

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

Renata Bonamigo

**INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA EXAMES
LABORATORIAIS DE CÃES DA REGIÃO DE SANTA MARIA, RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL**

Santa Maria, RS
2022

Renata Bonamigo

**INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA EXAMES LABORATORIAIS DE
CÃES DA REGIÃO DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Krause.

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Bonamigo, Renata
INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA EXAMES LABORATORIAIS DE
CÃES DA REGIÃO DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL,
BRASIL. / Renata Bonamigo.- 2022.
44 p.; 30 cm

Orientador: Alexandre Krause
Coorientadora: Cinthia Melazzo de Andrade
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2022

1. Caninos 2. Hemograma 3. Bioquímica sérica 4. Exames
laboratoriais 5. Intervalos de referência I. Krause,
Alexandre II. Melazzo de Andrade, Cinthia III. Título.

Renata Bonamigo

**INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA EXAMES LABORATORIAIS DE
CÃES DA REGIÃO DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Aprovado em 18 de março de 2022.

Alexandre Krause, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Ânderson Oliveira Sobroza, Dr. (UFSM)

Stella de Faria Valle, Dra. (UFRGS)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família Raul, Rosa, Rosana e Raquel, amigos e colegas Nicolas, Milena, Francisca, Nathalia, Bernardo, Anne, Bruna, Jamile, Ana Martiele, Camila, Ana Luisa, Leonardo, Anita, Daniel, Charline e Hecson, ao orientador Professor Alexandre Krause, à professora Cinthia e à toda equipe Lacvet, além da Bia do SAVE, pelo apoio e contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço, também, ao apoio do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (Lacvet) e à CAPES pelo incentivo e fomento que possibilitaram a realização e conclusão deste trabalho.

RESUMO

INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA EXAMES LABORATORIAIS DE CÃES DA REGIÃO DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

AUTORA: Renata Bonamigo
ORIENTADOR: Alexandre Krause

Valores de referência para exames laboratoriais são aqueles considerados normais esperados em animais saudáveis, e que podem ser utilizados na interpretação de resultados de testes laboratoriais. Interpretar os resultados de exames laboratoriais utilizando intervalos de referência inadequados pode resultar em conclusões errôneas. Dessa forma, é desejável estabelecer intervalos de referência locais ou próprios para melhorar a interpretação e auxiliar na decisão clínica. O objetivo deste trabalho foi determinar os valores de referência para hemograma e analitos bioquímicos séricos compreendendo alanina aminotransferase, ureia, fosfatase alcalina (FA), proteína total, globulina, albumina e creatinina, para cães jovens e adultos, bem como para a concentração de creatinina de acordo com o porte. Também foi comparado os analitos estudados entre jovens e adultos e entre os portes para a concentração de creatinina. Foram revisados 994 prontuários de cães saudáveis atendidos no Hospital Veterinário Universitário para doação de sangue ou procedimento cirúrgico eletivo, correspondentes aos anos de 2015 a 2021 e, destes, selecionados 250. Os dados foram submetidos à análise estatística, os *outliers* foram removidos e os intervalos de referência calculados com intervalo de confiança de 90% (IC), por meio do programa Reference Value Advisor, de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (ASVCP). Para a comparação dos analitos entre jovens e adultos e concentração de creatinina entre os portes foram utilizados programas estatísticos específicos. Realizou-se também a comparação não estatística entre os resultados obtidos e os IRs propostos na literatura. Houve diferença significativa ($p > 0.05$) entre jovens e adultos para contagem de linfócitos e atividade da FA sérica, maiores em cães jovens; e concentração de globulinas, proteínas plasmáticas e séricas totais, maiores em adultos. A comparação entre os portes demonstrou que cães de pequeno porte apresentam concentrações inferiores de creatinina ($p > 0.05$) em relação aos portes médio e grande. O limite superior dos intervalos de referência para eosinófilos e FA foram considerados de relevância em comparação com o amplo intervalo para a espécie canina presente na literatura. Os achados encontrados podem ser atribuídos à maior estimulação antigênica e osteoblástica nos animais jovens, associados ao aumento de globulinas em animais adultos. A diferença de creatinina pode ser atribuída à menor massa muscular em cães pequenos. O aumento da contagem de eosinófilos foi atribuído à parasitose ou a características da população. Conclui-se que o número de linfócitos e atividade de FA foram maiores em cães jovens e a concentração de proteínas séricas, totais e globulinas foi superior em adultos; a concentração de creatinina foi inferior em animais de pequeno porte; a população estudada apresenta características próprias ainda não representadas em outros estudos, com maiores valores para eosinófilos e atividade FA na população de cães adultos e jovens saudáveis. Dessa forma, os IRs propostos neste estudo para a espécie canina de acordo com a idade e o porte, podem ser utilizados na rotina clínica e cirúrgica na região de Santa Maria - RS, Brasil.

Palavras-chave: Caninos. Hemograma. Bioquímica sérica. Exames laboratoriais. Intervalos de referência.

ABSTRACT

REFERENCE INTERVALS FOR LABORATORY TESTS OF DOGS IN THE SANTA MARIA REGION, RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL.

AUTHOR: Renata Bonamigo
ADVISOR: Alexandre Krause

Reference values for laboratory tests are those considered normal to be expected in healthy animals, and which can be used in the interpretation of laboratory test results. Interpreting laboratory test results using inappropriate reference ranges can result in misinterpretations. Therefore, it is desirable to establish local or specific reference intervals to improve interpretation and assist in clinical decisions. The aim of this study was to determine the reference values for complete blood count and serum biochemical analytes comprising alanine aminotransferase, urea, alkaline phosphatase (ALP), total protein, globulin, albumin and creatinine, for young and adult dogs, as well as for creatinine concentration according to the body size. It was also to compare the analytes studied between young people and adults and between sizes for creatinine concentration. A total of 994 medical records of healthy dogs treated at the University Veterinary Hospital for blood donation or elective surgical procedures were reviewed, corresponding to the years 2015 to 2021, and 250 of these were selected. Data were submitted to statistical analysis, outliers were excluded and reference intervals were calculated with a 90% confidence interval (CI), using the Reference Value Advisor program, which follows the guidelines recommendations of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP). For comparison of analytes between youth and adults and creatinine concentration between sizes, specific statistical programs were used. A non-statistical comparison was also performed between the results obtained and the RIs proposed in the literature. There was a significant difference ($p>0.05$) between juveniles and adults for lymphocyte counts and serum ALP activity, which were higher in young dogs; and concentration of globulins, plasma and total serum proteins, higher in adults. The analysis regarding the sizes showed that small dogs have lower concentrations of creatinine ($P>0.05$) in comparison to medium and large dogs. The upper limit of the reference ranges for eosinophils and ALP were considered of relevance compared to the wide range for the canine species reported in the literature. The findings found can be attributed to greater antigenic and osteoblastic stimulation in young animals, associated with an increase in globulins in adult animals. The creatinine difference can be attributed to lower muscle mass in small dogs. The increase in eosinophil counts was attributed to parasitosis or population characteristics. It is concluded that evaluating specific RIs according to age is necessary due to the higher number of lymphocytes and ALP activity in young dogs and higher concentration of serum proteins, total proteins and globulins in adults. Assessing the creatinine concentration according to the size is important due to the lower concentration of this analyte in small dogs. We concluded the lymphocytes number and ALP activity were higher in young dogs, and the total and globulin proteins serum concentrations were higher in adults; creatinine concentration was lower in small animals. Furthermore, the population studied has its own characteristics not yet represented in other studies, with higher values for eosinophils number and ALP activity in the population of healthy adult and young dogs. Thus, the RIs proposed in this study for the canine species according to age and size, can be used in clinical and surgical routine in the region of Santa Maria - RS, Brazil.

Keywords: Canines. Blood count. Serum biochemistry. Laboratory tests. Reference intervals.

LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
ASVCP	Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
DP	Desvio Padrão
DRC	Doença Renal Crônica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	Fosfatase Alcalina
HVU	Hospital Veterinário Universitário
IL	Interleucina
IR	Intervalos de Referência
IRIS	Sociedade Internacional de Interesse Renal
LacVet	Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias
PPT	Proteínas Plasmáticas Totais
PT	Proteínas Totais
SAVE	Serviço de Arquivamento Veterinário
SRD	Sem Raça Definida
RPM	Rotação por Minuto
RS	Rio Grande do Sul
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	.9
1.1	HEMOGRAMA	9
1.2	BIOQUÍMICA SÉRICA	10
1.3	ANIMAIS SAUDÁVEIS.....	13
1.4	INTERVALOS DE REFERÊNCIA.....	13
1.5	ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA SEGUNDO A SOCIEDADE AMERICANA DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA (ASVCP), (FRIEDRICHS et al., 2012), ADAPTADO E MODIFICADO.....	15
1.6	IMPORTÂNCIA DOS VALORES DE REFERÊNCIA E SUBGRUPOS	16
1.7	RELAÇÃO CREATININA E MASSA CORPORAL	18
2	MANUSCRITO.....	20
3	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 HEMOGRAMA

O hemograma é um teste laboratorial utilizado para quantificar e descrever a morfologia dos constituintes celulares do sangue e, também, quantificar substâncias presentes no plasma (WEISS; TVEDTEN, 2012). Os componentes celulares que compõem o sangue são os eritrócitos, plaquetas e leucócitos. O plasma, por sua vez, é constituído por água, proteínas plasmáticas, sais inorgânicos, lipídios, carboidratos, vitaminas e hormônios (HARVEY, 2012a).

A função dos eritrócitos é transportar a hemoglobina que leva oxigênio para os tecidos do organismo (THRALL, 2015a), transportar CO₂ para os pulmões e tamponamento com íons de hidrogênio (HARVEY, 2012b). Alterações laboratoriais como a redução nos valores do hematócrito, na contagem total de eritrócitos e na concentração de hemoglobina podem indicar anemia (TVEDTEN, 2010). Causas de anemia incluem perda sanguínea, produção eritrocitária diminuída ou hemólise (STOCKHAM; SCOTT 2008a). O aumento na concentração de eritrócitos no sangue, denominado de eritrocitose, pode ocorrer em consequência da redução do volume plasmático, redistribuição de eritrócitos, contração esplênica, aumento na produção de eritropoietina ou por distúrbio mieloproliferativo (THRALL, 2015b).

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos, presentes na medula óssea, que circulam no sangue de cães por aproximadamente 5 dias (TVEDTEN, 2012). Frente à lesão da parede vascular ou exposição a material estranho, as plaquetas sofrem processo de adesão, alteração de forma, secreção e agregação auxiliando e participando na promoção da hemostasia. A redução numérica das plaquetas (trombocitopenia) pode resultar em distúrbios hemorrágicos. As trombocitopenias podem ocorrer por consequência da diminuição ou ausência de produção como na hipoplasia ou aplasia medular ou pelo aumento na destruição, como o que ocorre nas doenças imunomediadas primárias ou secundárias. A trombocitopenia pode estar relacionada também ao consumo exacerbado de plaquetas resultante, por exemplo, da coagulação intravascular disseminada (CID) entre outras causas. Além disso, pode ocorrer também disfunção plaquetária,

quando sua contagem é apropriada, mas a promoção da hemostasia é inadequada (HARVEY, 2012c), denominada de trombocitopatia.

Os leucócitos são células que geralmente participam da resposta inflamatória e são classificados como polimorfonucleares ou também chamados granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e leucócitos mononucleares que são compostos pelos linfócitos e monócitos (HARVEY, 2012d). O conjunto de dados numéricos e anormalidades morfológicas compõem o leucograma (WEISER, 2015). Os padrões de leucograma apresentam-se de diferentes maneiras, a incluir o padrão inflamatório agudo ou crônico e leucocitose por esteroide e fisiológica (STOCKHAM; SCOTT 2008b). Pode-se dizer que o resultado de um leucograma anormal auxilia ou, até mesmo, proporciona a identificação de processos patológicos (WEISER, 2015)

Como pode-se observar, a realização do hemograma permite obter informações do estado geral do paciente; é possível avaliar pacientes sem sinais clínicos de doenças, auxiliar e confirmar diagnóstico de condições específicas, além de servir na rotina como teste pré-cirúrgico (HARVEY, 2012e).

1.2 BIOQUÍMICA SÉRICA

Análises bioquímicas podem ser realizadas para avaliação da concentração de diferentes analitos séricos/plasmáticos e atividade de enzimas. As amostras utilizadas, de maneira geral, são o plasma ou soro. Ambos são compostos por albumina e globulinas, entre outros analitos, porém o soro não contém fibrinogênio, utilizado durante o processo de coagulação (ALLISON, 2015a). A concentração de proteínas totais séricas pode ser usada para determinar/calcular o teor de proteínas de diferentes frações. A albumina é a mais abundante, responsável por 75% da pressão oncótica e importante proteína de transporte, carreadora de ácidos graxos, ácidos biliares, bilirrubina, hormônios e medicamentos (ALLISON, 2015a). A albumina é produzida no fígado (ALLISON, 2015a) e a sua secreção é estimulada por queda na pressão osmótica ou reduzida durante processos inflamatórios ou doenças infecciosas pelo efeito de interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (ECKERSALL, 2008). Aumentos nos valores de albumina sérica podem ocorrer por consequência de desidratação. Já quadros de hipoalbuminemia podem ocorrer por diminuição na produção por insuficiência

hepática crônica, consumo, ou devido à absorção inadequada de proteínas; por sequestro nos casos de efusões cavitárias ou vasculopatias; ou por perdas em consequência de nefropatias por doença glomerular, enteropatias, lesões cutâneas, hemorragias ou hemodiluição (JOHNSON, 2012).

A concentração de globulinas pode ser estimada pelo cálculo da diferença entre a concentração das proteínas totais séricas e da albumina (ECKERSALL, 2008). As globulinas são constituídas por diferentes tipos de proteínas incluindo as imunoglobulinas, fatores de coagulação, enzimas, proteínas do sistema complemento, proteínas transportadoras de lipídios, hormônios e vitaminas, hemoglobina extracelular e íons metálicos (ALLISON, 2015a).

As proteínas plasmáticas são sintetizadas pelos hepatócitos, com exceção das imunoglobulinas, as quais são produzidas pelos linfócitos B presentes no baço, linfonodos ou medula óssea e fazem parte dos mecanismos de defesa do organismo frente a patógenos (ECKERSALL, 2008). As causas de redução na quantidade de globulinas podem ser atribuídas a imunodeficiências congênitas ou adquiridas. A hiperglobulinemia pode ocorrer por desidratação ou em consequência de processos inflamatórios devido ao aumento de proteínas de fase aguda positivas, aumento de imunoglobulinas por estimulação antigênica em processos inflamatórios crônicos ou por consequência de distúrbios linfoproliferativos (JOHNSON, 2012).

A mensuração dos valores séricos de analitos como ureia, também chamada de nitrogênio ureico, e creatinina é realizada com frequência para a avaliação da função renal. A creatinina é produto da decomposição de fosfocreatina e da creatina muscular e excretada pelos rins (MEUTEN, 2015). A utilização da mensuração de creatinina sérica em jejum associado a parâmetros clínicos é utilizada pela IRIS (International Renal Interest Society) para realizar a classificação de lesão renal aguda em cães e gatos (IRIS, 2022a), ou também para avaliação da doença renal crônica associada a outros testes (IRIS, 2022b). A concentração de creatinina plasmática ou sérica pode auxiliar na detecção e avaliação de danos renais, de modo que, quando a concentração aumenta duas vezes, indica-se perda funcional de 50% da massa renal. Em contrapartida, a redução de 50% da concentração de creatinina e ureia pode indicar que 50% dos néfrons recuperaram a função após dano (MEUTEN, 2015). Reduções na concentração de creatinina sérica podem ocorrer em cães com redução na massa corporal magra (HALL et al., 2015).

A creatinina é melhor indicador da redução da taxa de filtração glomerular em comparação a ureia pela sua excreção ocorrer de maneira constante e não ser reabsorvida pelos túbulos renais ao contrário da ureia que também pode sofrer influência da função hepática (STOCKHAM; SCOTT, 2008c).

A ureia é produzida no fígado a partir de amônia e do bicarbonato (MEUTEN, 2015). Aumentos na concentração sérica de ureia e de creatinina podem ocorrer por causas pré-renais (hipovolemia e diminuição do débito cardíaco), renais (glomerulonefrites, pielonefrites, nefrite tubular intersticial, amiloidose, nefrose tóxica, isquemia renal ou hipóxia, neoplasias e hidronefrose), e pós renais (obstrução do trato urinário ou extravasamento de urina para cavidade abdominal) (STOCKHAM; SCOTT, 2008c). A redução na concentração sérica de ureia pode ser resultante de insuficiência hepática, *shunt* portossistêmico, consumo inadequado de proteínas, poliúria e polidipsia, sendo a concentração reduzida de ureia indicativa para realização de testes de função hepática (BARSANTI, 2012).

A atividade sérica das enzimas Alanina aminotransferase (ALT) e Fosfatase alcalina (FA), é comumente solicitada para avaliar danos ou distúrbios hepatobiliares em pequenos animais. A ALT é uma enzima de extravasamento, presente no citoplasma de hepatócitos, reconhecida como um marcador de lesão hepatocelular, de modo que aumentos de sua atividade sérica podem ser considerados, relativamente, específicos para lesões hepatocelulares em cães e gatos (HOFFMANN; SOLTER, 2008). A redução da sua atividade sérica não apresenta significância. Ao contrário, o aumento da sua atividade é causado, principalmente, por dano hepatocelular e, nestes casos, espera-se aumento de três vezes ou mais que os valores normais. Como principais causas pode-se citar as doenças hepatobiliares (colangite, colangiohepatite, cirrose, doença do armazenamento do cobre, neoplasias hepáticas, hepatite crônica, pancreatite, traumas e toxinas), e por hipóxia devido à anemia ou causa iatrogênica. Espera-se aumentos brandos na sua atividade sérica em casos de hemólise ou danos ao músculo estriado, pois também está presente em eritrócitos e nas células musculares (WILLARD; TWEDTEN, 2012).

A FA é uma enzima de indução presente nas membranas celulares de diversos órgãos, incluindo o fígado, ossos, rins, intestino, pâncreas e na placenta (ALLISON, 2015b). É utilizada para avaliar colestase hepática, e o aumento de sua atividade ocorre na colangiohepatite, hepatite crônica, cirrose, neoplasias hepáticas

ou por agentes hepatotóxicos. Entretanto, aumentos na atividade desta enzima não estão relacionados somente a causas hepáticas, e ocorrem na administração de corticosteroides, estresse e hiperadrenocorticismo em cães, assim como atividade osteoblástica em animais em crescimento, osteomielite, fraturas ósseas e diabetes *mellitus*. A diminuição na sua atividade sérica não apresenta relevância clínica (WILLARD; TWEDTEN, 2012).

1.3 ANIMAIS SAUDÁVEIS

Os valores de referência são estabelecidos em uma população saudável de indivíduos selecionados. Todavia, na medicina veterinária, a definição de saúde é complexa, pois não há consenso aceito sobre esse assunto. Para animais é impossível definir critérios objetivos para caracterizar "completo bem-estar físico, mental e social" conforme a definição utilizada para humanos (GEFFRÉ et al., 2009).

A interpretação de saúde em animais é geralmente baseada em um exame físico onde se constata a ausência de sinais clínicos óbvios de doença, geralmente acompanhada por resultados de testes laboratoriais (hemograma completo, bioquímica sérica e análise de urina) em intervalos convencionais (ARCHER, 2010).

1.4 INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Os intervalos de referência são considerados valores normais esperados em animais saudáveis e utilizados na interpretação de resultados de exames laboratoriais. A diferença entre o menor e o maior valor normal é chamado de intervalo de referência (IR). Os valores de referência podem ser definidos como o intervalo que engloba os valores médios de 95% de determinada população de animais sadios (WEISER; ALLISON, 2015). O conceito de valores de referência baseados na população foi relatado pela primeira vez em 1969 para descrever a variação nas concentrações de analitos no sangue em grupos bem caracterizados de indivíduos saudáveis (GRASBECK; SARIS, 1969). Na medicina veterinária, Lumsden e Mullen (1978) iniciaram a aplicação desse conceito para animais e, atualmente, existem vários estudos que determinaram os valores de referência para

caninos (DUNLOP et al., 2010; NIELSEN et al., 2010; BRENTEN et al., 2016; CHANG et al., 2016; ABINAYA et al., 2018; CONNOLLY et al., 2020).

As recomendações internacionais estabelecem como método preferido, a determinação não paramétrica *a priori* de, pelo menos, 120 indivíduos de referência. As etapas mais críticas são a seleção de indivíduos, com base em critérios de inclusão e exclusão, e o uso de procedimentos analíticos de qualidade controlada. Embora não seja o ideal, na medicina veterinária pode haver situações em que menos de 40 amostras de referência sejam utilizadas e consideradas satisfatórias se métodos adequados forem empregados. Todavia, os valores de referência de menos de 10 indivíduos não devem ser considerados porque o tamanho amostral é pouco representativo da distribuição de uma variável dentro de uma população (FRIEDRICHS et al., 2020).

Os indivíduos de referência podem ser selecionados por métodos diretos ou indiretos. Os métodos diretos envolvem a seleção de indivíduos saudáveis, selecionados em uma população por meio de critérios específicos. Os métodos de amostragem indireta usam bancos de dados que contém resultados de indivíduos saudáveis e não saudáveis. Dentro dos métodos diretos, pode haver a seleção *a priori*, na qual os critérios de inclusão e exclusão são estabelecidos antes da seleção, sendo este o método preferido. A seleção *a posteriori* é aquela em que os critérios de inclusão e exclusão são estabelecidos após seleção de indivíduos saudáveis (FRIEDRICHS et al., 2020).

Para cada teste de laboratório, é necessário ter um IR validado (ARCHER, 2010) e para avançar a ciência da determinação de intervalos de referência em patologia clínica veterinária é preciso usar termos corretos e de acordo com definições estabelecidas (*guidelines*). Precisa-se, também, entender a importância, além de implementar as recomendações, da seleção de métodos de qualidade além da coleta do maior número possível de amostras de referência, a partir de critérios bem definidos, para determinar intervalos de referência precisos (GEFFRÉ et al., 2009).

1.5 ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA SEGUNDO A SOCIEDADE AMERICANA DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA (ASVCP) (FRIEDRICHS et al., 2012) - ADAPTADO E MODIFICADO

De modo geral, as etapas do procedimento para determinação de novos valores de referência para uma população, são:

a) Realização de revisão bibliográfica/ investigação preliminar dos analitos a serem utilizados.

b) Definição da população de referência, estabelecimento de critérios de seleção, inclusão e exclusão, com a idade biológica, sexo, exame clínico completo, medicação de uso contínuo, situação vacinal, localização geográfica ou local de residência, exames complementares (hemograma e bioquímicos de rotina).

c) Preenchimento de questionário pelo clínico examinador/ tutor para determinar se o indivíduo de referência se encaixa nos critérios de seleção.

d) Determinação do número de indivíduos de referência disponíveis ou o número necessário para estabelecer intervalos de referência, preferencialmente de, no mínimo, 120 animais hígidos.

e) Seleção de indivíduos considerados saudáveis, preferencialmente por critérios específicos (métodos diretos).

f) Coleta e manipulação das amostras de referência de maneira padronizada (local de coleta, tubos utilizados, conservação das amostras etc.).

g) Análise das amostras de referência pelo uso de métodos bem controlados (analisador, calibração, qualidade das amostras etc.).

h) Preparação do histograma.

i) Identificação de *outliers* e exclusão de valores discrepantes. Métodos estatísticos podem ser usados para detecção destes valores como o de Dixon (1953) e o algoritmo de Horn (HORN; PESCE, 2005). Quando utilizados métodos não paramétricos os *outliers* têm menos efeito sobre o intervalo de referência se comparados a outros métodos (HOROWITZ et al., 2008).

j) Determinação da distribuição dos dados de referência (gaussianos ou não gaussianos), sendo que os métodos não paramétricos não requerem nenhuma distribuição particular.

k) Definição dos limites de referência superior e inferior usando um método estatístico apropriado, sendo o método não paramétrico preferencial para amostragens maiores que 120 valores de referência. Definição dos intervalos de confiança para os limites de referência superior e inferior.

l) Determinação da necessidade de estratificar, quando houver um número suficiente de amostras de referência (no mínimo 40 indivíduos) ou evidências de importância clínica. Para tanto, são relatados métodos estatísticos a serem considerados para determinar a necessidade de formação de subgrupos. Há também critérios não estatísticos que favorecem o fracionamento, como aqueles citados na literatura que indiquem diferenças clínicas importantes entre subgrupos (raças e idade, por exemplo).

m) Documentação de todas as etapas realizadas para obtenção de novos valores de referência para uma população.

1.6 IMPORTÂNCIA DOS VALORES DE REFERÊNCIA E SUBGRUPOS

Testes hematológicos e bioquímicos são usados como ferramentas de auxílio ao diagnóstico e de monitoramento (WALTON, 2012). Por meio deles, é possível interpretar o estado de saúde em animais e auxiliar no diagnóstico diferencial de doenças (ARCHER, 2010). Dessa forma, os valores de referência tornaram-se uma ferramenta na medicina laboratorial para ajudar no processo de tomada de decisões clínicas (GEFFRÉ et al., 2009).

A interpretação de valores utilizando intervalos de referência inadequados pode resultar em classificações incorretas de dados e possíveis diagnósticos/tratamentos impróprios. É desejável, dessa forma, estabelecer intervalos de referência locais ou próprios para melhorar a interpretação e decisão clínica (CHUNG et al., 2016).

Para seres humanos a individualidade é considerada para estratificação dos valores de referência. A individualidade proporciona melhor uso de valores de referência específicos para o indivíduo, podendo ser muito vantajosa (FRASER, 2004). Na medicina veterinária, para alguns analitos bioquímicos e variáveis hemostáticas, os valores de referência com base na população são menos sensíveis do que os valores de referência com base no indivíduo para detectar mudanças

patológicas em um indivíduo (WALTON, 2012). Estratégias para valores de referência com base no sujeito ou personalização de intervalos de referência para analitos bioquímicos séricos têm sido sugeridos na medicina humana, levando em consideração a idade, sexo e etnia (ICHIHARA et al., 2008; ROMÁN et al., 2012).

Estratificar a população de estudo de cães saudáveis de acordo com a raça, idade e outros critérios pode ser vantajosa, pois variações nos valores de referência em indivíduos considerados saudáveis podem ocorrer. Diferenças significativas em sete analitos bioquímicos hematológicos e séricos foram detectados em cães da raça boiadeiro de Berna, nos quais uma variação específica da raça parece ser a explicação mais plausível. Dessa forma, IRs específicos poderiam evitar interpretações errôneas dos resultados laboratoriais no processo de diagnóstico (NIELSEN et al., 2010).

Chang e colaboradores (2016) encontraram variações em variáveis bioquímicas séricas relacionados a raça, idade, sexo e estado de castração para cães domésticos. Variações associadas à idade e à raça em variáveis hematológicas e bioquímicas em Labradores jovens e cães Schnauzer miniatura também foram relatadas (BRENTEN et al., 2016). O efeito do envelhecimento de cães foi de aumento nas concentrações de proteína sérica total e de diminuição da concentração de albumina de maneira gradual (ABINAYA et al., 2018). O envelhecimento também causou alterações em cães de trenó, que foram interpretadas como indicativo de inflamação crônica (CONNOLLY et al., 2020), e há evidências para deficiência de ferro em cães saudáveis mais velhos, potencialmente devido a problemas de hemorragias gastrointestinais e inflamação (RADAKOVICH et al., 2017). Para cães da raça Galgo, os intervalos de referência de proteína total, albumina, globulina e creatinina diferiram dos intervalos de referência genéricos usados para cães (DUNLOP et al., 2010). Nesta raça também se percebeu maior massa de eritrócitos, contagem de leucócitos mais baixas, de neutrófilos e contagem plaquetária (ZALDÍVAR-LÓPEZ et al., 2011). Porém, variáveis como o sexo não interferiram (DUNLOP et al., 2010).

A maioria das diferenças relacionadas ao sexo também foram pouco significantes (<5%) para análises bioquímicas e hematológicas em cães de trenó. Contudo, as fêmeas apresentavam concentrações mais baixas de ureia e creatinina, menor atividade sérica de ALT e maior concentração sérica total de bilirrubina e

contagem plaquetária mais elevada (CONNOLLY et al., 2020). O sexo pode ser considerado uma variável de confusão potencial e as diferenças encontradas de significância fisiológica questionável (LAWRENCE et al., 2013), de modo que particionar a população entre machos e fêmeas não fornece evidências de sua necessidade (DUNLOP et al, 2010, NIELSEN et al., 2010). Dessa forma, o efeito do sexo na rotina hematológica de cães e nos resultados da bioquímica sérica permanece ambíguo (NIELSEN et al., 2010).

1.7 RELAÇÃO CREATININA E MASSA CORPORAL

A creatinina apresenta estrutura molecular em anel e provém da conversão de creatina e fosfato de creatina nos músculos. Caso a creatinina não seja excretada em quantidade adequada, haverá aumento das concentrações plasmáticas e seu aumento pode significar diminuição da taxa de filtração glomerular, que ocorre quando aproximadamente 75% dos néfrons encontram-se afuncionais. A mensuração plasmática ou sérica de creatinina é usada como indicador de funcionamento renal (MEUTEN, 2015).

As concentrações de creatinina podem sofrer interferências não relacionadas apenas a falhas da função renal. Em cães da raça Galgo, a maior massa muscular resultou em diferenças significativas para creatinina em relação a outras raças (DUNLOP et al., 2010). Diferenças absolutas para a creatinina sérica foram notáveis em diferentes raças de cães e garantiam intervalos de referência específicos da raça ajustados para idade, sexo e condição de castração (CHANG et al., 2016). Reduções na concentração de creatinina sérica em cães com redução na massa corporal magra também foram encontradas, limitando a utilidade do uso de creatinina sérica como biomarcador para monitorar a função renal em cães com massa magra diminuída (HALL et al., 2015).

Dorst e colaboradores (2006) determinaram que o aumento das concentrações de creatinina não era devido à taxa de filtração glomerular reduzida para cães da raça Galgo, mas levantou a hipótese de que isso provavelmente reflete o aumento da massa muscular em comparação com outras raças. Dessa forma, intervalos de referência de creatinina devem ser reavaliados de acordo com a raça ou massa muscular dos cães (MEDAILLE et al., 2004). A diminuição da massa

muscular magra presente em cães idosos também pode mascarar um aumento da creatinina (RADAKOVICH et al., 2017), o que dificulta a interpretação da sua concentração de modo isolado em cães mais velhos.

Na rotina do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Maria, os valores de referência utilizados para hemograma e bioquímica sérica para cães e gatos domésticos, são aqueles descritos na literatura internacional. Devido à importância dos valores de hemograma e bioquímica sérica no auxílio para o diagnóstico e, também, monitoramento de pacientes, é fundamental o estabelecimento de valores de referência próprios do laboratório, para animais da nossa região. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar o intervalo de referência para exames laboratoriais de analitos séricos utilizados na rotina clínica e cirúrgica, para espécie canina, atendida em um Hospital Veterinário, localizado na região central do estado do Rio Grande do Sul.

2 MANUSCRITO

Os resultados deste trabalho encontram-se na forma de manuscrito que foi submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira. As normas da revista podem ser conferidas no site: <http://www.pvb.com.br/portal/normas>.

Intervalos de referência para exames laboratoriais de cães da região de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Renata Bonamigo¹, Nathália V. Barbosa¹, Camila E. B. Melo¹, Nicolas J. Bernasconi¹, Ana M. Engelmann¹, Leonardo G. Santos¹, Cinthia M. Andrade¹ and Alexandre Krause^{1*}

ABSTRACT.- Bonamigo R., Barbosa N.V., Melo C.E.B., Lang F.B., Bernasconi N.J., Engelmann A.M., Santos L.G., Andrade C.M. & Krause A. 2022. **(Reference intervals for laboratory tests of dogs in the Santa Maria region, Rio Grande do Sul, Brazil)**. Pesquisa Veterinária Brasileira. Laboratório de Análise Clínicas Veterinária (Lacvet), Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 97, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: alexandrekrause@ufsm.br

Reference values are considered normal values used in the interpretation of laboratory test results. They encompass the mean values of 95% of individuals in a given healthy population and can be used as a diagnostic, monitoring and aiding tool in the clinical decision-making process. It is desirable to establish specific reference intervals for the places/laboratories of origin of the population to better represent it. The objective of this study was to determine the reference values for young animals (6 to 12 months) and adults (1 to 8 years) for complete blood count and serum biochemical variables (alanine aminotransferase, urea, alkaline phosphatase (ALP), total protein, globulin, albumin and creatinine), as well as for the creatinine concentration according to the small, medium and large size of healthy adult dogs. It was also possible to compare the results between young people and adults, and between body size for creatinine. Retrospectively, there were 994 forms of dogs that sought the University Veterinary Hospital for blood donation or elective surgical procedures, from 2015 to 2021, of which the years 2015 to 2021, of animals that responded to the inclusion processes (having history of inclusion procedure) and corresponding laboratory tests or prior to surgery data or being a blood donor). Data were selected for statistical bounds analysis, outliers were removed using the GraphPad Pris software and reference intervals were calculated with the minimum and half 90% confidence interval (CI), by the Reference Value Advisor program, which follows the American Society for Veterinary Clinical Pathology guidelines for determining reference ranges. For comparison of analytes between the independent variables t test was used. Comparison of creatinine concentration between sizes was determined from one-way analysis of variance followed by the Newman-Keuls post-hoc test. A non-statistical comparison was also performed between the results obtained and the proposed RIs with those in the literature. There was a significant difference ($p>0.05$) between age groups for lymphocyte count and serum AF activity, higher in young dogs, and concentration of globulins, plasma and total serum proteins, higher in adults. The comparison between the sizes showed that small dogs have lower concentrations of creatinine ($P>0.05$) in relation to medium and large dogs. The upper limit of the reference ranges for eosinophils and ALP were considered of relevance compared to the wide range for the canine species reported in the literature. The findings found in this study can be attributed to greater antigenic and osteoblastic stimulation in young animals, associated with an increase in globulins in adult animals. The creatinine difference can be attributed to lower muscle mass in small dogs. The increase in eosinophil counts was attributed to parasitosis or population characteristics. It is concluded that evaluating specific RIs according to age is important due to the higher number of lymphocytes and ALP activity in young dogs and higher concentration of serum proteins, total protein and globulins in adults. Assessing the creatinine concentration according to the size is important due to the lower concentration in small dogs. In addition, we conclude that the population studied has its own characteristics not yet represented in other studies, with higher values for eosinophils and ALP activity in the population of healthy adult and young dogs. Thus, the RIs proposed in this study for the canine species according to age and size, can be used in clinical and surgical routine in the region of Santa Maria - RS, Brazil.

INDEX TERMS: Reference intervals, laboratory tests, canine, creatinine, age group, hematology, serum biochemistry, reference values, Brazil.

¹Laboratório de Análise Clínicas Veterinária (Lacvet), Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 97, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. *Corresponding author: alexandrekrause@ufsm.br

RESUMO - (Intervalos de referência para exames laboratoriais de cães da região de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.) Os valores de referência são considerados valores normais utilizados na interpretação dos resultados de testes laboratoriais. Eles englobam os valores médios de 95% dos indivíduos em uma determinada população saudável e podem ser utilizados como ferramenta diagnóstica, de monitoração e de auxílio no processo de tomada de decisões clínicas. É desejável estabelecer intervalos de referência específicos dos locais/laboratórios de origem da população para melhor representá-la. O objetivo deste trabalho foi determinar os valores de referência para animais jovens (6 a 12 meses) e adultos (1 a 8 anos) para hemograma completo e variáveis bioquímicas séricas (alanina aminotransferase, ureia, fosfatase alcalina, proteína total, globulina, albumina e creatinina), bem como para a concentração de creatinina de acordo com o porte pequeno, médio e grande de cães adultos saudáveis. Também foi realizar a comparação dos resultados entre jovens e adultos; e entre os portes para creatinina. Retrospectivamente, foram revisados 994 formulários de cães que procuraram o Hospital Veterinário Universitário para doação de sangue ou procedimentos cirúrgicos eletivos, correspondentes aos anos de 2015 a 2021, dos quais 250 eram de animais que atenderam aos critérios de inclusão (possuir histórico de procedimento cirúrgico eletivo e exames laboratoriais correspondentes ou prévios a data da cirurgia ou ser doador de sangue). Os dados foram submetidos à análise estatística, os *outliers* foram removidos utilizando o software GraphPad Prism, e os intervalos de referência foram calculados com limites mínimo e máximo, intervalo de confiança de 90% (IC), por meio do programa Reference Value Advisor, o qual segue as recomendações da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária para determinação de intervalos de referência. Para a comparação dos analitos entre as idades foi utilizado teste T de variáveis independentes. A comparação da concentração de creatinina entre os portes foi determinada a partir da análise de variância de uma via seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Realizou-se também a comparação não estatística entre os resultados obtidos e os IRs propostos com os da literatura. Houve diferença significativa ($P > 0.05$) entre as faixas etárias para contagem de linfócitos e atividade da FA sérica, maiores em cães jovens; e concentração de globulinas, proteínas plasmáticas e séricas totais, maiores em adultos. A comparação entre os portes demonstrou que cães de pequeno porte apresentam concentrações inferiores de creatinina ($P > 0.05$) em relação aos portes médio e grande. O limite superior dos intervalos de referência para eosinófilos e FA foram considerados de relevância em comparação com o amplo intervalo para a espécie canina presente na literatura. Os achados encontrados neste estudo podem ser atribuídos à maior estimulação antigênica e osteoblástica nos animais jovens, associados ao aumento de globulinas em animais adultos. A diferença de creatinina pode ser atribuída à menor massa muscular em cães pequenos. O aumento da contagem de eosinófilos foi atribuído à parasitose ou a características da população. Conclui-se que avaliar IRs específicos de acordo com a idade é importante devido ao maior número de linfócitos e atividade de FA em cães jovens e maior concentração de proteínas séricas, totais e globulinas em adultos. Avaliar a concentração de creatinina de acordo com o porte é importante devido a menor concentração em cães de pequeno porte. Também se conclui que população estuda apresenta características próprias ainda não representada em outros estudos, com maiores valores para eosinófilos e atividade FA na população de cães adultos e jovens saudáveis. Dessa forma, os IRs proposto neste estudo para a espécie canina de acordo com a idade e o porte, podem ser utilizados na rotina clínica e cirúrgica na região de Santa Maria - RS, Brasil.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Intervalos de referência, exames laboratoriais, canino, creatinina, faixa etária, hematologia, bioquímica sérica, valores de referência, Brasil.

INTRODUÇÃO

Os valores de referência são estabelecidos em uma população saudável de indivíduos selecionados (Geffré et al. 2009). Geralmente, a interpretação do estado de saúde dos animais é baseada nos sinais clínicos, exame físico realizado pelo médico veterinário e por testes laboratoriais (Archer 2010). Os intervalos de referência são considerados valores de normalidade esperados em uma população de animais saudáveis e compreendem a diferença entre o menor e o maior valor normal dos números médios de 95% de determinada população de animais sadios (Friedrichs et al. 2012, Weiser & Allison 2015). Testes hematológicos e bioquímicos são usados como ferramentas para avaliar o estado de saúde dos animais, auxiliar no diagnóstico diferencial de doenças (Archer 2010) e no processo de tomada de decisões clínicas e cirúrgicas (Geffré et al. 2009).

Estabelecer intervalos de referência (IR) em uma população saudável é difícil, devido ao conceito de saúde em animais não ser definido (Geffré et al. 2009). Uma população bem caracterizada, baseada em critérios de idade, sexo, raça, estado nutricional e dieta é ideal, pela interferência de fatores biológicos nos analitos (Geffré et al. 2009). Definir IR para a população canina da região de Santa Maria-Rio Grande do Sul (RS), Brazil, pode ser vantajoso, por contemplar interferências biológicas ainda não representadas em

outros estudos de IR. O uso de pacientes provenientes de uma mesma região (Miglio et al. 2020), mesma sazonalidade (Mohammed et al. 2017), com amostras processadas no mesmo laboratório com a mesma metodologia analítica (Miglio et al. 2020) em condições de moradia e dietas variadas, promoveria uma boa representação da população estudada (Dunlop et al. 2010).

Agrupar de acordo com porte/peso também é um critério para melhor representar a população para alguns analitos, como a creatinina, uma vez que suas concentrações séricas podem sofrer interferências não relacionadas apenas a alterações da função renal, mas também devido à massa muscular aumentada (Dorst et al. 2006, Dunlop et al. 2010) ou reduzida (Hall et al. 2015). Além disso, deve-se levar em consideração as variações associadas à idade ou à raça (Brenten et al. 2016, Abinaya et al. 2018, Connolly et al. 2020). Em suma, é desejável estabelecer valores próprios dos locais de origem da população para melhor interpretar dados e realizar decisões clínicas acertadas (Chung et al. 2016).

Trabalhos para determinar novos IR em caninos estão disponíveis (Dunlop et al. 2010, Nielsen et al. 2010, Brenten et al. 2016, Chang et al. 2016, Abinaya et al. 2018, Connolly et al. 2020). Seguir as recomendações de guidelines é necessário para garantir resultados confiáveis (Friedrichs et al. 2012). O método preferido é o não paramétrico com, no mínimo, 120 indivíduos de referência. O uso de métodos paramétricos é aceitável quando ≥ 40 e ≤ 120 amostras de referência estão disponíveis, e os limites de referência superior e inferior são estabelecidos através do cálculo: média somada a dois desvio-padrão (+2DP) e média subtraída a dois desvios-padrão (-2DP). Quando o número de amostras disponíveis for ≥ 20 e < 40 , métodos paramétricos também podem ser utilizados (Friedrichs et al. 2012). A seleção de indivíduos de referência pode ser realizada por meio de métodos diretos ou indiretos. Nos métodos diretos, realiza-se a seleção a priori ou a posteriori nos quais critérios de inclusão e exclusão são estabelecidos antes ou após a seleção de indivíduos saudáveis, respectivamente (Friedrichs et al. 2012).

Para cada teste laboratorial é necessário ter um intervalo de referência validado (Archer 2010). Para determinar intervalos de referência em patologia clínica veterinária é preciso usar termos corretos, de acordo com definições estabelecidas, selecionar métodos de qualidade e coletar o maior número possível de amostras de referência, a partir de critérios definidos (Geffré et al. 2009). Além disso, julgar os resultados de acordo com IR conhecidos para espécie canina, excluir pacientes com alterações biológicas significativas com prévia análise dos dados, pode ser empregado para melhor representar a população hígida (Radakovich et al. 2017).

Dessa forma, o objetivo do estudo foi determinar IR de caninos jovens e adultos para os valores de hemograma e de análises bioquímicas séricas de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina, proteína plasmática total (PPT), proteínas séricas totais (PT), albumina, globulina e relação albumina/globulina, na população atendida no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HVU-UFSM) e determinar a relação da concentração de creatinina sérica de acordo com o porte do animal, pequeno, médio e grande, para a mesma população.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo retrospectivo, por método de amostragem direta, *a posteriori*, foram avaliados exames de maior rotina do HVU-UFSM, que compreendem hemograma e/ou bioquímicos (alanina aminotransferase, ureia, fosfatase alcalina, proteína total, globulina, albumina e creatinina), de caninos hígidos, atendidos entre janeiro de 2015 a maio de 2021. O histórico de procedimentos cirúrgicos eletivos, doação de sangue ou exames de *check-up* foram selecionados por considerar os animais saudáveis pelos médicos veterinários no momento da avaliação. A investigação dos dados ocorreu mediante a análise do caderno de registro e controle de procedimentos cirúrgicos do bloco de experimentação animal do HVU-UFSM, e por meio dos registros de caninos doadores de sangue e de exames de *check up* do HVU-UFSM.

Os prontuários clínicos com histórico de cada paciente selecionado por meio do registro (RG) foram obtidos no Serviço de Arquivo Veterinária (SAVE) do HVU-UFSM. Conferiu-se os dados de cada animal e, os que possuíam exames laboratoriais pré-cirúrgicos eletivos, ou controle de doadores de sangue, provenientes da região de Santa Maria-RS tiveram seus exames tabulados. Para os doadores de sangue que apresentavam mais de um exame laboratorial em momentos distintos, foram selecionados os exames com datas recentes e/ou com maior número de analitos avaliados de uma vez e/ou ausência de artefatos.

Pacientes que apresentaram histórico de uso recente de medicações, como contraceptivo hormonal, corticoides, anti-inflamatórios não esteroidais, anticonvulsivantes entre outros, exceto antihelmínticos; histórico de vacinação em menos de quatorze dias, idade inferior a seis meses, fêmeas em estro, lactantes ou gestantes, pacientes classificados com baixo escore de condição corporal ou com sobrepeso de acordo com o prontuário clínico, exames com alterações nas amostras (hemólise ou lipemia) foram excluídos, e um máximo de dez animais de mesma raça para adultos e cinco para jovens foram utilizados a fim de evitar possível efeito da raça nos resultados (Willems et al. 2016).

Os dados dos animais tabulados foram em primeiro momento, comparados com os IR amplos para a espécie utilizados no laboratório (Cornell University 2008, 2017), para identificar pacientes com valores discrepantes que, comparados aos demais, apresentassem alterações significativas, ou achados laboratoriais que indicassem possível doença subclínica, de modo que estes animais foram excluídos do estudo. Realizou-se a divisão entre grupos de cães jovens (6 a 12 meses) e adultos (1 – 8 anos) e entre os portes para cães adultos, seguindo a classificação proposta por Goldston & Hoskins (1999), de modo a considerar cães de pequeno porte os que apresentaram peso ≤ 9 kg; médio porte com peso entre 9,5 à 23 kg; grande porte com peso entre 23,5 à 40 kg; e porte gigante com peso > 40 kg.

Posteriormente, os dados foram submetidos à análise estatística de Shapiro-wilk para verificar a normalidade na sequência, os dados foram submetidos ao teste de ROUT para identificação de *outliers*, os quais foram removidos, para tais análises utilizou-se o software GraphPad Prism®. Os intervalos de referência foram calculados com limites mínimo e máximo, intervalo de confiança de 90% (IC), média, mediana e desvio padrão (DP), por meio do programa Reference Value Advisor, o qual segue as recomendações de *guidelines* para determinação de intervalos de referência (Geffré et al. 2011). Os IRs foram obtidos por meio de teste não paramétrico para amostras ≥ 40 e por métodos paramétricos e robustos de valores nativos e transformados de Box-Cox para amostras inferiores. Para a comparação dos analitos entre as idades foi utilizado teste T de variáveis independentes. A comparação da concentração de creatinina entre os portes foi determinada a partir da análise de variância de uma via seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Realizou-se também a comparação, não estatística, entre os resultados obtidos e os IRs propostos com os da literatura.

É importante ressaltar que o laboratório de análises clínicas Lacvet-UFSM, em que as amostras foram processadas, apresenta rotina acentuada, com aproximadamente 100 análises realizadas diariamente, seguindo controle de qualidade rigoroso dos equipamentos de hematologia e bioquímica, fazendo uso de amostras controle, calibração, manutenções preventivas e periódicas, fornecendo resultados confiáveis na rotina laboratorial de uma instituição de ensino.

As amostras de sangue costumam ser coletadas por venopunção da jugular ou cefálica nos ambulatórios do HVU-UFSM, e o sangue obtido passa a ser acondicionado em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e em tubos sem anticoagulante, encaminhados para o Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (Lacvet-HVU-UFSM), a seguir rotina laboratorial, processadas em no máximo 4 horas. Realiza-se o hemograma com as contagens celulares em aparelho automatizado por impedância do modelo BC-VET 2800 (Mindray®), seguido da avaliação dos esfregaços sanguíneos corados com corante tipo Romanowsky (Panótico Rápido - Laborclin®). Efetua-se o diferencial leucocitário pela contagem de 100 células nucleadas e avalia-se a morfologia de leucócitos, hemácias e plaquetas em microscópio óptico nas objetivas de 40x e 100x. Em paralelo, determina-se o hematócrito manual pelo método de microhematócrito, em centrífuga (Quimis®), 10.000 RPM, durante sete minutos, como método de conferência das contagens eritrocitárias. Realiza-se a avaliação bioquímica em analisador bioquímico automático BS-120 (Mindray®) com *kits* comerciais e metodologia cinética enzimática colorimétrica, conforme descrita pelos fabricantes.

Amostras com coágulos e/ou fibrina macroscópica são rejeitadas. A etapa de avaliação microscópica das lâminas e diferencial leucocitário realiza-se por patologistas clínicos treinados, e os resultados dos exames são liberados pelos médicos veterinários residentes e/ou alunos de pós-graduação os quais, em alguns casos, também realizaram residência em patologia clínica. Os laudos dos exames são anexados aos prontuários dos animais.

RESULTADOS

A partir da análise de 994 prontuários, 250 caninos foram enquadrados nos critérios de seleção, 478 prontuários apresentaram-se incompletos pela ausência de exames anexados e 266 animais foram excluídos por apresentar uso de fármacos, doenças, artefatos nas amostras, entre outras causas, que podem ser conferidas no Quadro 1. A relação dos valores considerados *outliers* detectados pela avaliação estatística e que foram excluídos do estudo correspondeu, para cães adultos: FA (nº 14), eosinófilos (nº 12), ALT (nº 9), albumina (nº 7), PT (nº 4), plaquetas (nº 3), monócitos (nº 3), neutrófilos (nº 2), linfócitos (nº 2) e ureia (nº 1). Para os demais analitos e para cães jovens, não foram detectados *outliers*.

Verificou-se que a maioria dos animais residia em área urbana, com contato com outros cães e gatos e o modo de criação era variado (pátio, com ou sem acesso à rua, apartamento, com acesso à rua, níveis diferentes de exercício físico, etc). A alimentação consistia, em sua maioria, de ração associada à alimentação caseira, o estado de imunização não estava atualizado, assim como o de everminação. Os animais jovens, com idades de seis meses a doze meses, compreenderam 54 indivíduos; e os cães adultos, com um a oito anos, perfizeram 196 animais. A maioria destes eram fêmeas, inteiras, SRD, provenientes

da cidade de Santa Maria –RS, e que foram submetidas a cirurgia eletiva de ovário-histerectomia (OVH). A caracterização da população pode ser conferida na Figura 1 à Figura 9.

Os IRs propostos neste estudo para variáveis do hemograma e bioquímica sérica podem ser conferidos no Quadro 2 para animais jovens e no Quadro 3 para adultos, contemplando também o intervalo de confiança (IC) de 90%, valor máximo e mínimo, média, desvio-padrão e mediana. Na comparação entre as idades, caninos jovens apresentaram contagem total de linfócitos ($/\mu\text{L}$) e a atividade da FA (UI/L) maiores em relação aos adultos ($p>0.05$). Os cães adultos apresentaram concentrações maiores ($p>0.05$) para PPT (g/dL), PT (g/dL) (Fig. 10) e globulinas (g/dL) (Fig. 11).

Na avaliação da concentração de creatinina em caninos de diferentes portes, foram considerados os portes pequeno, médio e grande para a comparação entre os grupos. Prontuários incompletos ou de animais de porte gigante não foram utilizados (Fig. 12). Foram observados valores inferiores em animais de pequeno porte em comparação aos animais de portes médio e grande ($p>0.05$) (Fig. 13). Os caninos de porte pequeno apresentaram IR para creatinina 0,5-1,3mg/dL; porte médio 0,7-1,4mg/dL e porte grande 0,8-1,3mg/dL.

Na comparação não estatística entre os IRs propostos e os presentes na literatura, pode-se observar IR superior para eosinófilos e atividade da FA relativamente importantes, por ser encontrado na população jovem e adulta.

DISCUSSÃO

No presente estudo foram determinados os IR para os valores de hemograma e para as análises bioquímicas pré-cirúrgicas para a população de cães jovens e adultos atendida no HVU-UFSM. Foram encontradas diferenças para valor absoluto de linfócitos, atividade da FA, concentração de PT, PPT e globulinas, entre as idades, e para valores de creatinina de acordo com o porte de cães adultos.

A população de referência foi submetida criteriosa seleção para identificar indivíduos hígidos que representam a população atendida no HVU-UFSM. Em estudos retrospectivos para a determinação de novos IR para cães (Dunlop et al. 2010, Bourgès-Abella et al. 2015, Miglio et al. 2020), o emprego de amostras de doadores de sangue, utilizando banco de dados de cães doadores de 5 raças de caça (n °455) ou da raça galgo (n °499), considerados clinicamente saudáveis, foram empregadas para estabelecimento de novos IR para a população proposta (Dunlop et al. 2010, Miglio et al. 2020). A utilização de pacientes classificados como clinicamente saudáveis, que realizaram exames de rotina, incluindo pequenos procedimentos cirúrgicos eletivos, foi relatada para determinar a existência de diferenças hematológicas e bioquímicas entre cães controle (n °240) versus obesos/com sobrepeso (n °116) considerados hígidos (Radakovich et al. 2017). Com base nos estudos anteriores, os métodos usados podem ser então, considerados opções na seleção de caninos sadios.

A utilização de critérios de seleção com o objetivo de limitar o número de indivíduos com raça definida (Willems et al. 2016), fazer uso de pacientes originários de mesma região (Miglio et al. 2020) e de mesma sazonalidade (Mohammed et al. 2017) e utilizar resultados de exames originados de métodos padronizados em mesmo laboratório (Miglio et al. 2020), auxiliaram a limitar fatores que poderiam interferir nos resultados. Apesar de os animais do estudo não apresentarem uniformidade nas condições de criação e dieta, de acordo com Dunlop et al. (2010), o elevado número de amostras associado ao manejo dietético variado, resulta em boa representação da população. Esses fatores mostram-se importantes para melhor representar a população estudada e posterior utilização dos IR definidos, conforme recomendações internacionais (Friedrichs et al. 2012).

O sexo pode ser considerado uma variável de confusão potencial e as diferenças encontradas de significância fisiológica questionável (Lawrence et al. 2013), de modo que particionar a população entre machos e fêmeas não fornece evidências de sua necessidade (Dunlop et al. 2010, Nielsen et al. 2010). A divisão da população entre sexos não foi realizada e os cálculos de IR foram estabelecidos para ambos os gêneros combinados, conforme demonstrado por Dunlop et al. (2010). Em contrapartida, a escolha de segregar a população de acordo com a idade, demonstrou ser importante.

Em estudos com cães jovens das raças Labrador Retriever e Schnauzer miniatura, durante o primeiro ano de vida, foi identificado o efeito significativo da idade para todos os analitos hematológicos e bioquímicos testados (Brenten et al. 2016), tal qual para Beagles saudáveis de 9 a 36 meses (Bourgès-Abella et al. 2015) e para Beagles e Labrador Retriever entre vinte e dois dias a quinze anos (Harper et al. 2003), o que evidencia a necessidade de IR específicos para cães de acordo com a idade (Harper et al. 2003, Brenten et al. 2016). Nesses estudos, a contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito aumentaram com a idade, em concordância com os resultados do presente estudo. A esse fato podemos atribuir a maturação da eritropoiese, o aumento da vida das hemácias com hemoglobina contida e a substituição de eritrócitos fetais por eritrócitos pós-natais (Bulgin et al. 1970, Lund et al. 2000,

Lawrence et al. 2013, Brenten et al. 2016), o que pode ocorrer até os 4 anos de idade (Lawrence et al. 2013).

Cães jovens apresentam números superiores de linfócitos provavelmente devido à resposta do organismo frente à estimulação imunológica (Von Dehn et al. 2014), e/ou à diminuição nas contagens de linfócitos em animais mais velhos (Radakovich et al. 2017). Foram descritas, não somente a diminuição significativa dos linfócitos com o aumento da idade (Lawrence et al. 2013), mas também a redução em 50% da contagem linfocitária em animais de 9 e 10 anos em comparação com animais de um ano (Bourgès-Abella et al. 2015). Tal fenômeno poderia ser atribuído à imunossenescência (Greeley et al. 1996, Day 2010, Lawrence et al. 2013). A atividade da FA apresentou aumento na sua atividade para caninos jovens, conforme estudos anteriores (Chang et al. 2016), relatado como achado comum em cães na fase de crescimento, (Webster 2005, Fernandez & Kidney 2007) devido à alta atividade da isoenzima óssea (Kramer & Hoffmann 1997).

Resultados relacionados às concentrações de PPT e PT foram compatíveis com os descritos na literatura para a idade. Espera-se que seus valores sejam inferiores em animais jovens, ocorrendo aumento gradual até alcançar a vida adulta (Johnson 2012). Harper e colaboradores (2003) descrevem o aumento das concentrações de PPT durante o primeiro ano de vida, o que também foi observado neste estudo, com diferença nas concentrações de PPT e PT entre cães adultos e jovens. Essa diferença pode estar relacionada ao aumento nas concentrações de imunoglobulinas e proteínas dessa fração ao longo da idade (Harper et al. 2003). Connolly e colaboradores (2020) observaram elevadas concentrações de globulinas em cães de trenó com o aumento de tempo de vida, em associação à redução da albumina e acréscimo de plaquetas, atribuídas a processo inflamatório crônico, o que também foi sugerido por Radakovich et al. (2017), que observaram aumento de PPT e globulinas com o aumento da idade. Entretanto, em nosso estudo, as concentrações de albumina praticamente não variaram entre jovens e adultos, o que torna a presença de processos inflamatórios menos provável. Justifica-se a diferença encontrada a concentrações de globulinas totais ser maior para cães adultos (2,0-4,4g/dL) em relação a cães jovens (1,6-3,8g/dL), de modo que a relação albumina/globulina dos valores médios para jovens (1,1mg/dL) é maior em relação aos adultos (0,9mg/dl). Atribui-se essa diferença a maior concentração de globulinas em cães mais velhos, considerada normal para a população estudada.

Realizou-se a divisão da população adulta de acordo com o porte para melhor representar o IR para creatinina, por esta sofrer interferências extra renais, o uso de IRs não específicos em cães de pequeno porte, resultou em erros na detecção de disfunção renal (Craig et al. 2006). Em um estudo com cães de pequeno porte, a concentração de creatinina mostrou ser inferior à observada em uma população geral de cães (45-90 μ mol/L x 54-144 μ mol/L) (Misbach et al. 2014), em concordância com os resultados observados nesse estudo, em que concentrações menores de creatinina foram observadas em cães de pequeno porte. A causa provável atribui-se à maior massa muscular em animais de médio e grande porte (Dorst et al. 2006, Dunlop et al. 2010), ou a características da população estudada, a qual foi constituída por cães sem raça definida e criados sob condições diversas. Ao contrário do observado, em um estudo com cães Beagles, o peso não apresentou efeito em nenhum analito, provavelmente por se tratar de uma população homogênea, com raça definida, constituída por animais de laboratório criados em padrões controlados (Bourgès-Abella et al. 2015).

Os IR para creatinina propostos neste estudo foram idênticos para cães jovens e adultos (0,7-1,5 mg/dL), e refletem a ausência de correlação entre concentrações de creatinina e o avanço da idade (Chang et al. 2016). O intervalo de referência proposto nesse estudo pode ser adequado para população canina de seis meses a oito anos, para portes pequeno, médio e grande. Ressalvas para seu uso devem ser consideradas se as concentrações de creatinina persistirem elevadas e sugere acompanhamento para avaliar a existência de alteração estrutural ou parenquimatosa em um ou ambos os rins (Grauer 2019). De acordo com as diretrizes da IRIS, em animais não azotêmicos aumentos na concentração de creatinina de 0,3 mg/dL ou mais, sem causas pré-renais, mesmo que ainda dentro dos valores de referência, são indicativos de lesão renal aguda (IRA) (IRIS 2019). Dessa forma, é importante utilizar os IRs de acordo com o porte pelo limite inferior e superior variar entre os portes e diferir do IR proposto para cães adultos.

O intervalo de referência superior para eosinófilos em cães jovens e adultos comparados aos descritos por autores (Jain 1993; Cornell University 2008), pode estar relacionado à maior carga parasitária esperada na população com histórico de everminação desatualizado (Tvedten & Raskin 2012), ou à característica própria para a população estudada. Além disso, IRs maiores para atividade da FA em relação à encontrada na literatura (Kaneko 2008, Cornell University 2017) demonstrou ser esperada em população de cães saudáveis (Sharkey et al. 2009, Nielsen et al. 2010, Miglio et al. 2020), em que amplas variações na atividade dessa enzima podem ser encontrados em caninos hígidos (Sharkey et al. 2009) e pode ser atribuído, nesses casos, ao elevado metabolismo ósseo (Miglio et al. 2020), a falhas na

classificação de pacientes de referência (Sharkey et al. 2009), e a características fisiológicas da população estudada (Nielsen et al. 2010, Miglio et al. 2020). Efeitos de cortisol endógeno também podem justificar esse aumento (Willard & Twedten 2012), todavia, determinar a razão exata necessitaria de testes adicionais mais específicos ou de maior custo (Sharkey et al. 2009).

Em relação aos demais analitos avaliados, não houve diferença significativa na comparação entre os grupos de jovens e adultos. A esse fato podemos atribuir, parcialmente, aos animais utilizados no presente estudo estarem acima de 6 meses de idade, nos quais analitos como a ureia se estabelecem na faixa de normalidade para adultos (Von Dehn et al. 2014) e a características próprias da população.

CONCLUSÕES

A importância da determinação de valores específicos foi observada, pois: o número de linfócitos e atividade de FA foram maiores em cães jovens e a concentração de proteínas séricas, totais e globulinas foi superior em adultos e a concentração de creatinina foi inferior em animais de pequeno porte. Além disso, a população estudada apresenta características próprias ainda não representadas em outros estudos, com maiores valores para eosinófilos e para a atividade FA na população de cães adultos e jovens saudáveis. Dessa forma, os IRs propostos neste estudo para a espécie canina de acordo com a idade e o porte, podem ser utilizados na rotina clínica e cirúrgica na região de Santa Maria - RS, Brasil.

Reconhecimentos. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Declaração de Conflito de Interesses. nenhum

REFERÊNCIAS

- Abinaya A., Pasupathi K., Karunakaran R., Joseph C., Senthil N.R. & Vairamuthu S. 2018. Effect of aging on hematological profile of obese dogs. *International Journal of Chemical Studies*. 6 (3):994-996. <https://www.researchgate.net/publication/341026044_Effect_of_aging_on_hematological_profile_of_obese_dogs>
- Archer J. 2010. Diagnostic laboratory tests and reference intervals. *Journal of Small Animal Practice*. 51(9):459-460. <<https://europepmc.org/article/med/21050217>>
- Bourghès-Abella H.N., Gury T.D., Geffré A., Concordet D., Thibault-Duprey K.C., Dauchy A. & Trumel C. 2015. Reference Intervals, Intraindividual and Interindividual Variability, and Reference Change Values for Hematology Variables in Laboratory Beagles. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 54(1):17-24.
- Brenten T., Morris P.J., Salt C., Raila J., Kohn B., Schweigert F.J. & Zentek J. 2016. Age-associated and breed-associated variations in haematological and biochemical variables in young labrador retriever and miniature schnauzer dogs. *Veterinary Record Open*. 3(1):1-9 <<http://dx.doi.org/10.1136/vetreco-2015-000166>>.
- Bulgin M.S., Munn S.L. & Gee W. 1970. Hematologic changes to 4 and one-half years of age in clinically normal beagles. *J Am Vet Med Assoc*. 157(8):1064-70. <PMID: 5475182>
- Chang Y.M., Hadox E., Szladovits B. & Garden O.A. 2016. Serum biochemical phenotypes in the domestic dog. *PLoS One*. 11(2):e0149650. <10.1371/journal.pone.0149650>
- Chung S., Chang L., Cheng T., Lin C., Chen W. & Chou C. 2016. Establishing in-house reference intervals for dogs in veterinary clinics. *Taiwan Veterinary Journal*. 42(02):53-67 <<http://dx.doi.org/10.1142/s1682648515500225>>
- Concordet D., Vergez F., Trumel C., Diquélou A., Lanore D., Garrères A. L., Pagès J. P., Péchereau D., Médaille C. & Braun J. P. 2008. A multicentric retrospective study of serum/plasma urea and creatinine concentrations in dogs using univariate and multivariate decision rules to evaluate diagnostic efficiency. *Veterinary Clinical Pathology*. 37(1):96-103.
- Connolly S.L., Nelson S., Jones T., Kahn J. & Constable P.D. 2020. The effect of age and sex on selected hematologic and serum biochemical analytes in 4,804 elite endurance-trained sled dogs participating in the Iditarod Trail Sled Dog Race pre-race examination program. *PLoS One*. 15(8):e0237706.<[doi:10.1371/journal.pone.0237706](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237706)>
- Cornell University. 2008. Reference intervals: Hematology (Advia 2120). College of Veterinary. <<https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/laboratories/clinical-pathology/reference-intervals/hematology>>
- Cornell University. 2017. Reference intervals: Chemistry (Cobas). College of Veterinary.<<https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/laboratories/clinical-pathology/reference-intervals/chemistry>>

- Craig A.J., Seguela J., Queau Y., Murgier P., Concordet D., Fleeman L.M., Mimouni P., Braun J.P., Germain C. & Lefebvre H.P. 2006. Redefining the reference interval for plasma creatinine in dogs: Effect of age, gender, body weight, and breed. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 20 (3):740-740.
- Day M.J. 2010. Ageing, immunosenescence and inflammaging in the dog and cat. *J Comp Pathol*. 142(1):60-69. <doi:10.1016/j.jcpa.2009.10.011>
- Von Dehn B. 2014. Pediatric Clinical Pathology. *Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice*.44(2):205-219 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.10.003>
- Drost W.T., Couto C.G., Fischetti A.J., Mattoon J.S. & Iazbik C. 2006. Comparison of glomerular filtration rate between greyhounds and non-Greyhound dogs. *J Vet Intern Med*. 20(3):544-546.
- Dunlop M. M., Sanchez-Vazquez M. J., Freeman K. P., Gibson G., Sacchini F. & Lewis F. 2010. Determination of serum biochemistry reference intervals in a large sample of adult greyhounds. *Journal Of Small Animal Practice*.52(1):4-10. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.01008.x>
- Fernandez N.J. & Kidney B.A. 2007. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet Clin Pathol*. 36: 223– 233.
- Friedrichs K.R., Harr K.E., Freeman K.P., Szladovits B., Walton R.M., Barnhart K.F. & Blanco-Chavez J. 2012. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*.41(4):441-453. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12006>
- Geffré A., Friedrichs K., Harr K., Concordet D., Trumel C. & Braun J. 2009. Reference values: a review. *Veterinary Clinical Pathology*. 38 (3):288-298.<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165x.2009.00179.x.>
- Geffré A., Concordet D., Braun J-P., Trumel C. 2011. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with microsoft excel. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 40, n. 1, p. 107-112. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165x.2011.00287.x.>
- Goldston R.T. & Hoskins J.D. 1999. Geriatria e gerontologia do cão e do gato. São Paulo: Roca, p.551.
- Grauer G. F. 2019. Utility of Creatinine, UPC, and SDMA in the Early Diagnosis of CKD in dogs and cats (updated 2019). International Renal Interest Society (IRIS). <http://iris-kidney.com/education/utility_creatine_early_diagnosis_ckd.html>
- Greeley E.H., Kealy R.D., Ballam J.M., Lawler D.F. & Segre M. 1996. The influence of age on the canine immune system. *Vet Immunol Immunopathol*. 55 (1-3):1-10. <PubMed: 9014301>
- Hall J. A., Yerramilli M., Obare E., Yerramilli M., Melendez L. D. & Jewell D. E. 2015. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *Journal of veterinary internal medicine*.29(3):808-814. <https://doi.org/10.1111/jvim.12607>
- Harper E.J., Hackett R.M., Wilkinson J. & Heaton P.R. 2003. Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador Retrievers. *Journal Of The American Veterinary Medical Association*. 223 (10):1436-1442. <http://dx.doi.org/10.2460/javma.2003.223.1436>
- Harvey J. W. 2012. *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas*. Saunders, an imprint of Elsevier Inc. p. 329.
- IRIS. 2019. IRIS Staging of CKD (modified 2019). Novartis Animal Health, n. modified, p. 1 – 8.
- Jain N.C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia : Lea & Febiger , p. 19 -23.
- Johnson M.C. 2012. Immunologic and Plasma Protein Disorders, p. 278-293. In: Willard M.D. & Tvedten H. *Small Animal Clinical Diagnosis By Laboratory Methods*. 5 ed, Elsevier, St Louis, Missouri.
- Kaneko J.J. Harvey J.W. & Bruss M.L. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6 ed, Elsevier, San Diego, California.
- Kramer J.W & Hoffmann W.E. 1997. Alkaline phosphatase. p. 315 - 317. In: Kaneko. J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5^a ed . San Diego : Academic Press.
- Lawrence J., Chang Y-M.R., Szladovits B., Davison L.J. & Garden O.A. 2013. Breed-Specific Hematological Phenotypes in the Dog: A Natural Resource for the Genetic Dissection of Hematological Parameters in a Mammalian Species. *PLoS ONE*. 8(11): e81288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081288>
- Lund C., Kuhl S., Mischke R. & Günzel-Apel A.R. 2000. Reference values of the red blood profile in beagle, German shepherd and golden retriever puppies. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 113(11-12):447-453. <PubMed: 11153226>
- Miglio A., Gavazza A., Siepi D., Bagaglia F., Misia A. & Antognoni M.T. 2020. Hematological and Biochemical Reference Intervals for 5 Adult Hunting Dog Breeds Using a Blood Donor Database. *Animals*. 10(7):1212<http://dx.doi.org/10.3390/ani10071212>
- Misbach C., Chetboul V., Concordet D., Médaille C., Gruet P., Speranza C., Hoffmann A., Rocha A., Balouka D. & Petit A.M.P. 2014. Basal plasma concentrations of routine variables and packed cell volume in clinically healthy adult small-sized dogs: effect of breed, body weight, age, and gender, and

- establishment of reference intervals. *Veterinary Clinical Pathology*. 43 (3):371-380. <<http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12162>>
- Mohammed N.A., Ahmed S.H. & Omer A.O. 2017. Seasonal Variation in Blood Constituents of German Shepherd Dogs in the Sudan. *Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*.10 (9):64-68.
- Nielsen L., Kjølgaard-Hansen M., Jensen A. L. & Kristensen A. T. 2010. Breed-specific variation of hematologic and biochemical analytes in healthy adult Bernese Mountain dogs. *Veterinary Clinical Pathology*.39(1):20-28 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165x.2009.00186.x>>
- Radakovich L. B., Truelove M. P., Pannone S. C., Olver C.S. & Santangelo K.S. 2017. Clinically healthy overweight and obese dogs differ from lean controls in select CBC and serum biochemistry values. *Veterinary Clinical Pathology*. 46(2):221-226. <<http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12468>>
- Radakovich, L. B., Pannone S.C., Truelove M.P., Olver C.S., Santangelo K.S. 2017. Hematology and biochemistry of aging—evidence of “anemia of the elderly” in old dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 46, n. 1, p. 34-45. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vcp.12459>>. DOI:10.1111/vcp.12459.
- Serra, M., Freeman K. P., Campora C. & Sacchini F. 2012. Establishment of canine hematology reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer using a blood donor database. *Veterinary clinical pathology*. 41(2):207–215. <<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00417.x>>
- Sharkey L., Gjevre K., Hegstad-Davies R., Torres S. & Muñoz-Zanzi C. 2009. Breed-associated variability in serum biochemical analytes in four large-breed dogs. *Veterinary clinical pathology*. 38(3):375–380. <<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00134.x>>
- Tvedten H. & Raskin R.E. 2012. Leukocyte Disorders. p. 63-91. In: Willard M.D. & Tvedten H. *Small Animal Clinical Diagnosis By Laboratory Methods*. 5 ed, Elsevier, St Louis, Missouri.
- Weiser G. & Allison R. W. 2015. Considerações sobre Interpretação de Dados Laboratoriais e Diagnóstico de Doenças, p.34-42. In: Thrall M. A., Weiser G., Allison R. W., Campbell T. W., *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Webster C.R.L. 2005. History, clinical signs, and physical findings in hepatobiliary disease, p.1422– 1435. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C, eds: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th ed. St Louis: Elsevier Saunders.
- Willard M.D. & Tvedten D.C. 2012. Gastrointestinal, Pancreatic, and Hepatic Disorders, p 191-225. In: Willard M.D. & Tvedten H. *Small Animal Clinical Diagnosis By Laboratory Methods*. 5 ed, Elsevier, St Louis, Missouri.
- Willems A., Paepe D., Marynissen S., Smets P., Maele I. V., Picavet P., Duchateau L. & Daminet S. 2016. Results of Screening of Apparently Healthy Senior and Geriatric Dogs. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 31(1):81-92. <<http://dx.doi.org/10.1111/jvim.14587>>

LISTA DE LEGENDAS

- Fig.1. Estado reprodutivo de cães adultos (1-8 anos)
- Fig.2. Estado reprodutivo de cães jovens (6-12 meses)
- Fig.3. Distribuição da população de cães jovens e adultos de acordo com o sexo
- Fig.4. Distribuição da população de acordo com a raça para cães adultos (1-8 anos). Outras raças correspondem a um integrante (Yorkshire, Beagle, Galgo, Pinscher, Chihuahua, Pug, Dachshund, Fox, Maltes, Cimarron, Lhasa Apso, Bloodhound, Fila-brasileiro, Dogo argentino e Chow-chow).
- Fig.5. Distribuição da população de acordo com a raça para cães jovens (6-12 meses)
- Fig.6. Local de origem para cães adultos
- Fig.7. Local de origem para cães jovens
- Fig.8. Relação do número de cães adultos selecionados de acordo com procedimentos cirúrgicos eletivos, doadores de sangue e *check up*. OVH = Ovário-histerectomia. OVR = Ovário remanescente.
- Fig.9. Relação do número de cães jovens selecionados de acordo com procedimentos cirúrgicos eletivos. LP= luxação de patela.
- Fig.10. Concentração de proteínas séricas totais, proteína plasmática total, linfócitos e atividade da fosfatase alcalina em dois grupos etários de cães até um ano (6 a 12 meses) e acima de um ano (1 a 8 anos). Diferença significativa (*), $p > 0.05$.
- Fig.11. Concentração de globulinas em dois grupos etários de cães até um ano (6 a 12 meses) e acima de um ano (1 a 8 anos). Diferença significativa (*), $p > 0.05$
- Fig.12. Relação do número de cães de acordo com o porte, seguindo a classificação de Goldston & Hoskins (1999).
- Fig.13. Concentração de creatinina de acordo com o porte de caninos entre um e oito anos de idade. Diferença significativa (*), $p > 0.05$.

LISTA DE FIGURAS

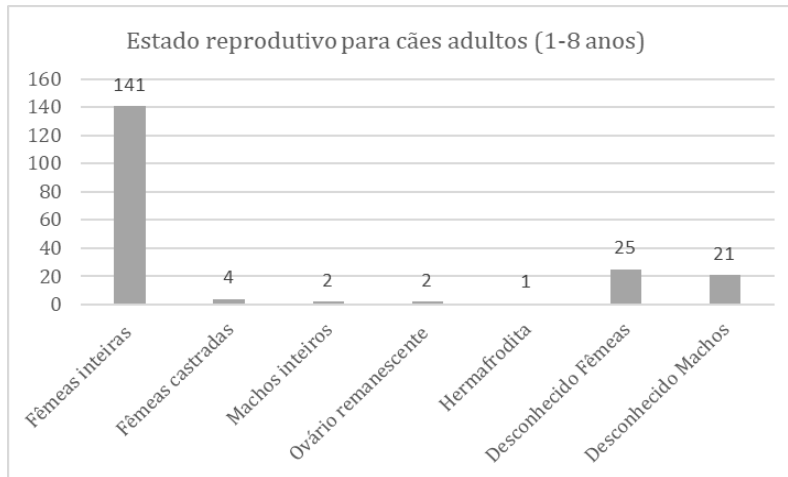


Fig.1.

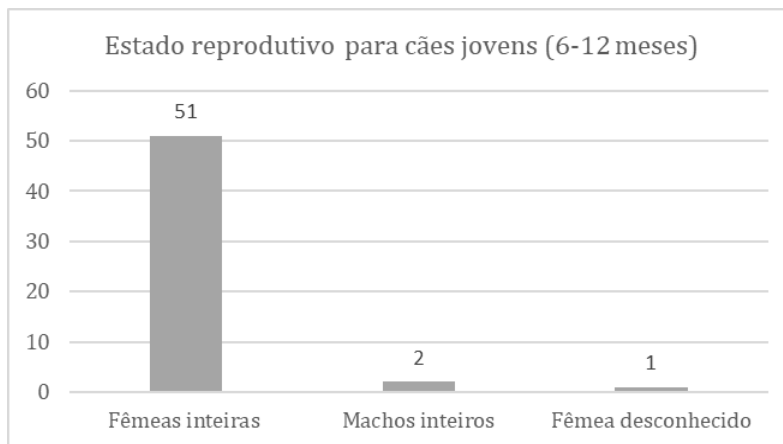


Fig.2.

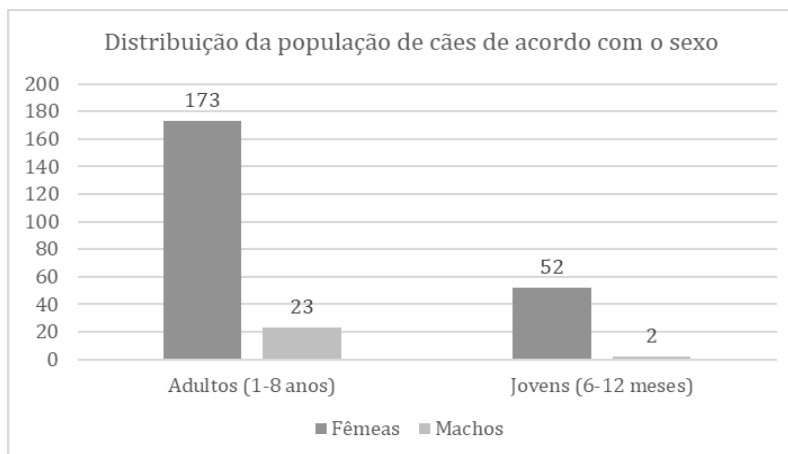


Fig.3.



Fig.4.



Fig.5.

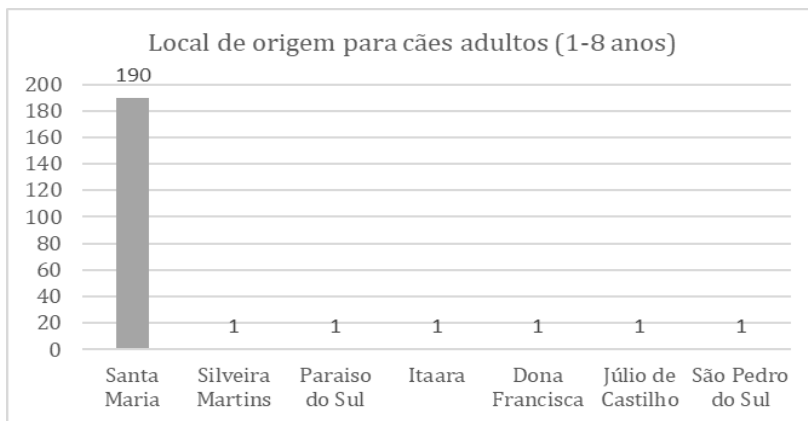


Fig.6.

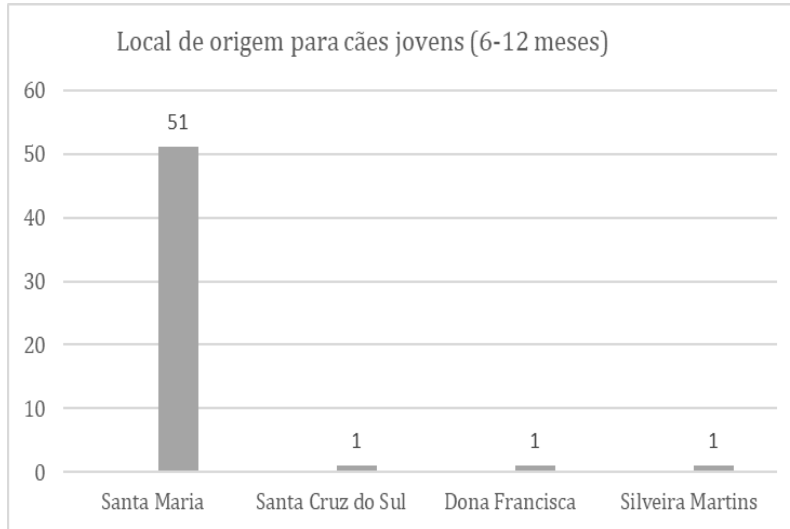


Fig.7

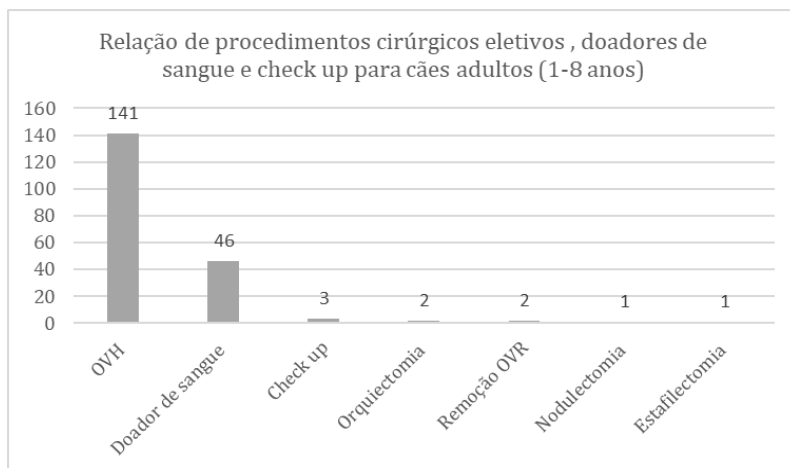


Fig.8

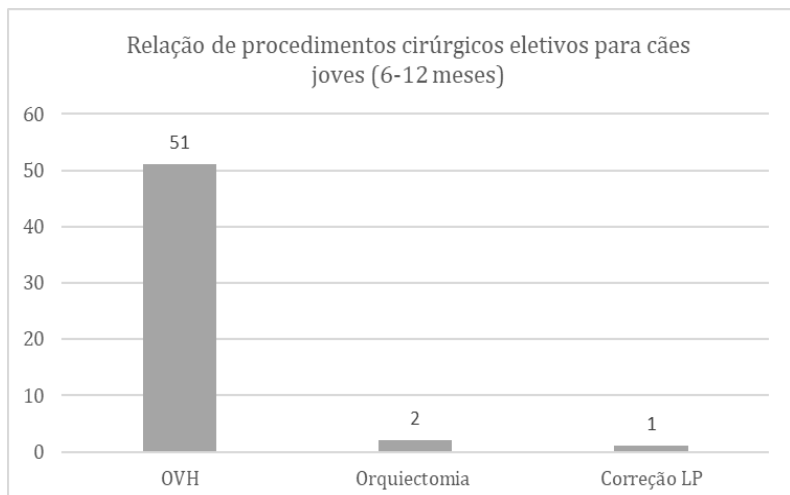


Fig.9

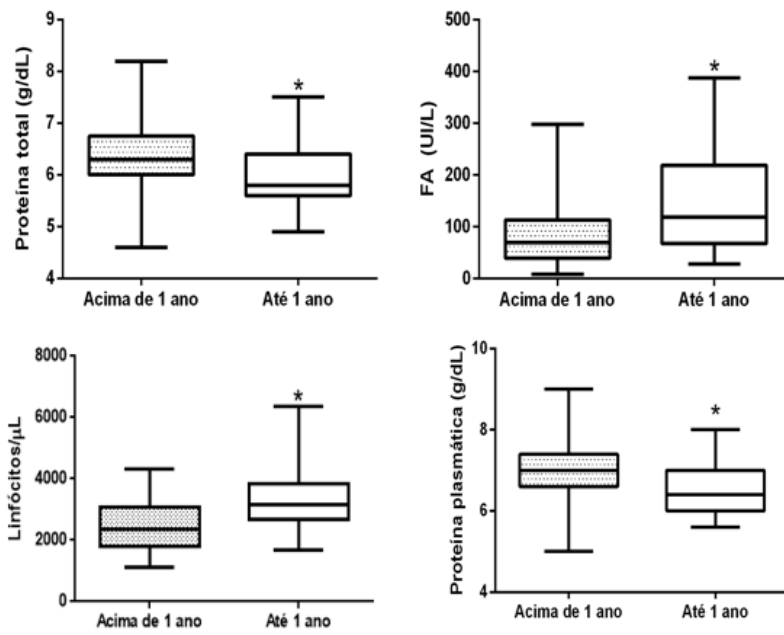


Fig.10.

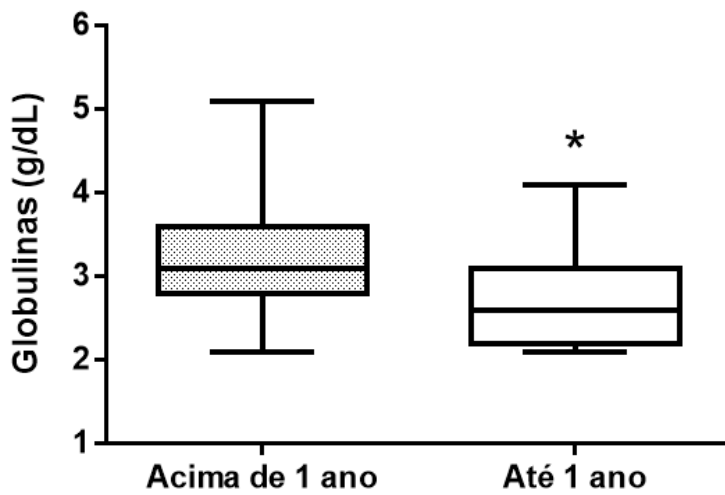


Fig.11

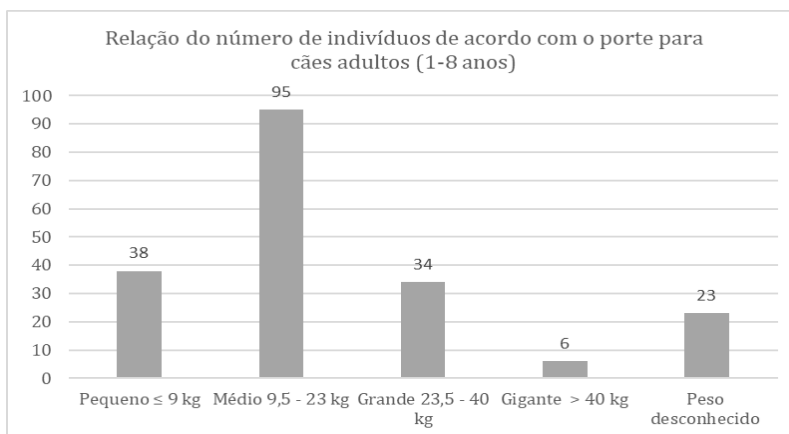


Fig.12.

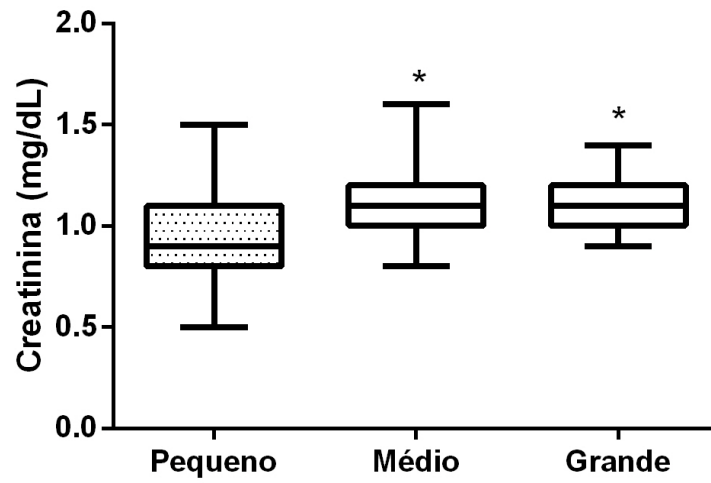


Fig.13.

QUADROS

Quadro 1: Relação da causa e do número de animais excluídos do estudo

Relação da causa e número de exclusão de animais do estudo	Número de animais excluídos
Histórico de uso de contraceptivo hormonal	52
Indivíduos com raça definida > 10	40
Amostras hemolisadas	25
Anisocitose/ Policromasia/ Metarrubricitos	20
Amostras lipêmicas	18
Linfócitos reativos	17
Alterações laboratoriais sugestivas doenças subclínica	15
Plaquetas ativadas/ agregados plaquetários/ macroplaquetas	12
Histórico de parto < 6 meses	9
Monócitos ativados	9
Leishmaniose	5
Paciente em estro no momento da coleta de sangue	5
Faz uso de fármacos/ está em tratamento	5
Sobrepeso	4
Adoção recente/ tutor não sabe informar o histórico	4
Diagnóstico de Dermatite alérgica a picada de pulga	4
Hérnia	4
Ancilostomose	2
Otite	2
Dermatite	2
Presença de nódulo em mama	1
Criptorquidia	1
Paniculite	1
Secreção na vulva	1
Vacina realizada em menos de 14 dias (anterior a coleta de sangue)	1
Dermatopatia	1
Dermatite atópica canina	1
Demodicose	1
Presença de secreção mamária	1
Abaixo do peso ideal (magro)	1
Peritonite após ovário-histerectomia	1
Displasia coxofemoral	1
Total	266

Quadro 2: Intervalos de referência, média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo para valores de hemograma e bioquímica sérica em caninos de seis a doze meses e IR amplo para espécie canina (IR^b e IR^c) e para a mesma faixa etária (IR^a)

	IR	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	IC 90%	IR ^a e IR ^b
Eritrócitos x10 ⁶ /μL	5,7 - 8,1	6,6	0,6	5,56	6,6	8,28	5,6-5,9 7,5-8,3	6,0 - 7,0 ^a
Hemoglobina g/dL	12,2 - 18,6	15,6	1,5	11,7	15,6	18,7	11,7-13,4 18,1-18,7	14 - 17 ^a
Hematócrito %	37,6 - 55,8	46,1	4,2	36,5	45,8	56,2	36,5-40,1 53,1-56,2	40 - 47 ^a
VCM fL	60 - 76	69,4	3,9	58	69,8	76	58-63,6 75,2-76	65 - 78 ^a
CHCM %	32 - 35,8	33,8	1	31,8	33,7	35,8	31,8-32,1 35,4-35,8	30 - 35 ^a
RDW %	11,6 - 16,4	14	1,3	11,6	13,9	16,4	11,6-12 16,3-16,4	11 - 14 ^c
PPT g/dL	5,6 - 8,0	6,6	0,6	5,6	6,4	8	5,6-5,7 7,6-8,0	5 - 7 ^a
Plaquetas x10 ³ /μL	158 - 478	289	75,0	152	281	492	152-198 416-492	175 - 500 ^a
Leucócitos x 10 ³ /μL	6,8-18,6	11,8	2,6	6,5	11,7	18,8	6,5-8,0 16,7-18,8	8,0 - 16,0 ^a
Bastonetes/μL	Raros	104	15	93	104	115	*	0 - 200 ^a
Segmentados 10 ³ /μL	^x 3,3-11,2	6,6	1,9	3,3	6,4	11,6	3,3-4,1 10,3-11,6	4,5 - 11,2 ^a
Linfócitos x 10 ³ /μL	1,7 - 6,1	3,6	1,0	1,69	3,4	6,37	1,6-2,3 5,3-6,3	1,6 - 6,4 ^a
Monócitos x 10 ³ /μL	0,07 - 1,1	0,44	0,26	0,06	0,40	1,12	0,06-0,1 0,9-1,1	0,15 - 1,28 ^a
Eosinófilos x 10 ³ /μL	0,1 - 2,2	0,91	0,59	0,10	0,77	2,2	0,1-0,14 1,9-2,2	0,1 - 1,0 ^a
Basófilos /μL	Raros	0	0	-	-	-		Raros ^a
Albumina g/dL	2,4 - 3,7	3,1	0,3	2,3	3,2	3,7	2,3-2,6 3,6-3,7	2,6 - 3,3 ^b
ALT UI/L	18 - 55	37,1	9	18	35,2	55	18-24 51-55	21 - 102 ^b
Creatinina mg/dL	0,7 - 1,5	1,0	0,2	0,7	1	1,5	0,7-0,7 1,4-1,5	0,5 - 1,5 ^b
FA UI/L	28,3 - 387	151,3	98,7	28	120	388	28-35,6 319-388	20 - 156 ^b
PT g/dL	4,9 - 7,5	5,9	0,6	4,9	5,8	7,5	4,9-5,1 7,0-7,5	5,4 - 7,1 ^b
Ureia mg/dL	15,8 - 62,1	38,8	12,7	14,7	39,5	62,5	14,7-20,1 60,2-62,5	21 - 59,9 ^b
*Globulinas g/dL	1,9 - 4,1	2,7	0,5	2,1	2,6	3,8	1,8-2,0 3,6-4,6	2,7-4,4 ^b

^a Intervalos de referência para caninos de 6 a 12 meses segundo, Jain (1993)

^b Intervalos de referência segundo Kaneko et al. (2008)

^c Intervalos de referência segundo Harvey (2012)

VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW = amplitude de distribuição eritrocitária, PPT = proteínas plasmáticas totais, ALT = alanina aminotransferase, FA = fosfatase alcalina, PT = proteínas totais, IR= intervalo de referência, DP = desvio-padrão, IC= intervalo de confiança.

*IR obtido por método paramétrico.

Quadro 3. Intervalos de referência, média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo para valores de hemograma e bioquímica sérica em caninos de um a oito anos e descritos por diferentes autores.

	IR	Média	DP±	Mín	Med	Máx	IC 90%	IR ^a e IR ^b	IR ^d
Eritrócitos x 10 ⁶ /μL	5,5-8,2 12,8-	6,6	0,7	5,01	6,5	8,48	5,0-5,7 7,9-8,5 12,2-13,2	5,5-8,5 ^a	5,7-8,5 14,1-
Hemoglobina g/dL	19,9 38,2-	16,1	1,8	12	16,1	20,7	19,5-20,4 37,7-40,0	12-18 ^a	20,1
Hematócrito %	58,5 61,2-	47,4	5,1	34,3	47,2	61,6	57,0-59,9 59,6-63,0	37-55 ^a	41-58
VCM fL	77,1	70,2	3,9	58,5	70,7	78	76,0-77,8 31,1-32,1	60-77 ^a	64-76
CHCM %	32-36	34	1,1	30,6	34	36,9	35,8-36,2	32-36 ^a	33-36
RDW %	11,1- 16,3	13,7	1,4	9,8	13,5	16,9	9,8-11,3 15,8-16,9	-	10,6- 14,3
PPT g/dL	5,8-8,6	7,0	0,7	5	7,0	9	5,2-6,0 8,2-8,8 122-179	6,0-8,0 ^a	5,9-7,8 186-
Plaquetas x10 ³ /μL	159-451	286	77,8	122	276	474	433-474	200-500 ^a	545
Leucócitos x10 ³ /μL	6,4 - 17,7	11,3	2,7	4,9	11,3	19,5	5,8-7,0 15,6-19,2	6,0-17,0 ^a	5,7- 14,2
Bastonetes /μL	0-199	120	39	-	-	-	-	0-300 ^a	0 - 100
Segmentados x 10 ³ /μL	3,2-10,7	6,9	1,9	2,2	6,7	12,6	2,3-3,8 10,2-12,3	3,0-11,5 ^a	2,7-9,4
Linfócitos x 10 ³ /μL	1,0-4,9	2,5	1,0	0,9	2,3	5,2	0,93-1,1 4,5-5,1	1,0-4,8 ^a	0,9-4,7
Monócitos x 10 ³ /μL	0-1,1	0,4	0,28	0,06	0,4	1,2	0,06-0,1 0,9-1,2	0,15- 1,35 ^a	0,1-1,3
Eosinófilos x 10 ³ /μL	0,1-2,5	1,0	0,62	0,07	0,9	2,8	0,07-0,2 2,3-2,8	0,1-1,25 ^a	0,1-2,1
Basófilos/μL	Raros	336	351	-	-	-	2,4-2,6	Raros ^a	0-100
Albumina g/dL	2,5-3,6 17,2-	3,1	0,3	2,4	3,2	3,7	3,5-3,7 12-21	2,6-3,3 ^b	3,2-4,1
ALT UI/L	63,0	36,7	11,1	12	35	68	58-68 0,5-0,8	21-102 ^b	17-95
Creatinina mg/dL	0,7-1,5 15,2-	1,1	0,2	0,5	1,1	1,6	1,4-1,6 8-18	0,5 -1,5 ^b	0,6-1,4
FA UI/L	190,4	74	46,3	8	64,0	193	169-193 5,0-5,6	20-156 ^b	7-115
PT g/dL	5,4-7,5	6,3	0,5	5,0	6,3	7,7	7,3-7,7 11-20	5,4-7,1 ^b	5,5-7,2
Ureia mg/dL	18-61,3	35,0	11,1	11	34	70	56-70	21-59,9 ^b	9-26
Globulinas g/dL	2,3-4,6	3,2	0,6	2,1	3,1	4,8	2,1-2,4 4,3-4,8	2,7-4,4 ^b	

^a Intervalos de referência para caninos segundo Jain (1993)

^b Intervalos de referência segundo Kaneko et al. (2008)

^dIntervalos de referência segundo Cornell University para hematologia (2008) e bioquímica (2017)

VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW = amplitude de distribuição eritrocitária, PPT = proteínas plasmáticas totais, ALT = alanina aminotransferase, FA = fosfatase alcalina, PT = proteínas totais, IR = intervalo de referência, DP = desvio padrão, Mín = mínimo, Med = mediana, Máx= máximo, IC= intervalo de confiança

3 CONCLUSÃO

Conclui-se que avaliar IRs específicos de acordo com a idade é importante devido ao maior número de linfócitos e atividade de FA em cães jovens e maior concentração de proteínas séricas, totais e globulinas em adultos. Avaliar a concentração de creatinina de acordo com o porte é necessária devido à menor concentração desse analito em cães de pequeno porte. Também se conclui que a população estudada apresenta características próprias ainda não representadas em outros estudos, com maiores valores para eosinófilos e para a atividade da enzima FA na população de cães adultos e jovens saudáveis. Dessa forma, os IRs propostos neste estudo para a espécie canina, de acordo com a idade e o porte, podem ser utilizados na rotina clínica e cirúrgica na região de Santa Maria - RS, Brasil, por melhor representar as características dessa população.

REFERÊNCIAS

- ABINAYA, A et al. Influence of age on blood biochemical profile of obese dogs. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 3, p. 991-993, 2018. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/341026044_Effect_of_aging_on_hematological_profile_of_obese_dogs>. Accessed: set. 20, 2020. P-ISSN: 2349–8528, E-ISSN: 2321–4902
- ALLISON, R. W. Avaliação Laboratorial da Função Hepática. In: THRALL, M. A; WEISER, G; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015b. Cap. 26. p. 853-903.
- ALLISON, R. W. Avaliação Laboratorial das Proteínas do Plasma e do Soro Sanguíneo. In: THRALL, M. A; WEISER, G; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015a. Cap. 29. p. 979-1010.
- ARCHER, J. Diagnostic laboratory tests and reference intervals. **Journal of Small Animal Practice**, v. 51, n. 9, p. 459- 460, 2010. Available from: <<https://europepmc.org/article/med/21050217>>. Accessed: set. 15, 2020. DOI: 10.1111 / j.1748-5827.2010.00990.x
- BARSANTI J.A. Urinary disorders. In: WILLARD, M. D; TVEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 5. ed. Elsevier Saunders, 2012. Cap.7. p. 126-155.
- BRENTEN, T et al. Age-associated and breed-associated variations in haematological and biochemical variables in young labrador retriever and miniature schnauzer dogs. **Veterinary Record Open**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2016. BMJ. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1136/vetreco-2015-000166>>. Accessed: set. 22, 2020. DOI:10.1136/vetreco-2015-000166
- CHANG, Y et al. Serum Biochemical Phenotypes in the Domestic Dog. Plos One, v. 11, n. 2, p. 1-17, fev. 2016. **Public Library of Science (PLOS)**. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149650>>. Accessed: set. 21, 2020. DOI: doi:10.1371/journal.pone.0149650
- CHUNG, S et al. ESTABLISHING IN-HOUSE REFERENCE INTERVALS FOR DOGS IN VETERINARY CLINICS. Taiwan Veterinary Journal, v. 42, n. 02, p. 53-67, jun. 2016. **World Scientific Pub Co Pte Lt**. Available from <<http://dx.doi.org/10.1142/s1682648515500225>>. Accessed: set. 10, 2020. DOI: 10.1142/S1682648515500225
- CONNOLLY, S. L et al. The effect of age and sex on selected hematologic and serum biochemical analytes in 4,804 elite endurance-trained sled dogs participating in the Iditarod Trail Sled Dog Race pre-race examination program. Plos One, v. 15, n. 8, p. 1-20, 20 ago. 2020. **Public Library of Science (PLOS)**. Available from:

<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0237706>>. Accessed: set. 18, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0237706

DIXON, W.J. Processing data for outliers. International Biometrics Society, v. 9, n. 1, p.74-89, 1953. Available from:

<<http://webpace.ship.edu/pgmarr/Geo441/Readings/Dixon%201953%20-%20Processing%20Data%20for%20Outliers.pdf>>. Accessed: set. 20, 2020.

DORST, W. T. et al. Comparison of Glomerular Filtration Rate Between Greyhounds and Non-greyhound Dogs. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 544-546, 2006. Wiley. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[544:cogfrb\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[544:cogfrb]2.0.co;2)>. Accessed: set. 23, 2020. DOI: 10.1892/0891-6640(2006)20[544:cogfrb]2.0.co;2

DUNLOP, M. M et al. Determination of serum biochemistry reference intervals in a large sample of adult greyhounds. **Journal Of Small Animal Practice**, v. 52, n. 1, p. 4-10, 9 dez. 2010. Wiley. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.01008.x>>. Accessed: set. 20, 2020. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2010.01008.x

ECKERSALL, D. P. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias, In: KANEKO, J. J; HARVEY, J.W; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. Academic Press, 2008. cap. 5. p.117-155.

FRASER, C. G. Inherent biological variation and reference values. **Clinical Chemistry And Laboratory Medicine (Cclm)**, v. 42, n. 7, p. 758-764, 5 jan. 2004. Walter de Gruyter GmbH. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1515/cclm.2004.128>>. Accessed: set. 26, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.128>

FRIEDRICHS, K et al. **ASVCP Quality Assurance and Laboratory Standards Committee (QALS) Guidelines for the Determination of Reference Intervals in Veterinary Species and other related topics: SCOPE**. Available from: <https://cdn.ymaws.com/www.asvcp.org/resource/resmgr/QALS/Other_Publications/RI_Guidelines_For_ASVCP_webs.pdf>. Accessed: set. 20, 2020.

FRIEDRICHS, K. R. et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. **Veterinary Clinical Pathology**, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 441-453, dez. 2012. Wiley. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12006>>. Accessed: set. 18, 2020. DOI:10.1111/vcp.12006.

GEFFRÉ, A et al. Reference values: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 3, p. 288-298, set. 2009. Wiley. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165x.2009.00179.x>>. Accessed: jun. 20, 2020. DOI:10.1111/j.1939-165x.2009.00179.x

GEFFRÉ, A et al. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with microsoft excel. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 107-112, 7 fev. 2011. Wiley. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165x.2011.00287.x>>. Accessed: abr.09, 2022.

- GRASBECK, R; SARIS, N. E. Establishment and use of normal values. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 26, (Suppl 110), p. 62–63, 1969.
- HALL, J. A et al. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 3, p. 808-814, 24 abr. 2015. Wiley. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/jvim.12607>>. Accessed: set. 26, 2020. DOI: 10.1111/jvim.12607.
- HARVEY, J. W. Evaluation of Erythrocytes. In: HARVEY, J.W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Elsevier Saunders, 2012b. cap. 4. p.49-121.
- HARVEY, J. W. Evaluation of Hemostasis: Coagulation and Platelet Disorders. In: HARVEY, J.W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Elsevier Saunders, 2012c. cap. 7. p.191-233.
- HARVEY, J. W. Evaluation of Leukocytic Disorders. In: HARVEY, J.W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Elsevier Saunders, 2012d. cap. 5. p.122-176.
- HARVEY, J.W. Hematology Procedures. In: HARVEY, J.W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Elsevier Saunders, 2012a. cap. 2. p.11-32.
- HARVEY, J. W. Introduction to Veterinary Hematology. In: HARVEY, J.W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Elsevier Saunders, 2012e. cap. 1. p.1-10.
- HOFFMANN, W.E; SOLTER, P.F. Diagnostic Enzymology of Domestic Animals. In: KANEKO, J. J; HARVEY, J.W; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. Academic Press, 2008. cap. 12. p.351-378.
- HOROWITZ, G. L et al. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**; approved guidelines, 3rd ed, CLSI document C28-A3, v. 28, n. 30, 2008. Available from: <https://clsi.org/media/1421/ep28a3c_sample.pdf>. Accessed: out. 07, 2020. ISSN: 0273-3099.
- HORN, P. S, PESCE, A. J. **Reference Intervals**. A User's Guide. Washington: AACC Press; 2005.
- ICHIHARA, K et al. Sources of Variation of Commonly Measured Serum Analytes in 6 Asian Cities and Consideration of Common Reference Intervals. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 356-365, 1 fev. 2008. Oxford University Press (OUP). Available from: <<http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.091843>> Accessed: set. 27, 2020. DOI: 10.1373 / clinchem.2007.091843

IRIS. International Renal Interest Society. **IRIS Grading of Acute Kidney Injury (AKI)**. Available from: < Iris Kidney - Diretrizes - Classificação IRIS de AKI (iris-kidney.com) >. Accessed: fev. 02, 2022a.

IRIS. International Renal Interest Society. **IRIS Staging of CKD**. Available from: < <http://iris-kidney.com/guidelines/staging.html>>. Accessed: fev. 02, 2022b.

JOHNSON, M.C. Immunologic and Plasma Protein Disorders. In: WILLARD, M. D; TVEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 5. ed. Elsevier Saunders, 2012. Cap.12. p. 278-293.

LAWRENCE, J. et al. Breed-Specific Hematological Phenotypes in the Dog: A Natural Resource for the Genetic Dissection of Hematological Parameters in a Mammalian Species. **PLoS ONE**. 8(11): e81288. 2013.
<<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081288>>

LUMSDEN, J.H, MULLEN, K. On establishing reference values. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.42, n. 3, p. 293–301, 1978. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1277641/>>. Accessed: set. 12, 2020. PMID: 688072

MEDAILLE, C et al. Comparison of Plasma/Serum Urea and Creatinine Concentrations in the Dog: a 5-year retrospective study in a commercial veterinary clinical pathology laboratory. **Journal Of Veterinary Medicine Series A**, v. 51, n. 3, p. 119-123, abr. 2004. Wiley. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00616.x>>. Accessed: set. 20, 2020. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2004.00616.x

MEUTEN, D. Avaliação e interpretação laboratorial do sistema urinário. In: THRALL, M. A; WEISER, G; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap. 23. p. 689-806.

NIELSEN, L et al. Breed-specific variation of hematologic and biochemical analytes in healthy adult Bernese Mountain dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 1, p. 20-28, mar. 2010. Wiley. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165x.2009.00186.x>>. Accessed: set. 10, 2020. DOI:10.1111/j.1939-165x.2009.00186.x.

RADAKOVICH, L. B et al. Hematology and biochemistry of aging—evidence of “anemia of the elderly” in old dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 46, n. 1, p. 34-45, 13 fev. 2017. Available from: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vcp.12459>>. Accessed: abr. 05. 2022. DOI:10.1111/vcp.12459.

ROMÁN, V. R. G et al. Assessment of HIV-1 Patient Recruitability in the Republic of Guinea-Bissau Using African versus North American Hematology and Biochemistry Reference Intervals. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 19, n. 8, p. 1322-1325, 6 jun. 2012. American Society for Microbiology. Available from:

<<http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00170-12>>. Accessed: set. 23, 2020. DOI: 10.1128 / CVI.00170-12.

SCHULTZE, A. E. Interpretation of Canine Leukocyte Responses. In: WEISS, D. J; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**.6.ed. Wiley-Blackwell, 2010. cap 48. p. 321-334.

STOCKHAM, S. L; SCOTT, M. A. Erythrocytes. In: STOCKHAM, S. L; SCOTT, M. A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**.2. ed. Blackwell Publishing, 2008a. Cap.3.p.107-221.

STOCKHAM, S. L; SCOTT, M. A. Leukocytes. In: STOCKHAM, S. L; SCOTT, M. A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**.2. ed. Blackwell Publishing, 2008b. Cap.2.p.53-106.

STOCKHAM, S. L; SCOTT, M. A. Urinary system. In: STOCKHAM, S. L; SCOTT, M. A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**.2. ed. Blackwell Publishing, 2008c. Cap. 8.p.416-494.

TVEDTEN, H. Hemostatic Abnormalities. In: WILLARD, M. D; TVEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 5. ed. Elsevier Saunders, 2012. Cap. 5. p. 92-111.

TVEDTEN, H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In: WEISS, D.J; WARDROP, J. **Schalm's veterinary hematology**.6.ed. Wiley-Blackwell, 2010. cap 24. p. 152-162.

THRALL, M. A. Classificação e Abordagem Diagnóstica da Policitemia. In: THRALL, M. A; WEISER, G; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015b. cap. 9. p. 249-256.

THRALL, M. A. Morfologia eritrocitária. In: THRALL, M. A; WEISER, G; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015a. cap. 5. p. 140-169.

WALTON, R. M. Subject-based reference values: biological variation, individuality, and reference change values. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 2, p. 175-181, 5 mar. 2012. Wiley. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165x.2012.00414.x>>. Accessed: set. 24, 2020. DOI: 10.1111 / j.1939-165X.2012.00414.x

WEISER, G; ALLISON, R. W. Considerações sobre Interpretação de Dados Laboratoriais e Diagnóstico de Doenças. In: THRALL, M. A; WEISER, G; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. cap. 3. p. 34-42.

WEISER, G. Introdução aos leucócitos e ao leucograma. In: THRALL, M. A; WEISER, G; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica**

Clínica Veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. cap. 10. p. 257-267.

WEISS, D.J; TVEDTEN, H. The Complete Blood Count, Bone Marrow Examination, and Blood Banking. In: WILLARD, M. D; TVEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 5. ed. Elsevier Saunders, 2012. cap. 2. p. 12-37.

WILLARD, M.D; TWEDTEN, D.C. Gastrointestinal, Pancreatic, and Hepatic Disorders. In: WILLARD, M. D; TWEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 5. ed. Elsevier Saunders, 2012. cap.9. p. 191-225.

ZALDÍVAR-LÓPEZ, S et al. Clinical pathology of Greyhounds and other sighthounds. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 4, p. 414-425, 24 out. 2011. Available from: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22092909/>>. Accessed: abr. 05. 2022. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2011.00360.x