitis*. As amostras, provenientes de diversos municípios do estado de Alagoas, Nordeste do Brasil, foram cedidas por um laboratório de análises clínicas veterinárias.

Foram recebidas 39 amostras de sangue total de cães previamente diagnosticados como microfilarêmicos, distribuídas da seguinte forma: 8 de Maragogi, 3 de Porto de Pedras, 1 de Paripueira, 12 de Maceió, 3 de Marechal Deodoro, 10 de Coruripe, 1 de Palmeira dos Índios e 1 de Boca da Mata. As amostras foram selecionadas por conveniência e disponibilidade do laboratório particular colaborador, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Porcentagem de cães infectados com *Dirofilaria immitis* em cada município e a localização geográfica deles dentro do estado de Alagoas.



Fonte: Arquivo pessoal

Triagem e Confirmação da Presença de Microfilárias (Técnica de Knott Modificado)

Para a triagem e confirmação da presença de microfilárias nas amostras cedidas, empregou-se a Técnica de Knott Modificado, um método de concentração de microfilárias. Esta técnica é reconhecida por sua sensibilidade na recuperação e exame microscópico de microfilárias, sendo a versão modificada (onde houve a substituição de formol por água destilada) preferida em muitos laboratórios por facilitar a observação e, consequentemente, a identificação da espécie (Grieve *et al.*, 1983; Newton; Wright, 1956). Além de ser de custo mais acessível que métodos baseados em detecção de antígenos, a pesquisa de microfilárias constitui um dos mais simples e eficazes testes de triagem no diagnóstico da dirofilariose canina (Rizzo *et al.*, 1986; Newland, 1991).

Para cada amostra, foram preparadas lâminas em duplicata, as quais foram lidas integralmente sob lente objetiva de 10x e, para confirmação morfológica e contagem das microfilárias, sob 40x. A leitura foi realizada à medida que as amostras foram recebidas e processadas. A presença de microfilárias foi confirmada em todas as 39 amostras cedidas.

Biologia Molecular

Extração de DNA

Após a triagem e confirmação da presença de microfilárias em todas as 39 amostras de sangue, o DNA genômico foi extraído para as análises moleculares subsequentes, que incluíram a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional e o sequenciamento por Sanger.

A extração do DNA das amostras de sangue foi realizada utilizando o kit comercial EasyPure Blood Genomic DNA Kit, seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante para garantir a qualidade e pureza do material genético (Green & Sambrook, 2012). Este kit é amplamente reconhecido por sua eficácia na obtenção de DNA de alta qualidade a partir de amostras sanguíneas, minimizando a contaminação por inibidores da PCR (Sambrook; Russell, 2001).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Convencional

Todas as 39 amostras de DNA genômico com presença de microfilárias foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, com o objetivo de amplificar regiões específicas dos genes da Glicoproteína-P (P-gp) (P-gp) e da β -tubulina.

Para isso, foram utilizados *primers* previamente desenvolvidos e otimizados para a detecção de *D. immitis* e a análise desses marcadores de resistência (Bourguinat *et al.*, 2011) utilizando-se *primers* específicos, conforme quadro a seguir.

Figura 2 - Quadro dos primers específicos para do gene da glicoproteína-P (P-gp) (*P-gp*) e do gene da β -tubulina (*Tub*) de *Dirofilaria immitis*

Gene	Nome do primer	Sequência do primer de 5' para 3'
Glicoproteína-P (P-gp)	PGP_F	GGACAATTATCCGGTCA*
	PGP_R	TCGCAAATTTCTCCCACTT*
	PGP_R2	CTCTTGATGTGTTCCCTGCT**
β -tubulina	TUB1_F	TCAAGCTGGTCAGTGTGGC*
	TUB1_R	CGTTATAGTAGACATTGATTG*
	TUB7_F	ATGTGATCCACGTCATGGCC*
	TUB7_R	CATGTTGTATTTATTCCTCTTGC*
	TUB7a_F2	TGCTGAGCTACTCAACAGG**
	TUB7a_R2	GAATGTTGCGCTCATCTTCA**

Fonte: Adaptado de *Bourguinat, C, *et al.*, 2011, **Willi, L. M. V, *et al.*, 2018.

Amplificação do Gene da Glicoproteína-P (P-gp)

Para a amplificação do gene da P-gp, utilizou-se um protocolo de Semi-nested-PCR, com duas etapas sequenciais de amplificação para aumentar a sensibilidade e especificidade.

Primeira PCR: Cada reação continha 12,5 µL de GoTaq® Green MasterMix (Promega), 1 µL de cada *primer* (P-gp-F e P-gp-R) na concentração de 10 µM, 5,5 µL de água livre de nucleases e 5 µL da amostra de DNA genômico.

Segunda PCR: Foram utilizados 12,5 µL de GoTaq® Green MasterMix (Promega), 1 µL de cada *primer* (P-gp-F e P-gp-R2) na concentração de 10 µM, 5,5 µL de água livre de nucleases e 5 µL da amostra de DNA genômico.

A amplificação do gene da P-gp foi realizada em um termociclador, sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 56 °C por 45 segundos, extensão a 68 °C por 2 minutos, e uma extensão final a 68 °C por 5 minutos. O fragmento esperado para a amplificação do gene da P-gp foi de aproximadamente 623 pares de bases.

Amplificação do Gene da β -tubulina (β -Tub)

Para a amplificação do gene da β -tubulina (β -Tub), também foi empregado um protocolo de Semi-nested-PCR, com duas etapas:

Primeira PCR: As reações foram compostas por 12,5 µL de GoTaq® Green MasterMix (Promega), 1 µL de cada *primer* (TUB1-F e TUB1-R) na concentração de 10 µM, 5,5 µL de água livre de nucleases e 5 µL da amostra de DNA genômico.

Segunda PCR: Cada reação continha 12,5 µL de GoTaq® Green MasterMix (Promega), 1 µL de cada *primer* (TUB7-F e TUB7-R) na concentração de 10 µM, 5,5 µL de água livre de nucleases e 5 µL de DNA genômico.

A amplificação do gene da β -tubulina (β -Tub) foi realizada em um termociclador, com desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 58 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 2 minutos, e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os fragmentos esperados para a amplificação do gene da β -tubulina (β -Tub) variaram entre 692 e 832 pares de bases.

Eletroforese em Gel de Agarose

Para a confirmação da amplificação dos genes-alvo (P-gp e β -Tub), os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, com tampão de corrida TBE 1 X (pH 8,3), e 5 µL do corante fluorescente SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher

Scientific). Utilizou-se 10uL de marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Ladder 100) e 10uL de amostra em cada poço em cuba eletroforética a 100V/30min, com 623pb esperados para amplificação da P-gp, e 692 e 832 pb, para β -tubulina (β -Tub).

Após cada reação, os produtos foram visualizados e fotografados em um transiluminador ultravioleta. A visualização de um fragmento de tamanho esperado confirmou a presença da amplificação do gene alvo nas amostras.

Amplificação dos fragmentos para sequenciamento

Para a obtenção dos fragmentos de DNA destinados ao sequenciamento por Sanger, os produtos das reações de PCR (Nested-PCR) dos genes da Glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub) foram utilizados como molde em uma nova amplificação por PCR convencional. Essa etapa visou garantir a pureza e a quantidade ideais de fragmento para o sequenciamento.

Figura 03: Primers usados para amplificação e sequenciamento do gene da glicoproteína-P (P-gp) (P-gp) e do gene da β -tubulina (Tub) de *Dirofilaria immitis*, respectivamente.

Gene	Posição no gene	Primer usado amplificação	Primer usado sequenciamento
Glicoproteína-P (P-gp)	11	PGP_F/PGP_R2	PGP_R2
	618	PGP_F/PGP_R	PGP_F
β -tubulina	561	TUB1_F/TUB1_R	TUB1_R
	2755	TUB7_F/TUB7_R	TUB7_F
		TUB7a_F2/TUB7a_R2	TUB7a_F2

Fonte: Adaptado de Willi, L. M. V, *et al*, 2018.

Cada reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 μ L, contendo 12,5 μ L de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corporation, Madison, EUA), 1 μ L de cada *primer* específico, nas combinações, a) para o gene da glicoproteína-P (P-gp): P-gp-F e P-gp-R2 e para o gene da β -tubulina (β -Tub): TUB7-F/TUB7a-F2, TUB7-F/TUB1-R, ou TUB7a-F2/TUB1-R (Prichard *et al.*, 2012; Bourguinat *et al.*, 2011; Willi, *et al*, 2018), 5 μ L de DNA genômico (o produto da PCR interna) e 5,5 μ L de água ultrapura livre de nucleases.

As condições de amplificação termocíclicas para essa PCR de preparo de sequenciamento seguiram o mesmo protocolo utilizado nas PCRs anteriores para cada gene.

Purificação dos Produtos de PCR para Sequenciamento

Para a obtenção dos fragmentos de DNA destinados ao sequenciamento por Sanger, os produtos amplificados das reações de PCR (Nested-PCR) dos genes da Glicoproteína-P (P-gp) e β -tubulina (β -Tub) foram excisos do gel de agarose com lâmina estéril e purificados com a utilização do kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Essa etapa visou garantir a pureza e as quantidades ideais de material para o sequenciamento genético.

Quantificação dos Produtos de PCR Purificados

Após a purificação com o kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System, a concentração dos fragmentos de DNA amplificados foi determinada para garantir a quantidade e a qualidade ideais para as etapas subsequentes de sequenciamento.

A quantificação foi realizada utilizando o sistema fluorométrico Qubit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), empregando o kit Qubit dsDNA HS Assay Kit (High Sensitivity). Para cada amostra, uma alíquota do produto de PCR purificado foi adicionada à solução de trabalho do kit, que contém um fluorocromo que se liga especificamente ao DNA de fita dupla. A leitura da concentração em nanogramas por microlitro (ng/ μ L) foi efetuada utilizando o fluorímetro Qubit, conforme as recomendações do fabricante (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific).

Sequenciamento e Análises de Bioinformática

Os fragmentos amplificados de cada amostra para os genes da P-gp foram enviados para purificação e sequenciamento na empresa MacroGen Incorporation¹.

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o software Ugene (versão 52.1). Inicialmente, os cromatogramas foram inspecionados visualmente para verificar a qualidade das bases (Phred score 30), sendo descartadas regiões com sinais de baixa resolução. Em seguida, as sequências foram alinhadas contra a sequência de referência correspondente (GenBank HM596853) utilizando a ferramenta de alinhamento de sequências do Ugene, com parâmetros padrão (Phred score = 30 e Percentual de Similaridade de Mapeamento de $\geq 80\%$). Regiões com discrepâncias ou polimorfismos foram revisadas manualmente, e sequências consenso foram geradas a partir das leituras forward e reverse.

¹ MacroGen Inc., 1007 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul, 153-781, Korea.

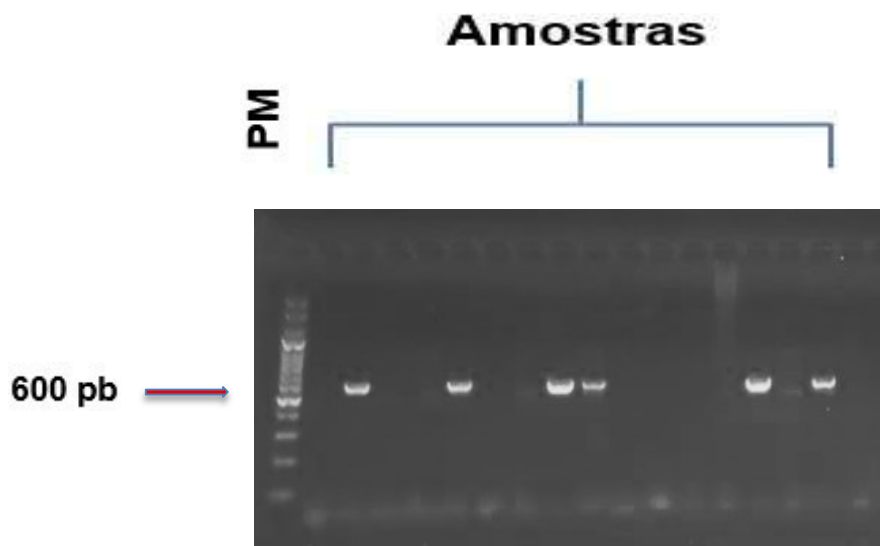
Nos cromatogramas dos sequenciamentos dos genes da P-gp de cada amostra, foi realizada a pesquisa dos polimorfismos pontuais (SNPs) nas posições 11 e 618 do gene parcial da P-gp (Bourguinat *et al*, 2011c).

Por fim, as sequências editadas foram exportadas no formato Fasta.

RESULTADOS

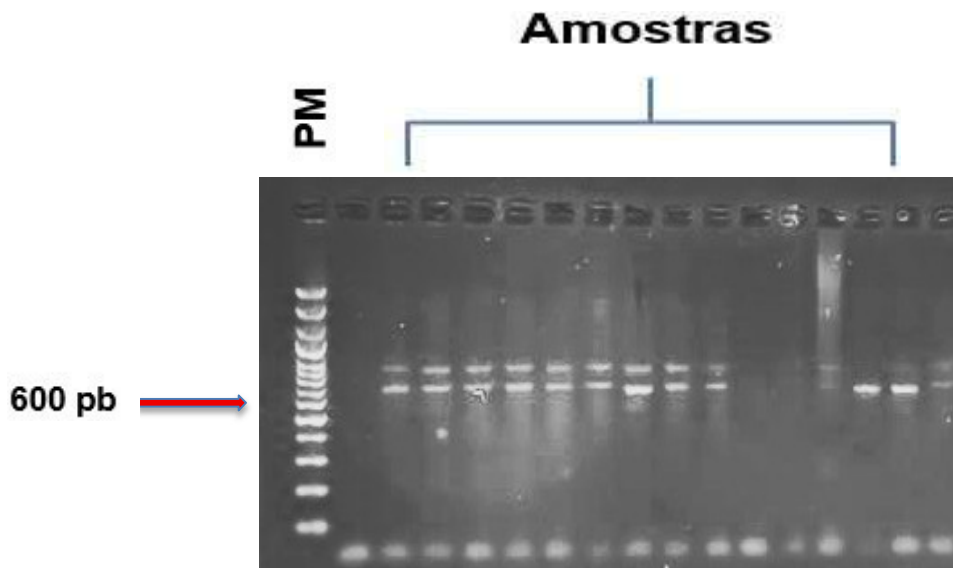
As 39 amostras de sangue canino recebidas pelos pesquisadores, passaram por confirmação da presença de microfilárias através da Técnica de Knott modificado, confirmando a presença de microfilárias em todas as amostras. Das 39 amostras submetidas às técnicas moleculares, 11 amostras apresentaram resultado positivo simultaneamente para os genes da glicoproteína-P (P-gp) e da β -tubulina (β -Tub), enquanto outras 11 amostras apresentaram amplificação apenas para um dos dois genes, seja P-gp ou β -Tub. Assim, um total de 22 amostras obteve amplificação para pelo menos um dos marcadores-alvo. No entanto, das 22 amostras submetidas à purificação, obteve-se 12 amostras com qualidade adequada o envio ao sequenciamento por Sanger.

Figura 4 - Amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína P (623pb) em amostras do estudo - Gel de agarose (2%) de amostras amplificadas pela reação em cadeia pela polimerase. Peso molecular (PM) – ladder 100.



Fonte: Arquivo pessoal

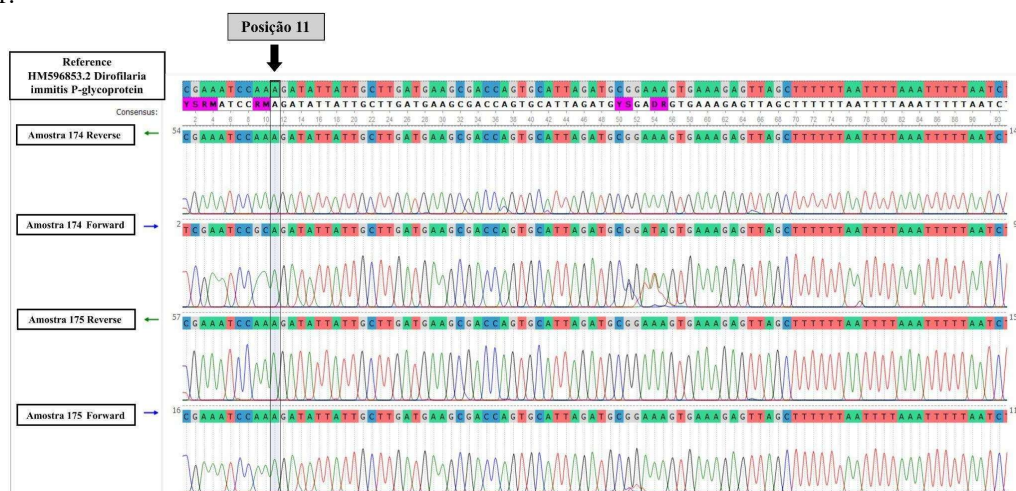
Figura 5 - Amplificação de fragmento do gene da β -tubulina (832pb) em amostras do estudo - Gel de agarose (2%) de amostras amplificadas pela reação em cadeia pela polimerase. Peso molecular (PM) – ladder 100.



Fonte: Mafra, *et al.*, 2025.

Das 12 amostras de DNA amplificadas e sequenciadas para seguimento parcial do gene da P-gp, a observação da posição 11 foi possível em 3 amostras (Figura 6), e não foi possível a observação na posição na posição 618. Nos cromatogramas destas amostras não foi observada presença de polimorfismos pontuais (SNPs). Devido à baixa qualidade dos picos nas posições 11 e 618, respectivamente, as demais amostras não foram analisadas.

Figura 6 - Cromatogramas obtidos pelos sequenciamentos das amostras dos *pools* de microfilárias de *Dirofilaria immitis* sequenciadas para o gene parcial da glicoproteína-P (P-gp) com marcação da posição 11.



Fonte: Arquivo pessoal.

Ressalte-se que as sequências acima relacionadas são referentes às amostras de números 174 e 175. Ambas as sequências apresentaram boa qualidade, o que pode ser notado pelos picos dos cromatogramas, altos e bem definidos.

As amostras sequenciadas com bons resultados são de cães provenientes da região metropolitana de Maceió, sendo 1 cão de Paripueira, outro de Maceió e o último de Marechal Deodoro.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, conduzido de forma inédita no estado de Alagoas, revelaram a ausência de polimorfismos no loci 11 do gene da P-gp em três amostras de boa qualidade de *D. immitis* provenientes da região metropolitana de Maceió. Embora o número de sequências válidas seja limitado, esse achado é consistente com estudos prévios que sugerem que tal mutação não está amplamente distribuída em todas as populações do parasito (Bourguinat et al., 2011b; Willi, 2016). A ausência de mutações detectáveis reforça a hipótese de que, até o momento, não há evidências robustas da circulação de cepas resistentes às LMs em cães do estado de Alagoas.

É importante destacar que, dos 39 cães analisados, mais da metade apresentou amplificação em pelo menos um dos genes-alvo, e 12 amostras foram submetidas ao sequenciamento para o gene da P-gp. Esse desempenho está dentro do esperado em estudos com helmintos filarídeos, nos quais fatores como a baixa parasitemia, a degradação do DNA durante o transporte e o armazenamento, além de variações na composição genética entre isolados geográficos, impactam diretamente o sucesso da amplificação e a qualidade do sequenciamento (Simón et al., 2012; Laidoudi et al., 2020). Esses obstáculos não devem ser interpretados como falhas metodológicas, mas como reflexos das dificuldades inerentes à biologia molecular aplicada a parasitos com genoma complexo, reforçando a necessidade de padronização e otimização contínua das técnicas empregadas.

Outro aspecto relevante refere-se à diversidade genética de *D. immitis* no Brasil. Estudos recentes demonstraram a existência de haplótipos regionais distintos em genes mitocondriais e ribossomais (Laidoudi et al., 2022), o que pode explicar diferenças na performance de primers desenhados com base em populações de outros continentes. Essa variabilidade genética reforça a importância de estudos locais como o presente, uma vez que a extrapolação de dados obtidos em outras regiões pode não refletir a realidade epidemiológica brasileira.

O fato de três amostras sequenciadas com sucesso serem oriundas de municípios costeiros da região metropolitana de Maceió (Paripueira, Maceió e Marechal Deodoro) é particularmente relevante, considerando que áreas litorâneas apresentam condições ambientais altamente favoráveis à manutenção do ciclo vetorial e, portanto, ao risco aumentado de disseminação da dirofilariose (Holanda et al., 2020). A ausência de mutações detectáveis nessas áreas endêmicas contribui com informações estratégicas para a vigilância epidemiológica no estado.

A resistência às lactonas macrocíclicas (LMs) em *D. immitis* constitui uma preocupação crescente na medicina veterinária e na saúde pública, pois compromete a eficácia da principal estratégia terapêutica e profilática contra a dirofilariose canina. Desde os primeiros relatos nos Estados Unidos, sobretudo na região do Delta do Mississippi, a atenção da comunidade científica voltou-se para a investigação de polimorfismos genéticos que possam atuar como marcadores moleculares de resistência (Bourguinat et al., 2011; Willi et al., 2018). Entre os genes mais estudados, destacam-se a glicoproteína-P (P-gp) e a β -tubulina (β -Tub), cujas mutações já foram associadas a fenótipos de menor suscetibilidade às LMs em diferentes espécies de nematódeos (Xu et al., 1998; Eng & Prichard, 2005; Geary et al., 2011).

Ainda que não tenham sido detectados polimorfismos nos loci investigados, a contribuição deste estudo é significativa, pois trata-se do primeiro levantamento molecular sobre resistência às LMs em *D. immitis* no estado de Alagoas. Esse resultado representa um ponto de partida para a construção de uma base de dados genéticos regional, capaz de subsidiar futuras pesquisas com maior número de amostras, abrangência geográfica ampliada e inclusão de outros marcadores moleculares.

Do ponto de vista prático, a ausência de evidências de resistência em Alagoas indica que, até o momento, as lactonas macrocíclicas permanecem eficazes como ferramenta de profilaxia e controle da dirofilariose canina na região. No entanto, é imperativo manter o monitoramento molecular contínuo, uma vez que a pressão seletiva imposta pelo uso extensivo desses fármacos pode favorecer o surgimento de cepas resistentes ao longo do tempo. Nesse sentido, estudos como o presente contribuem não apenas para a medicina veterinária, mas também para a abordagem integrada da Uma Só Saúde (One Health), visto que a dirofilariose constitui uma zoonose com implicações diretas na saúde humana.

Em síntese, os achados reforçam a necessidade de vigilância genética sistemática da *D. immitis* em diferentes regiões do Brasil, visando antecipar possíveis cenários de resistência e garantir a sustentabilidade das medidas de prevenção atualmente disponíveis. Este trabalho

inaugura essa linha de investigação em Alagoas, oferecendo subsídios científicos para a formulação de estratégias de controle mais eficientes e adaptadas à realidade local

CONCLUSÃO

O presente estudo representa o primeiro esforço sistematizado para investigar, sob a perspectiva molecular, a presença de polimorfismos associados à resistência às lactonas macrocíclicas em *D. immitis* no estado de Alagoas. A análise de amostras obtidas de cães positivos revelou ausência de mutações no loci 11 do gene da glicoproteína-P (P-gp), indicando, até o momento, a não detecção de cepas resistentes circulantes na região.

Apesar das limitações inerentes à biologia molecular aplicada a helmintos, como a variabilidade genética entre isolados e a qualidade do DNA extraído, os resultados obtidos possuem relevância científica e epidemiológica. Eles contribuem para a construção de uma base de dados regional inédita, que poderá orientar futuros estudos com maior abrangência amostral, inclusão de outros genes de interesse e padronização metodológica voltada à realidade genética das populações brasileiras de *D. immitis*.

Do ponto de vista prático, a manutenção da eficácia das lactonas macrocíclicas em Alagoas reforça a importância de programas de prevenção sistemática, ao mesmo tempo em que evidencia a necessidade de vigilância molecular contínua para antecipar potenciais cenários de resistência. Nesse sentido, este trabalho inaugura uma linha de investigação essencial para a saúde animal e humana, integrando-se aos princípios da Uma Só Saúde (One Health) e contribuindo para o fortalecimento das estratégias de controle da dirofilariose no estado e no país.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of heartworm *Dirofilaria immitis* infection in dogs, 2024.
- AMES M. K, Atkins CE. Treatment of dogs with severe heartworm disease. *Vet Parasitol.*, v. 283, 2020. DOI: [10.1016/j.vetpar.2020.109131](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109131)
- BLOM, M. P. K. Oportunidades e desafios para arquivos de tecidos de biodiversidade de alta qualidade na era do sequenciamento de leitura longa. *Mol Ecol*, v. 30, 2021. <https://doi.org/10.1111/mec.15909>
- BOURGUINAT, C. *et al.* P-glycoprotein-like protein, a possible genetic marker for iparastictin resistance selection in *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 158, n. 2, 2008. DOI: [10.1016/j.molbiopara.2007.11.017](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.017)
- BOURGUINAT, C., *et al.* Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, v. 181, n. 2-4, 2011a. DOI: [10.1016/j.ijpara.2021.08.006](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.006)
- BOURGUINAT, C. *et al.* Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype. *Veterinary Parasitology*, v. 176, n. 4, 2011b. DOI: [10.1016/j.vetpar.2011.01.024](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.024)
- BOURGUINAT, C. *et al.* Genetic polymorphism in *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, v. 176, n. 4, 2011c. DOI: [10.1016/j.vetpar.2011.01.023](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.023)
- BOURGUINAT, C. *et al.* Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Veterinary Parasitology*, v. 210, n. 3-4, 2015. DOI: [10.1016/j.vetpar.2015.04.002](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.002)
- BOWMAN, D. D. Heartworms, macrocyclic lactones, and the specter of resistance to prevention in the United States. *Parasites and Vectors*, v. 5, n., 2012. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-138>
- BOWMAN, D. D.; ATKINS, C. E. Heartworm biology, treatment, and control. *The Veterinary Clinics of North American. Small Animal Practice*, v. 39, n. 6, 2009. DOI: [10.1016/j.cvsm.2009.06.003](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.003)
- BOWMAN, D. D. *et al.* Macrocyclic lactones and *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 26, n. 4, 2011. DOI: [10.1053/j.tcam.2011.07.001](https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.07.001)
- BUS, M., ALLEN, M. Collecting and preserving biological samples from challenging environments for DNA analysis. *Biopreserv Biobank*. v. 12, n. 1, 2014. DOI: [10.1089/bio.2013.0060](https://doi.org/10.1089/bio.2013.0060)
- CANCRINI G. *et al.* Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships. *Mappe Parassitologiche*, v. 8, 2007. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20083097530>

CHOCOBAR, M. L. E., *et al.* The Distribution, Diversity, and Control of *Dirofilariosis* in Brazil: A Comprehensive Review. **Animals (Basel)**, v. 24, n.14, 2024. DOI: [10.3390/ani14172462](https://doi.org/10.3390/ani14172462).

CROSSLEY B. M., *et al.* Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. **J Vet Diagn Invest.**, v. 32, n 6, 2020. DOI: [10.1177/1040638720905833](https://doi.org/10.1177/1040638720905833)

DANTAS-TORRES F. *et al.* Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 282, 2020. DOI: [10.1016/j.vetpar.2020.109113](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109113)

DANTAS-TORRES F. *et al.* Tratamento adulticida contra dirofilariose: uma perspectiva tropical. **Parasites & Vectors**, v.16, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05690-8>

FAVIA, G. *et al.* Polymerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. **Parasitology**, v. 113, 1996. DOI: [10.1017/s0031182000067615](https://doi.org/10.1017/s0031182000067615)

FERNANDES, C. G. N. *et al.* 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. Sci.**, v. 37, n. 6, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962000000600009>

GANDASEGUI, *et al.* Genome structure and population genomics of the canine heartworm *Dirofilaria immitis*, 2023. DOI: [10.1101/2023.04.25.538225](https://doi.org/10.1101/2023.04.25.538225)

GEARY, T. G. *et al.* Evidence for macrocyclic lactone anthelmintic resistance in *Dirofilaria immitis*. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 4, 2011. DOI: [10.1053/j.tcam.2011.09.004](https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.09.004)

GENCHI, C. *et al.* Canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in Western Europe: survey of veterinary awareness and perceptions. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 206. 2014. DOI: [10.1186/1756-3305-7-206](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-206)

GRIEVE, R. B. *et al.* Epidemiology of canine heartworm infection. **Epidemiologic Reviews**, v.5, 1983. DOI: [10.1093/oxfordjournals.epirev.a036260](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036260)

GRIEVE, R. B. *et al.* Canine *Dirofilaria immitis* infection in a hyperenzootic area: Examination by parasitologic findings at necropsy and by two serodiagnostic methods. **American Journal Veterinary Research**, v.47, n.2, 1986. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3954214/>

HOLANDA. *Dirofilaria immitis* em cães: revisão de literatura. In: Victor Hugo Vieira Rodrigues. (org.) Atualidades na saúde e bem-estar animal. Fortaleza: **Editora In Vivo**, 2020. DOI: [10.47242/978-65-991243-2-7-72](https://doi.org/10.47242/978-65-991243-2-7-72)

KHANMOHAMMADI M. *et al.* Morphological Description, Phylogenetic and Molecular Analysis of *Dirofilaria immitis* Isolated from Dogs in the Northwest of Iran. **Iran J Parasitol.** v. 15, n. 1, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32489376/>

KNOTT, J. W. A method for making microfilarial surveys on day blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 2, 1939.

LABARTHE, N. V. *et al.* Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. ***Parasite & Vectors***, v. 7, n. 493, 2014. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0493-7>

LAIDOUDI, Y., *et al.* Genetic and geographical delineation of zoonotic vector-borne helminths of canids. ***Sci Rep.***, v. 24, n. 12, 2022. DOI: [10.1038/s41598-022-10553-w](https://doi.org/10.1038/s41598-022-10553-w)

LAIDOUDI, Y., *et al.* Detecção de filariose transmitida por vetores caninos e seus endossimbiontes *Wolbachia* na Guiana Francesa. ***Microorganisms***, v. 8, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050770>

LEÃO FILHO, W. F. B. *et al.* *Dirofilaria immitis* in dogs from the coastal tourist region of the state of Alagoas, Brazil. ***Braz J Vet Parasitol***, v. 33, n. 3, 2024. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612024055>

LEIDY, J. A New Species of Nematode Worm from the Heart of the Dog. ***Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia***, v. 8, 1856.

LITTLE, S. E. *et al.* Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2010-2012. ***Parasites and Vectors***, v. 7, p. 257. 2014. DOI: [10.1186/s13071-020-04514-3](https://doi.org/10.1186/s13071-020-04514-3)

LITTLE, S. E. *et al.* Pre-treatment with heat facilitates detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples. ***Veterinary Parasitology***, v. 203, n. 1- 2, 2014. DOI: [10.1016/j.vetpar.2014.01.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.007)

LOK, J. B. *et al.* Abnormal patterns of embryogenesis in *Dirofilaria immitis* treated with iparazitocin. ***Journal of Helminthology***, v. 62, n. 3, 1988. DOI: [10.1017/s0022149x00011482](https://doi.org/10.1017/s0022149x00011482)

MANI, T *et al.* Interaction of macrocyclic lactones with a *Dirofilaria immitis* P-glycoprotein, ***International Journal for Parasitology***, v. 46, n. 10, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.04.004>

McCALL. *et al.* Heartworm disease in animals and humans. ***Adv Parasitol.*** v. 66, 2008. DOI: [10.1016/S0065-308X\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00204-2)

OLSEN, W. O. Animal Parasites: Their life cycles and ecology. ***Baltimore: University Park Press***, 1974.

OTRANTO, D. *et al.* Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. ***Parasites and Vectors***, v. 2 Suppl 1, 2009. DOI: [10.1186/1756-3305-2-S1-S2](https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S2)

PRICHARD, R. K. *et al.* Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: risks for prevention of heartworm disease. ***Int J Parasitol.*** v. 51, n. 13-14, 2021. DOI: [10.1016/j.ijpara.2021.08.006](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.006)

RAMOS, R. A. N. *et al.* Filarioids infection dogs in northeastern Brazil. ***Vet. Parasitol.***, v. 226, 2016. DOI: [10.1007/s11686-024-00834-x](https://doi.org/10.1007/s11686-024-00834-x)

REEVES, L. E., *et al.* Manutenção da integridade do DNA do hospedeiro em repastos de sangue de mosquitos (Diptera: Culicidae) preservados em campo para identificação por código de barras de DNA. **Parasites Vectors**, v. 9, n. 503, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1791-z>

RHEE, J. K., *et al.* Periodicity exhibited by *Dirofilaria immitis* microfilariae identified in dogs of Korea. **Korean J Parasitol.**, v. 6, n. 4, 1998. DOI: 10.3347/kjp.1998.36.4.235

RIZZO, D.M.; WARE, W.A. Canine heartworm disease. **Iowa State University Veterinarian**, v.51, n.2, 1989.

SAMBROOK, J e RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2012.

SILVA, R. C.; LANGONI, H. Dirofilariose: zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rural**, v. 39, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000062>

SIMÓN F. *et al.* Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. **Clin Microbiol Rev.**, v. 25, n. 3, 2012. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3416488/>

TRANCOSO, T. A. L., *et al.* Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet.** v. 29, n. 1, 2020. DOI: [10.1590/S1984-29612020009](https://doi.org/10.1590/S1984-29612020009)

WILLI, L. M. V. LABARTHE, N. V., *et al.* Polimorfismos da glicoproteína-P (P-gp) e da β -tubulina (β -Tub) podem ser usados como marcadores genéticos de resistência em *Dirofilaria immitis* do Rio de Janeiro, Brasil? **BMC Res Notes**, v. 11, n. 152, 2018. DOI: [10.1186/s13104-018-3259-z](https://doi.org/10.1186/s13104-018-3259-z)

ZHU, X. J., *et al.* Guanine-rich sequences inhibit proofreading DNA polymerases. **Sci Rep.**, v.28, 2016. DOI: [10.1038/srep28769](https://doi.org/10.1038/srep28769)

ZIZKA, V., *et al.* Long-term archival of environmental samples empowers biodiversity monitoring and ecological research. **Environmental Sciences Europe**, v. 40, n. 34, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00618-y>