



## Avaliação da interleucina-6 e do metabolismo do ferro em 20 cães saudáveis

[*Evaluation of interleukin-6 and iron metabolism in 20 healthy dogs*]

### "Artigo Científico/Scientific Article"

Nina da Cunha Medeiros<sup>1\*</sup> , Rosangela Locatelli Dittrich<sup>1</sup> 

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR, Brasil.

\*Autora para correspondência/Corresponding author: [ninadcm85@gmail.com](mailto:ninadcm85@gmail.com)

#### Resumo

Em processos inflamatórios ocorre aumento da circulação de interleucina-6 (IL-6), citocina pró-inflamatória que estimula a produção de hepcidina. Este hormônio regula o metabolismo do ferro, diminuindo sua absorção intestinal e indisponibilizando o ferro no interior das células. A principal consequência destas alterações é a anemia por indisponibilidade deste mineral. Para auxiliar no diagnóstico, determinação do prognóstico e guiar decisões terapêuticas, a avaliação laboratorial do metabolismo do ferro, hepcidina e IL-6 são de grande valia. O presente estudo objetivou avaliar a concentração sérica de ferro, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação do ferro (CTLF), índice de saturação da transferrina (IST), IL-6 e hepcidina em cães saudáveis. Foram avaliados 20 cães adultos sadios sem especificação de raça e sexo e apresentando proteína C reativa abaixo de 10 mg/L. A concentração de ferro e a CLLF foram avaliadas por método colorimétrico utilizando Ferene, em seguida CTLF e IST foram calculadas. A determinação da concentração sérica de IL-6 e hepcidina foram realizadas por Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA) utilizando kits específicos para a espécie canina. Os valores médios obtidos foram: ferro sérico = 157,75 µg/dL; CLLF= 270,41 µg/dL; CTLF = 425,61 µg/dL; IST = 36% e IL-6 = 0,164 ng/mL. Das 20 amostras avaliadas apenas uma apresentou leitura para hepcidina (16,9 ng/mL). Não houve correlação entre as concentrações séricas de IL-6 e a concentração sérica de ferro, CLLF, CTLF e IST, sugerindo que variações fisiológicas desta citocina não interferem no metabolismo de ferro de cães saudáveis.

**Palavras-chave:** Capacidade total de ligação do ferro; capacidade latente de ligação do ferro; transferrina; ferritina; inflamação.

#### Abstract

In inflammation, there is an increase in interleukin-6 (IL-6), a pro-inflammatory cytokine that stimulates the production of hepcidin. This hormone regulates iron metabolism, decreasing intestinal absorption and making iron unavailable inside cells. The main consequence of these alterations is anemia due to the unavailability of this mineral. To help the diagnosis, determine the prognosis and guide therapeutic decisions, laboratory evaluation of iron metabolism, hepcidin and IL-6 are important. The present study aimed to evaluate serum iron concentration, unsaturated iron-binding capacity (UIBC), total iron-binding capacity (TIBC), transferrin saturation (TS), IL-6 and hepcidin in healthy dogs. Twenty healthy adult dogs without specification of breed and sex and presenting C-reactive protein below 10 mg/L were evaluated. Iron concentration and UIBC were assessed by colorimetric method using Ferene, then TIBC and IST were calculated. The determination of the serum concentration of IL-6 and hepcidin was performed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using specific kits for the canine species. The mean values obtained were: serum iron = 157.75 µg/dL; UIBC= 270.41 µg/dL; TIBC = 425.61 µg/dL; TS = 36% and IL-6 = 0.164 ng/mL. Of the 20 samples evaluated, only one showed a reading for hepcidin (16.9 ng/mL). There was no correlation between serum IL-6 concentrations and serum iron concentration, UIBC, TIBC and TS, suggesting that physiological variations of this cytokine do not interfere with iron metabolism in healthy dogs.

**Keywords:** Total iron-binding capacity; unsaturated iron-binding capacity; transferrin; ferritin; inflammation.

Recebido 25 de março de 2023. Aceito 05 de outubro de 2023.

DOI: <https://doi.org/10.26605/medvet-v17n4-5648>



## Introdução

O ferro é fundamental para o funcionamento do corpo e o perfeito sincronismo entre sua absorção, utilização e estoque é essencial para a manutenção da homeostase (Bohn, 2013). A chave reguladora do metabolismo do ferro é o hormônio peptídico hepcidina, produzido nos hepatócitos (Hentze et al., 2010; Grimes et al., 2012; Ruchala e Nemeth, 2014 e Girelli et al., 2016). Existem condições fisiológicas e patológicas que modulam a produção da hepcidina. Fisiologicamente, é regulada pela concentração plasmática de ferro, sendo que na condição de suficiência há o aumento da síntese do peptídeo. Por outro lado, a atividade eritropoética e oscilações hormonais, suprimem a produção deste hormônio. Condições patológicas ou clínicas também influenciam na síntese de hepcidina. Anemia, hepatopatias crônicas e administração de eritropoetina sintética, inibem sua produção. Do contrário, a suplementação de ferro e a inflamação estimulam sua síntese (Bregman et al., 2013; Girelli et al., 2016; Bhamarasuta et al., 2021).

Nos processos inflamatórios há o aumento da produção de interleucina-6 (IL-6), responsável por diversas alterações sistêmicas, como febre, cansaço, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda da inflamação (Hunter e Jones, 2015). Uma das principais ações da IL-6 é a sinalização para que os hepatócitos aumentem a produção do hormônio hepcidina, diminuindo a concentração de ferro plasmático (Ruchala e Nemeth, 2014). Portanto, pacientes com processos inflamatórios tendem a apresentar alterações no metabolismo do ferro e, conseqüentemente, anemia arregenerativa devido à indisponibilidade deste mineral fundamental na hematopoiese. Desta forma, em animais com doenças crônicas, é de suma importância avaliar ferro sérico, ferritina, transferrina, índice de saturação da transferrina e capacidade de ligação do ferro para verificar laboratorialmente as conseqüências da inflamação sobre a disponibilidade do mineral (Bohn, 2013; Girelli et al., 2016).

Além de avaliar o metabolismo do ferro, a determinação da concentração sérica da hepcidina e da IL-6 auxilia na avaliação do processo inflamatório, pois são biomarcadores de inflamação (Schüttler e Neumann, 2015; Girelli et al., 2016). Em seres humanos, a dosagem de IL-6 e hepcidina pode ser útil na determinação do prognóstico de diferentes enfermidades como

COVID e linfoma Hodgkin, por exemplo (Hohaus et al., 2010; Nai et al., 2021). Na medicina veterinária existem poucos trabalhos avaliando estes dois marcadores, havendo divergências entre os valores encontrados nas pesquisas (Zaritsky et al., 2009; Dabrowski et al., 2015; Schüttler e Neumann, 2015; Goddard et al., 2016 e Vizi et al., 2020).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a concentração sérica de hepcidina, IL-6, ferro sérico, capacidade de ligação do ferro e índice de saturação da transferrina em cães saudáveis para contribuir com o estabelecimento de valores de normalidade. Além disso, o presente trabalho propôs correlacionar o metabolismo do ferro com as variações fisiológicas observadas nas concentrações de hepcidina e IL-6.

## Material e Métodos

Durante o mês de dezembro de 2022, foram selecionados 25 cães atendidos em hospitais veterinários da cidade de Curitiba/PR para a realização de check up anual. Após o aceite do tutor e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram realizados anamnese, exame físico e coleta de sangue. Na anamnese, foi verificado se o animal se enquadrava nos fatores includentes e não possuía fatores excludentes determinados para o estudo. Os fatores excludentes utilizados foram: uso de anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais nos últimos 30 dias, doação de sangue ou recebimento de hemocomponentes há menos de três meses, vacinação nas últimas quatro semanas e fêmeas no período de estro. Os fatores includentes foram: cães de ambos os sexos, sem especificação de raça, com idade mínima de um ano e máxima de oito anos, alimentados com ração comercial, submetidos a controle de parasitas e clinicamente saudáveis. Além da análise dos fatores de inclusão e exclusão, os cães foram submetidos à coleta de sangue e urina para realização de hemograma, perfil renal, hepático, lipidograma, proteinograma, proteína C reativa, urinálise e razão proteína urinária/creatinina urinária. No presente estudo, avaliou-se a proteína C reativa em todos os cães, para auxiliar na detecção de processos inflamatórios. Dos 25 animais avaliados, 20 se enquadraram em todos os quesitos e foram incluídos na pesquisa.

Todas as coletas de sangue ocorreram no período da manhã (entre 8h e 11h). Apesar de estudos demonstrarem que variações

cronobiológicas não afetam significativamente o metabolismo do ferro, é indicado padronizar o horário de coleta para a análise da hepcidina (Dale et al., 2002; Kroot et al., 2009). O sangue foi acondicionado em um tubo contendo EDTA, um tubo com heparina e um tubo com acelerador de coágulo. O tubo contendo heparina foi imediatamente centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos para possibilitar a separação do plasma. Este foi separado em quatro alíquotas e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As alíquotas de plasma heparinizado foram utilizadas para análise da proteína C reativa, IL-6 e hepcidina. O processo de separação do plasma e congelamento das amostras foi realizado em até 15 minutos para manter a estabilidade do hormônio. As amostras de sangue total foram utilizadas para a realização do hemograma e as amostras de soro obtidas após a centrifugação do tubo com acelerador de coágulo foram utilizadas nas análises bioquímicas. Além da avaliação sanguínea, foi realizada urinálise de todos os animais. A coleta de urina ocorreu por micção espontânea e a análise das amostras consistiu em exame físico, químico, sedimentoscopia e determinação da razão proteína urinária/creatinina urinária.

O processamento das amostras ocorreu no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná. As quantificações do ferro sérico e capacidade latente de ligação do ferro (CLLF) foram realizadas pelo método colorimétrico utilizando Ferene com o reagente comercial da marca Kovalent®. Após a determinação destes parâmetros, foi possível calcular a capacidade total de ligação do ferro (CTLF) pela fórmula:  $\text{CTLF} = \text{Ferro sérico} + \text{CLLF}$ . A partir da concentração do ferro sérico e da CTLF foi possível determinar o índice de saturação da transferrina (IST) pela fórmula:  $\text{IST} = (\text{Ferro sérico}/\text{CTLF}) \times 100$ .

A determinação da proteína C reativa foi realizada pela técnica de Imunoensaio Fluorescente no aparelho V Check® V200 e a quantificação da hepcidina sérica e IL-6 foram realizadas por Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA). Foram utilizados os kits “Dog Hpcidin ELISA Kit” e “Dog IL-6 ELISA Kit” (ELK Biotechnology, Wuhan, China), seguindo as instruções do fabricante. Ambas as microplacas de ELISA foram lidas a 450 nm no aparelho Thermo Plate TP Reader e as amostras foram analisadas em duplicata.

Após a análise laboratorial, os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. Primeiramente foi realizado teste de Shapiro Wilk para avaliar a distribuição dos dados e o teste de Tukey para verificar a presença de outliers. Após estas etapas, foram realizados testes de correlação dos dados. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## Resultados

Dos 20 cães avaliados, 12 eram fêmeas (nove castradas e três inteiras) e oito eram machos (seis castrados e dois inteiros). Os animais eram de raças variadas, havendo predomínio de cães sem raça definida (7) seguido por Pit Bull (4), Rotweiler (2), Pug (2), Shih-tzu (2), Border Collie (1), Yorkshire Terrier (1) e Schnauzer (1). A idade dos animais variou de um a oito anos, sendo que a média foi de quatro anos.

Todos os cães avaliados apresentaram hemograma, avaliação hepática, renal, proteinograma, lipidograma e proteína C reativa ( $<10\text{mg/L}$ ) dentro da normalidade. Foram estabelecidos valores médios, mediana e desvio padrão dos parâmetros: ferro sérico, CLLF, CTLF, IST, concentração de IL-6 (Tabela 1). Das 20 amostras avaliadas para determinar a concentração de hepcidina sérica, apenas uma apresentou leitura (16,9 ng/mL). O teste de Tukey detectou um outlier nos valores do ferro sérico, IST e da CLLF. Tais dados foram retirados da análise estatística.

A análise estatística de Shapiro Wilk demonstrou que os parâmetros IL-6, CTLF, CLLF e IST apresentaram distribuição normal dos dados, enquanto que a concentração de ferro sérico não apresentou distribuição normal. As correlações de Pearson entre IL6- e CTLF, IL-6 e CLLF e IL-6 e IST não foram significativas ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, não se observou correlação estatisticamente significativa no teste de Spearman para as variáveis IL-6 e concentração sérica de ferro.

## Discussão

As concentrações de ferro e da capacidade latente de ligação do ferro obtidas foram determinadas pelo método colorimétrico utilizando Ferene. A metodologia colorimétrica não é espécie-específica e, como descrito anteriormente, os valores médios obtidos no presente estudo foram: ferro sérico = 157,75  $\mu\text{g/dL}$  e CLLF = 270,41  $\mu\text{g/dL}$ . Pires et al. (2011)

avaliaram 120 cães hígdidos e encontraram valores médios de ferro (145,3 µg/dL) e CLLF (222,9 µg/dL), similares aos encontrados no presente estudo. Os pesquisadores supracitados utilizaram a mesma metodologia para a determinação destes

parâmetros, demonstrando que a análise de ferro e CLLF por colorimetria utilizando Ferene apresentam boa reprodutibilidade e possuem a vantagem adicional de serem de baixo custo e fácil acesso.

**Tabela 1.** Parâmetros do metabolismo do ferro, hepcidina sérica e interleucina-6 em cães saudáveis.

	Ferro Sérico (µg/dL)	CLLF (µg/dL)	CTLF (µg/dL)	IST (%)	IL-6 (ng/mL)
<b>Amostras</b>	19	19	19	19	20
<b>Média</b>	157,75	270,41	425,61	36	0,164
<b>Mediana</b>	154,00	269,75	419,20	36	0,169
<b>D.P.</b>	32,23	74,81	86,05	7	0,061
<b>Mínimo</b>	115,0	124,7	294,4	0,24	0
<b>Máximo</b>	231,0	413,9	640,4	0,52	0,254

CLLF: Capacidade latente de ligação do ferro; CTLF: Capacidade Total de Ligação do Ferro; D.P.: Desvio padrão; IST: índice de saturação da transferrina; IL-6: Interleucina 6.

Valores de ferro sérico e CLLF publicados por Kaneko et al. (2008), são inferiores aos determinados neste estudo. A principal diferença observada está na concentração de ferro. Esses autores utilizaram 30 a 180 µg/dL como intervalo de referência para cães. Observa-se que o valor mínimo é quatro vezes menor aos encontrados no presente estudo e por Pires et al. (2011). Concentrações séricas de ferro igualmente baixas como as referidas por Kaneko et al. (2008) foram relatadas por Rajamanickam et al. (2021) em cães com babesiose apresentando grave anemia e hipoferremia. Portanto, os valores de referência devem ser utilizados com cautela pois as diferenças encontradas podem influenciar na interpretação dos resultados. Não há descrição da técnica e do número de animais avaliados no estudo utilizados por Kaneko et al. (2008) como valores de normalidade, dificultando a análise crítica dos resultados publicados e o motivo da variação observada.

Com os valores de ferro sérico e da CLLF, é possível calcular a capacidade total de ligação de ferro (CTLF) e o índice de saturação da transferrina (IST). Determinar a CTLF e IST são formas indiretas de avaliar o compartimento de transporte do ferro. Atualmente, a dosagem de transferrina canina é realizada por metodologia de ELISA e possui difícil acesso e alto custo no Brasil, ressaltando a necessidade do estabelecimento de valores fidedignos de normalidade da CTLF e IST. No presente estudo, os valores de CTLF e IST foram, respectivamente, 425,61 µg/dL e 36%. Tais resultados são similares aos encontrados por Pires et al. (2011), demonstrando consistência nos dados.

Das 20 amostras analisadas, apenas uma apresentou leitura para hepcidina (16,9 ng/mL). Existem desafios associados à dosagem deste hormônio. Por ser um peptídeo com 25 aminoácidos e 3kDa de peso molecular, a ligação antígeno-anticorpo necessária em metodologias que utilizam ferramentas imunológicas torna-se mais difícil (Grimes et al., 2012). No presente estudo, foi utilizado kit comercial de ELISA, um imunoenensaio. Em uma recente pesquisa, Vizi et al. (2020) determinaram as concentrações séricas de hepcidina em cães saudáveis pela metodologia de cromatografia líquida/espectrometria de massa e estabeleceram que a estabilidade do hormônio é de apenas uma hora em temperatura ambiente (25°C). Outras características que interferem na avaliação laboratorial desta molécula é sua rápida depuração plasmática e baixa concentração sérica (Ruchala e Nemeth, 2014). No presente estudo, as amostras foram centrifugadas e congeladas a -80°C em até 15 minutos após a coleta de sangue. Porém, é possível que tenha ocorrido a degradação da molécula durante os processos analíticos, dificultando a ligação antígeno-anticorpo durante a execução do teste de ELISA.

Apesar das dificuldades relatadas, existem estudos na medicina veterinária que avaliaram o hormônio. Rajamanickam et al. (2021), por exemplo, estudaram cães com babesiose e observaram que as concentrações de hepcidina foram significativamente mais elevadas nos cães que morreram quando comparados ao grupo controle. Neste mesmo estudo, as concentrações de ferro sérico foram significativamente mais baixas e a CTLF e a CLLF apresentaram-se significativamente mais altas no grupo de animais que vieram a óbito. Tais resultados podem indicar

que avaliar o metabolismo do ferro pode ser utilizado como preditor de gravidade e mortalidade e é uma alternativa viável à dosagem da hepcidina sérica.

O uso da IL-6 como biomarcador da inflamação é utilizado na rotina clínica em seres humanos (Hohaus et al., 2010). Porém, até o momento, é avaliado apenas em pesquisas na medicina veterinária. Em cães, as concentrações de IL-6 já foram analisadas por ELISA e por meio de cultivo celular. Este último método é laborioso e caro, sendo preferível o uso de kits comerciais de ELISA. O presente estudo utilizou o “Dog IL-6 ELISA Kit” e determinou a concentração sérica de  $0,169 \pm 0,061$  ng/mL em cães saudáveis. Este resultado é similar aos encontrados por outros autores que utilizaram a mesma metodologia (Nikolic Nielsen et al., 2013; Avazi et al., 2019; Cheney et al., 2022). Porém, existem trabalhos em que não foi detectada presença de IL-6 na amostra dos cães saudáveis pertencentes ao grupo controle (Rau et al., 2007; Schüttler e Neumann, 2015). Tal variação pode estar relacionada à metodologia utilizada ou variações fisiológicas e precisam ser melhor compreendidas. Existem causas fisiológicas da variação da concentração sérica desta citocina, dentre elas: estresse agudo, exercício físico, envelhecimento e diminuição da produção de hormônios sexuais (Hunter e Jones, 2015).

No presente estudo, as análises de Pearson e Spearman não demonstraram correlação estatisticamente significativa entre as concentrações séricas de IL-6 com o ferro sérico, CLLF, CTLF, IST e leucócitos totais. Tal avaliação somado ao fato das concentrações da proteína C reativa de todos os cães estudados estarem normais, sugere que as variações na concentração de IL-6 observadas nos animais avaliados não apresentam relação com processo inflamatório e, por serem fisiológicas, não interferem no metabolismo do ferro.

É importante salientar que, na medicina veterinária, não existem valores de referência para Hpcidina e IL-6 pela metodologia de ELISA. Os valores de referência de hepcidina definidos por Vizi et al. (2020) foram estabelecidos pela técnica de cromatografia líquida/espectrometria de massa, um método de alto custo. Para que a avaliação da IL-6 e da hepcidina sejam futuramente utilizadas na rotina clínica, são necessários mais estudos estabelecendo intervalos de normalidade e, preferencialmente, o acesso a metodologias de

menor custo e fácil execução. Por este motivo, utilizar ferramentas laboratoriais para avaliar as consequências dos processos inflamatórios no metabolismo do ferro é uma alternativa viável e que auxilia no diagnóstico e definição do tratamento do paciente anêmico.

### Conclusão

Cães saudáveis podem apresentar concentrações séricas de interleucina-6 de  $0,169 \pm 0,061$  ng/mL e as variações fisiológicas desta citocina não interferem no metabolismo do ferro em cães. Os valores de ferro sérico, CLLF, CTLF e IST obtidos no presente estudo podem ser utilizados como valores de normalidade em cães.

### Conflito de Interesse

Os autores declaram não existir conflito de interesse.

### Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do Paraná (protocolo 049/2022).

### Referências

- Avazi, D.O. et al. Evaluation of levels of interleukin-6, interleukin-8 and some haematologic parameters of dogs with cutaneous wounds. *Cytokine*, 113: 128-138, 2019.
- Bhamarasuta, C. et al. Iron status and erythropoiesis response to darbepoetin alfa in dogs with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(4): 601-608, 2021.
- Bohn, A.A. Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 43(6): 1319-1330, 2013.
- Bregman, D.B. et al. Hpcidin levels predict nonresponsiveness to oral iron therapy in patients with iron deficiency anemia. *American Journal of Hematology*, 88(2): 97-101, 2013.
- Cheney, A. et al. Interleukin-6 and thrombopoietin concentrations in dogs with carcinoma with and without thrombocytosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36(1): 227-233, 2022.
- Dabrowski, R. et al. Serum IL-6 and IL-10 concentrations in bitches with pyometra undergoing ovariohysterectomy. *Acta*



- Veterinaria Scandinavica*, 57(1): 8-11, 2015.
- Dale, J.C.; Burritt, M.F.; Zinsmeister, A.R. Diurnal variation of serum iron, iron-binding capacity, transferrin saturation, and ferritin levels. **American Journal of Clinical Pathology**, 117 (5): 802-808, 2002.
- Girelli, D.; Nemeth, E.; Swinkels, D.W. Heparin in the diagnosis of iron disorders. **Blood** 127(3): 2809-2813, 2016.
- Goddard, A. et al. Excessive pro-inflammatory serum cytokine concentrations in virulent canine babesiosis. **PLoS ONE**, 11(3): e0150113, 2016.
- Grimes, C.N.; Giori, L.; Fry, M.M. Role of hepcidin in iron metabolism and potential clinical applications. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, 42(1): 85-96, 2012.
- Hentze, M.W. et al. Two to Tango: regulation of mammalian iron metabolism. **Cell**, 142(1): 24-38, 2010.
- Hohaus, S. et al. Anemia in Hodgkin's lymphoma: The role of interleukin-6 and hepcidin. **Journal of Clinical Oncology**, 28(15): 2538-2543, 2010.
- Hunter, C.A., Jones, S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature Immunology**, 16(5): 448-457, 2015.
- Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed. Oxford: Academic Press, 2008. 932p.
- Kroot, J.J.C. et al. (Pre)analytical imprecision, between-subject variability, and daily variations in serum and urine hepcidin: Implications for clinical studies. **Analytical Biochemistry**, 389(2): 124-129, 2009.
- Nai, A. et al. Heparin levels predict Covid-19 severity and mortality in a cohort of hospitalized Italian patients. **American Journal of Hematology**, 96(1): E32-E35, 2021.
- Nikolic Nielsen, L.; Kjelgaard-Hansen, M.; Kristensen, A. T. Monocyte chemotactic protein-1 and other inflammatory parameters in Bernese Mountain dogs with disseminated histiocytic sarcoma. **Veterinary Journal**, 198,(2): 424-428, 2013.
- Pires, L.S.A. et al. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. **Ciência Rural**, 41(2): 272-277, 2011.
- Rajamanickam, K. et al. Serum hepcidin as a clinical prognostic marker to discriminate the outcome of canine babesiosis. **Indian Journal of Animal Research**, 55(11): 1323-1329, 2021.
- Rau, S. et al. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Veterinary Clinical Pathology**, 36(3): 253-260, 2007.
- Ruchala, P.; Nemeth, E. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. **Trends in Pharmacological Sciences**, 35(3): 155-161, 2014.
- Schüttler, J.; Neumann, S. Interleukin-6 as a prognostic marker in dogs in an intensive care unit. **Veterinary Clinical Pathology**, 44 (2): 223-228, 2015.
- Vizi, Z. et al. Serum hepcidin measurements in healthy dogs using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Veterinary Clinical Pathology**, 49(2): 292-298, 2020.
- Zaritsky, J. et al. Heparin - A potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, 4(6): 1051-1056, 2009.