

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CECILIA EMICA TANAKA MIYAKE

RETICULÓCITOS: DA CONTAGEM MANUAL À CITOMETRIA DE FLUXO



CURITIBA

2011

CECILIA EMICA TANAKA MIYAKE

RETICULÓCITOS: DA CONTAGEM MANUAL À CITOMETRIA DE FLUXO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas.

Orientador: Samuel Ricardo Comar

CURITIBA

2011

RESUMO

A contagem de reticulócitos no sangue periférico fornece informações sobre a integridade funcional da medula óssea. Constitui um fator importante no diagnóstico, classificação e monitorização do tratamento das anemias, na confirmação da regeneração da medula óssea após quimioterapia ou transplante, e na monitorização da terapêutica com eritropoetina humana recombinante. Para a contagem de reticulócitos, a técnica manual é tida, desde a década de 1940, como método padrão ouro, porém, com a integração da análise de reticulócitos às contagens globais de células sanguíneas em analisadores hematológicos automatizados, em meados da década de 1990, contagens mais precisas puderam ser incorporadas como parte da rotina de avaliação hematológica. Além de aumentar substancialmente a precisão e sensibilidade das contagens, a análise automatizada de reticulócitos fornece parâmetros reticulocitários que não são possíveis pela metodologia manual. Dentre estes parâmetros destacam-se a fração de reticulócitos imaturos (IRF), que tem sido estudada como um preditor precoce da recuperação hematopoiética pós transplante de medula óssea, e o conteúdo de hemoglobina (CHr ou Ret-He) que tem sido sugerido como um indicativo precoce de deficiência de ferro, por proporcionar uma medida da disponibilidade deste metal para as células vermelhas recentemente produzidas pela medula óssea. Este trabalho teve por objetivo revisar as técnicas laboratoriais de enumeração de reticulócitos e a aplicação clínica da contagem de reticulócitos e dos parâmetros reticulocitários derivados.

Palavras-chave: eritropoiese, contagem de reticulócitos, parâmetros de maturação.

ABSTRACT

The reticulocyte count in peripheral blood provides information about the functional integrity of the bone marrow. It is an important factor in diagnosis, classification and monitoring of the treatment of anemia, in confirmation of the regeneration of bone marrow after chemotherapy or transplantation, and monitoring of the therapy with recombinant human erythropoietin. For the reticulocyte count, the manual technique is taken, since 1940's, as the gold standard, but with the integration of the reticulocyte analysis to global blood cell counts in automated hematology analyzers, in the mid-1990s, more accurate counts could be incorporated as part of hematological evaluation routine. In addition to substantially increase the accuracy and sensitivity of the counts, the automated analysis provides reticulocyte parameters that are not possible by manual methods. Among these parameters stand out the immature reticulocyte fraction (IRF), which has been studied as an early predictor of hematopoietic recovery after bone marrow transplantation, and hemoglobin content (CHr or Ret-He), which has been suggested as an early indication of iron deficiency, because it provides a measure of the availability of this metal to the red cells recently produced by the bone marrow. This study aimed to review the laboratory techniques for enumeration of reticulocytes and clinical application of reticulocyte counts and derived parameters.

Keywords: erythropoiesis, reticulocyte count, maturation parameters.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. CONTAGEM MANUAL.....	3
3. CONTAGEM AUTOMATIZADA.....	8
3.1. Parâmetros de maturação e índices celulares	11
3.2. Aplicações clínicas dos parâmetros e índices fornecidos.....	12
4. CONCLUSÕES	15
REFERÊNCIAS.....	17

1. INTRODUÇÃO

Os reticulócitos compreendem eritrócitos imaturos no estágio final de diferenciação celular e foram observados pela primeira vez por Wilhelm H. Erb em 1865, o qual notou grânulos em glóbulos vermelhos tratados com ácido pícrico ou acético (ERB, 1865).

O termo reticulócito deriva das características microscópicas das células depois de tratadas com corantes supravitais, como o azul de metileno novo ou o azul de cresil brilhante, que conferem aos fragmentos de ácido ribonucléico (restos de RNA ribossomal) a aparência de uma fina rede reticular ou grânulos dispersos (PIERRE, 2002; PIVA *et al.*, 2010).

A proliferação e a diferenciação eritróide ocorrem em compartimentos do microambiente medular conhecidos como “ilhas eritroblásticas”. Estas ilhas consistem de um macrófago central com projeções citoplasmáticas circundado por eritroblastos em diferentes estágios de desenvolvimento. Estudos propõem que o macrófago central possui papel essencial, tanto no estágio inicial de maturação eritróide, fornecendo ferro para a síntese de grupamentos heme, quanto no estágio final de diferenciação, fagocitando o núcleo expelido pelos eritroblastos ortocromáticos (CHASIS e MOHANDAS, 2008; AN e MOHANDAS, 2011).

A eritropoiese é impulsionada pelo equilíbrio entre mecanismos de *feedback* positivo e negativo que operam nestas ilhas. Estudos recentes sugerem que tais mecanismos envolvem tanto interações entre as células, como com alguns fatores solúveis liberados pelos eritroblastos e macrófagos e fatores circulantes, sendo a eritropoetina um dos principais reguladores de proliferação (CHASIS e MOHANDAS, 2008).

A extrusão do núcleo pelo eritroblasto ortocromático no final da diferenciação eritróide dá origem ao reticulócito, que se caracteriza por ser uma célula anucleada, cerca de 20% maior que os eritrócitos maduros e que na microscopia eletrônica se apresenta como uma célula multilobular, que ainda conserva no citoplasma alguns resquícios de organelas como retículo endoplasmático, ribossomos e mitocôndrias (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004; AN e MOHANDAS, 2011). O reticulócito ainda

possui a capacidade de produção de hemoglobina, apesar da ausência do núcleo, devido à presença de RNA mensageiro no citoplasma. Por apresentar mitocôndrias também tem certa capacidade de respiração aeróbica (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004).

O tempo médio de maturação dos reticulócitos é de cerca de 4 dias, sendo que os três primeiros dias ocorrem na medula óssea e nas últimas 24 horas são liberados para a circulação sanguínea (PIERRE, 2002). No processo final de maturação, os reticulócitos perdem todas as organelas, têm o volume ligeiramente reduzido e adquirem o formato bicôncavo e a coloração citoplasmática própria dos eritrócitos maduros. Neste ponto, cessa a síntese protéica e perdem também qualquer capacidade de metabolismo aeróbico, restringindo-se a metabolização da glicose pela via de Embden-Meyerhoff (geração de ácido láctico) e pelo *shunt* das pentoses (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004).

A produção de células vermelhas é estritamente regulada, a fim de manter um hematócrito de 40 a 45%, concentração em que a oferta de oxigênio aos tecidos é ótima (RILEY, BEN-EZRA e TIDWELL, 2001). Aproximadamente 2 milhões de reticulócitos são produzidos a cada segundo, porém a produção pode ser aumentada em cerca de 20 vezes em caso de anemia severa (AN e MOHANDAS, 2011).

A contagem de reticulócitos no sangue periférico fornece informações sobre a integridade funcional da medula óssea. Em pacientes com quadro de anemia que apresentam reticulocitose, a eritropoiese na medula óssea mostra-se eficaz e responde às terapias específicas. Entretanto, em pacientes com quadro de anemia que apresentam um número diminuído de reticulócitos na circulação, ou reticulocitopenia, a eritropoiese é ineficaz e pode estar associada a outros fatores. Além de avaliar a evolução desses pacientes, a contagem de reticulócitos promove o monitoramento da regeneração da atividade medular após quimioterapia ou transplante de medula óssea (LEE *et al.*, 1999).

A maioria das técnicas laboratoriais para contagem de reticulócitos são baseadas na detecção de RNA (reticulina) no citoplasma dos reticulócitos. Desde o final dos anos 1940 até o início dos anos 1980, a enumeração de reticulócitos foi realizada através da análise microscópica de extensões sanguíneas coradas pela

coloração supravital. O desenvolvimento de corantes fluorescentes específicos para RNA na década de 1980 possibilitou a utilização de citômetros de fluxo para contagem de reticulócitos com elevada exatidão e precisão. O desenvolvimento de citômetros de fluxo dedicados à enumeração de reticulócitos revelou-se como uma alternativa à microscopia ótica para laboratórios com alto volume de contagens de reticulócitos. A análise por citometria de fluxo proporcionou informações clínicas valiosas que não eram disponíveis pela microscopia de luz. Com a recente incorporação da citometria de fluxo nos analisadores hematológicos, a contagem de reticulócitos assim como parâmetros derivados tornaram-se parte da rotina laboratorial. Análise de reticulócitos com fluorocromo marcados com anticorpos monoclonais contra receptores de superfície de reticulócitos já estão disponíveis para estudos de investigação dos reticulócitos e doenças do erythron (RILEY *et al.*, 2001).

Este trabalho teve por objetivo revisar as técnicas laboratoriais de enumeração de reticulócitos e a aplicação clínica da contagem de reticulócitos e dos parâmetros reticulocitários derivados.

2. CONTAGEM MANUAL

A contagem manual de reticulócitos baseia-se na observação microscópica dos restos de RNA ribossomal evidenciados por colorações supravitalis. Esta técnica de coloração foi descrita por Brecher em 1949 (BRECHER, 1949) e o termo supravital é utilizado, pois a técnica consiste em corar as células vivas antes de serem fixadas. O corante atravessa a membrana do eritrócito e precipita-se sobre as organelas, formando estruturas reticuladas que permitem a visualização ao microscópio óptico (BAIN, 2004; ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004). Geralmente cerca de 1000 eritrócitos são examinados em uma área bem corada e com distribuição celular adequada para que a proporção de reticulócitos seja então determinada.

De acordo com a quantidade de retículo visualizada, os reticulócitos podem ser classificados em diferentes estágios de maturação, assim, células com grandes quantidades de retículo são consideradas mais jovens ou imaturas e, à medida que o retículo diminui, os reticulócitos são considerados mais velhos ou maduros (LEE *et al.*, 1999). Em 1932, Heilmeyer e Westhaeuser definiram os estágios de maturação dos reticulócitos e a proporção relativa em que se encontram em indivíduos normais. Nesta classificação, o estágio zero representa o eritroblasto ortocromático, não sendo incluído na contagem de reticulócitos e os estágios I, II, III e IV representam diferentes graus de maturação dos reticulócitos, sendo o estágio I mais imaturo e o estágio IV o mais maduro. Os estágios III e IV constituem mais de 90% dos reticulócitos presentes na circulação sanguínea de indivíduos normais (PIERRE, 2002).

A definição de reticulócitos já foi revisada inúmeras vezes desde sua primeira descrição em 1865, por Wilhelm H. Erb. A classificação de Heilmeyer, apesar de ter sido amplamente aceita, deixava dúvidas em relação a quantos grânulos seriam necessários para que a célula fosse considerada um reticulócito (PIERRE, 2002). A fim de se obter uma padronização na definição morfológica dos reticulócitos, o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (agora chamado de *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) e o *International Council for Standardization in Hematology* (NCCLS-ICSH) adotou em 2004, no documento H44-A2, a definição de reticulócitos como sendo células que apresentam no mínimo dois grânulos corados de azul, visíveis sem ajuste fino do microscópio e longe da margem celular (NCCLS, 2004; PIERRE, 2002; PIVA *et al.*, 2010).

O RNA responsável pela formação do retículo na coloração supravital provoca ligeiros traços de basofilia quando se utiliza preparações de Romanowski (BAIN, 2004). O metanol utilizado para a fixação atravessa a membrana celular eritróide e solubiliza o conteúdo de RNA ribossomal presente no citoplasma, conferindo uma basofilia citoplasmática difusa (SILVA, HASHIMOTO e ALVES, 2009). Essa basofilia associada à acidofilia da hemoglobina produz uma coloração característica conhecida por policromatofilia (BAIN, 2004). A presença de policromatofilia em extensões sanguíneas preparadas com corantes de Romanowski sugere uma elevada contagem de reticulócitos (PIERRE, 2002).

Contudo, o número de células policromatófilas não deve substituir a contagem de reticulócitos. Dados de um estudo realizado por Crouch e Kaplow (1985) indicam que somente os reticulócitos nos estágios I, II e III de Heilmeyer possuem quantidade suficiente de RNA para produzir policromatofilia, quando coradas com preparações de Romanowski. Assim, a contagem de reticulócitos pode ser subestimada se baseada no número de células com policromatofilia.

Apesar de ser a metodologia padrão para contagem de reticulócitos desde o final da década de 1940 (PIVA *et al.*, 2010), a técnica manual é bastante imprecisa e sofre interferência de vários fatores. A variabilidade inter-observadores na identificação morfológica, o tamanho da amostra (número total de células contadas), variações na coloração e a qualidade da extensão sanguínea constituem as principais fontes de imprecisão na contagem manual de reticulócitos (PIVA *et al.*, 2010; PIERRE, 2002; (RILEY, BEN-EZRA e TIDWELL, 2001; PIERRE, 2002; PIVA *et al.*, 2010).

É fundamental avaliar um número suficiente de células vermelhas para assegurar que a contagem seja adequada. Piva *et al.* (2010) citam em seu trabalho o número de células a serem contadas para se alcançar uma imprecisão aceitável em diferentes porcentagens de reticulócitos, de acordo com as especificações do NCCLS-ICSH (Tabela 1).

Em rotinas laboratoriais é aceitável um coeficiente de variação de 10%, sendo o tamanho mínimo da amostra de eritrócitos a ser analisada de 1000 células (PIVA *et al.*, 2010). Para facilitar a contagem e melhorar a precisão da análise manual de reticulócitos, é recomendada a utilização da ocular de Miller. Este instrumento delimita a área de contagem em um quadrado grande, no qual está contido um quadrado pequeno que tem um nono do tamanho do quadrado maior (Figura 1). Os reticulócitos são contados, em cada campo, no quadrado grande, enquanto que os eritrócitos são contados no quadrado pequeno, totalizando vinte campos consecutivos (BAIN, 2004). Utilizando a ocular de Miller o número de eritrócitos contados pode-se reduzir a um nono da quantidade listada na tabela 1. Quando este instrumento é utilizado a porcentagem de reticulócitos é calculada da seguinte forma:

$$\frac{\text{reticulócitos em 20 quadrados grandes} \times 100}{\text{eritrócitos em 20 quadrados pequenos} \times 9}$$

Tabela 1. Número de eritrócitos a serem contados para se obter uma imprecisão aceitável em várias porcentagens de reticulócitos (H44-A2 citado por Piva *et al.*, 2010).

Reticulócitos (%)	Número de eritrócitos a serem contados para um coeficiente de variação de 5%	Número de eritrócitos a serem contados para um coeficiente de variação de 10%
1	39.600	9900
2	19.600	4900
5	7.600	1900
10	3.600	900
20	1.600	400
50	400	100

Em geral, a imprecisão é inversamente proporcional ao número de eritrócitos contados e a porcentagem de reticulócitos presentes na amostra.

O método descrito no documento H44-A2 do NCCLS-ICSH para contagem manual de reticulócitos tem sido recomendado como o método de referência para avaliar o desempenho analítico de metodologias automatizadas (PIERRE, 2002; PIVA *et al.*, 2010).

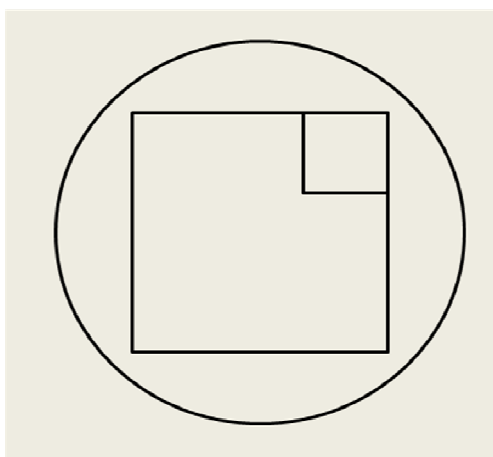


Figura 1. Aparência da ocular de Miller, recomendada para a contagem de reticulócitos.

A contagem de reticulócitos é geralmente relatada na forma de porcentagem, ou seja, reticulócitos pelo total de hemácias examinadas. A porcentagem média normal da contagem de reticulócitos pela microscopia ótica é de 1,0%-1,5%, com 3% sendo o limite superior do normal. A contagem relativa de reticulócitos é

enganosa quando a contagem de eritrócitos é anormal ou quando uma estimulação eritropoiética na medula óssea esteja acontecendo, como nas anemias severas. Nestas circunstâncias, correções matemáticas devem ser aplicadas à contagem relativa. Como classificado por Koepke e Koepke (1986), essas correções incluem o seguinte: correções baseadas no volume globular e correções de desvio maturativo.

A correção baseada no volume globular é aplicada a amostras de pacientes anêmicos para compensar a diminuição das hemácias maduras. O volume globular corrige a contagem relativa de reticulócitos para um volume globular normal (45%), utilizando a seguinte fórmula: Índice reticulocitário = contagem de reticulócitos (%) x volume globular do paciente/45

Um método mais preciso para corrigir os efeitos da anemia é calcular o número absoluto de reticulócitos: Contagem de reticulócitos absoluta = contagem de reticulócitos (%) x contagem de hemácia ($\times 10^6/\mu\text{l}$)/100.

A contagem absoluta de reticulócitos situa-se normalmente entre 50 e 150 mil reticulócitos / μl . A correção do desvio maturativo é aplicada a contagens relativas de reticulócitos de pacientes submetidos a intensa estimulação eritropoiética. Nestas circunstâncias, macroreticulócitos jovens e basofílicos (células de desvio maturativo) da medula óssea são liberados prematuramente para o sangue periférico, causando um encurtamento do tempo de maturação de reticulócitos na medula óssea (algumas vezes menor que 1 dia), mas um longo tempo de maturação dos reticulócitos no sangue periférico. Uma vez que os macroreticulócitos possuem um diâmetro cerca de 25% maior que o de eritrócitos normais, uma correção para o tempo de maturação e o hematócrito devem ser feitas quando eles compreendem mais de 5% do total de reticulócitos (KOEPEKE e KOEPKE, 1986; RILEY *et al.*, 2001).

A contagem corrigida ("índice de produção de reticulócitos ") é calculado pela seguinte fórmula: IPR = Contagem relativa de reticulócitos observada x (volume globular do paciente/45)/tempo de maturação do reticulócito no sangue periférico.

Infelizmente, a suposição de uma relação linear entre o hematócrito e o tempo de maturação de reticulócitos é correta apenas em pacientes com um sistema hematopoiético intacto. Se a produção de eritropoietina é prejudicada, ou se a medula óssea não responder adequadamente a um aumento dos níveis de

eritropoietina, a contagem de reticulócitos será inadequadamente baixa e o índice de produção de reticulócitos será incorreto.

3. CONTAGEM AUTOMATIZADA

A contagem automatizada de reticulócitos, utilizando corantes fluorescentes RNA-específicos, tornou-se possível na década de 1980 com o desenvolvimento do citômetro de fluxo. Posteriormente, o desenvolvimento de citômetros de fluxo dedicados a contagem de reticulócitos proporcionou uma alternativa à microscopia para laboratórios com um grande volume de amostras (RILEY, BEN-EZRA e TIDWELL, 2001). Em meados da década de 1990, com a integração da análise de reticulócitos às contagens globais de células sanguíneas em analisadores hematológicos automatizados, contagens mais precisas puderam ser incorporadas como parte da rotina de avaliação hematológica (PIVA *et al.*, 2010).

Métodos totalmente automatizados possuem a vantagem de aumentar substancialmente a precisão e sensibilidade das contagens, uma vez que o número de células analisadas é muito maior se comparado ao método manual (cerca de 10 vezes mais), eliminar fontes de imprecisão inerentes à metodologia manual, além de diminuir o tempo de execução. A maior sensibilidade e precisão tornaram possível fornecer contagens confiáveis mesmo em amostras com uma porcentagem muito pequena de reticulócitos, o que não era possível pelo método manual (BUTTARELLO *et al.*, 2001; PIVA *et al.*, 2010).

A primeira tecnologia disponível para contagem de reticulócitos em analisadores hematológicos foi desenvolvida pela *Beckman Coulter Inc.* com os equipamentos STKS®, MAXM® e MAXM A/L (RILEY, BEN-EZRA e TIDWELL, 2001). Essas primeiras gerações de analisadores eram semi-automatizadas e utilizavam como corante o azul de metileno novo. Atualmente inúmeros analisadores hematológicos totalmente automatizados estão disponíveis no mercado e, além da contagem absoluta e percentual de reticulócitos, fornecem índices celulares e parâmetros reticulocitários como conteúdo e concentração de hemoglobina, volume,

variação de tamanho e grau de maturação. A tabela 2 fornece detalhes sobre os analisadores automatizados de última geração, totalmente automatizados, e os parâmetros fornecidos.

Tabela 2. Estado da arte das capacidades analíticas de reticulócitos para a maioria dos analisadores hematológicos. Princípios de metodologia, técnicas e parâmetros fornecidos (adaptado de Piva *et al.*, 2010).

Fabricante	Equipamento	Método	Corante	Parâmetros reticulocitários fornecidos
Beckman Coulter Inc.	UniCel DxH 800	Citometria de fluxo – análise digital utilizando diferentes ângulos de detecção de dispersão luminosa, impedância, radiofrequência	Azul de metileno novo	IRF, MRV, HLR, RDWR-CV, RDWR-SD, MSCV, LHD, RSF, MAF
	Coulter LH 700 series (780, 785, 750)	Dispersão luminosa, impedância e condutividade	Azul de metileno novo	IRF, MRV, RDWR-CV, RDWR-SD, HLR, MSCV, RSF, MAF
	Coulter LH 500	Dispersão luminosa, impedância e condutividade	Azul de metileno novo	IRF, MRV, MSCV
Abbott	CELL DYN Sapphire	Deteção de fluorescência	<i>Cyanine</i> (Sybr II)	IRF
Horiba	ABX Pentra DX 120	Tecnologia de impedância e deteção de fluorescência	<i>Thiazole orange</i>	IRF, MRV, RETH%, RETM%, RETL%, IMM%, MFI%, CRC%
Siemens	ADVIA 2120	Absorbância e dispersão luminosa	<i>Oxazine 750</i>	IRF, MCVr, CHR, CHCMr, RDWr, HDWr, CHDWr, H-RET%, M-RET%, L-RET%
Sysmex	XE 5000, XT 4000i	Fluorescência e dispersão luminosa	<i>Polymethine</i>	IRF, Ret-He, RBC-He, Micro-R, Macro-R, LScRBC, HScRBC, DELTA-He, RPI
	XE 2100, XT 2000i	Fluorescência e dispersão luminosa	<i>Polymethine</i>	IRF, Ret-He, RPI

IRF: fração de reticulócitos imaturos; MRV: volume reticulocitário médio; HLR: reticulócitos de alta dispersão luminosa; RDWR-CV,SD: amplitude de distribuição dos reticulócitos – coeficiente de variação, desvio padrão; MSCV: volume médio das células vermelhas esferizadas; LHD: baixa densidade de hemoglobina; MAF: fator de anemia microcítica; RETH, RETM, RETL: reticulócitos de alta, média e baixa fluorescência; IMM: reticulócitos imaturos; MFI: índice de fluorescência média; CRC: contagem de reticulócitos corrigida; H-RET, M-RET, L-RET: reticulócitos de alta, média e baixa absorbância; Ret-He: equivalente de hemoglobina dos reticulócitos; RBC-He: equivalente de hemoglobina das células vermelhas; MicroR: fração de células vermelhas microcíticas; MacroR: fração de células vermelhas macrocíticas; LScRBC: fração de células vermelhas de baixa dispersão; HScRBC: fração de células vermelhas de alta dispersão; DELTA-He: equivalente de hemoglobina delta; RPI: índice de produção de reticulócitos.

Um estudo comparando o desempenho de cinco analisadores hematológicos automatizados, com opção para contagem de reticulócitos, com a metodologia manual de referência, estabelecida pelo NCCLS-ICSH no documento H44-A, obteve resultados satisfatórios para todos os métodos testados. Os analisadores estudados estão listados na tabela 3. Todos os métodos apresentaram, em todas as concentrações de reticulócitos, uma imprecisão menor do que a avaliação microscópica, apesar de ter sido observado um aumento na imprecisão em amostras com baixa concentração de reticulócitos. Excelentes resultados de imprecisão foram observados em todos os métodos, tanto em concentrações normais com em elevadas de reticulócitos. Quando os métodos automatizados foram comparados entre si, melhores resultados foram obtidos do que quando comparados com a metodologia manual de referência, apesar de ter sido observada uma tendência a superestimar em amostras com baixas contagens, mas ainda mantendo uma sensibilidade satisfatória. O estudo também confirmou a diversidade dos valores de referência para metodologias diferentes (BUTTARELLO *et al.*, 2001).

Tabela 3. Analisadores hematológicos testados por Buttarello *et al.* (2001).

Equipamento	Fabricante	Corante	Método
ADVIA 120	Bayer Diagnostics ¹	<i>Oxazine 750</i>	Absorbância
CELL DYN 4000	Abbott	CD4K530	Fluorescência
GEN-S	Beckman Colter	Azul de metileno novo	Dispersão luminosa
SE 9500 RET	Sysmex	Auramina O	Fluorescência
VEGA RETIC²	Horiba	<i>Thiazole orange</i>	Fluorescência

Fatores que contribuem para a discordância dos resultados obtidos por diferentes analisadores incluem a diferença na sensibilidade do corante utilizado, a tecnologia empregada para identificar células positivas (fluorescência, absorbância, dispersão luminosa) e o *software* que pode possuir maior ou menor capacidade de

¹ A Bayer Healthcare's diagnostic division foi adquirida pela Siemens Medical Solutions em julho de 2006. A partir de janeiro de 2007 a fusão da Bayer Diagnostics e Diagnostic Products Corporation (DPC) deu origem à Siemens Healthcare Diagnostics.

² Atualmente chamado de ABX Pentra 120.

separar os reticulócitos dos eritrócitos e demais células. Todos estes fatores contribuem para a necessidade de se estabelecer intervalos de referência método-específicos (BUTTARELLO *et al.*, 2001).

A dificuldade de se obter um material de calibração que seja estável ao longo do tempo e que possa ser utilizado por todos os métodos também contribui para a variação dos resultados fornecidos pelas diferentes metodologias disponíveis comercialmente. A utilização de sangue fresco como calibrador, material ideal para a contagem de reticulócitos, possui como limitações: a falta de estabilidade, pois os reticulócitos continuam no processo de maturação, alterando sua concentração ao longo do tempo; a falta de um método de referência universalmente aceito para medida da concentração de reticulócitos; e os procedimentos de calibração que são estritamente dependentes do fabricante e não podem ser facilmente modificados pelo usuário (BUTTARELLO *et al.*, 2001).

Com base nestes dados, compreende-se que seja obrigatória a utilização da mesma metodologia em certas situações clínicas em que a contagem de reticulócitos é utilizada para monitorar pacientes com severa reticulopenia, como nos casos de aplasia medular ou monitoramento de reposta eritropoiética precoce. Nestas situações é crucial um baixo nível de imprecisão e uma metodologia bastante sensível.

3.1. Parâmetros de maturação e índices celulares

Heilmeyer e Westhaeuser propuseram uma classificação dos estágios de maturação de reticulócitos baseada no padrão de coloração supravital, que reflete a quantidade de RNA celular e, portanto, o estágio maturativo. Porém, na prática laboratorial, esta classificação dificilmente é utilizada, devido ao elevado grau de subjetividade na identificação e separação nos graus de maturação propostos e a baixa precisão e reprodutibilidade dos resultados (PIERRE, 2002).

Com a automação na contagem de reticulócitos e a disponibilidade de novos corantes e fluorocromos, a separação em graus de maturação se tornou muito mais

precisa e reprodutível. A avaliação do estágio de maturação é baseada na intensidade de fluorescência emitida ou absorção de luz pelo reticulócito, e/ou dispersão luminosa, que é proporcional ao conteúdo de RNA. Apesar das diferentes metodologias, existe uma concordância na classificação do grau de maturação em três estágios: reticulócitos de alta, média e baixa imaturidade (RILEY, BEN-EZRA e TIDWELL, 2001; PIERRE, 2002; PIVA *et al.*, 2010). A fração de reticulócitos imaturos (IRF) é um termo descritivo recomendado no documento H44-A para substituir o termo anteriormente utilizado, índice de maturação de reticulócitos (RMI). O IRF é definido como a soma das populações de alta e média fluorescência e tem se tornado o termo internacionalmente aceito para indicar a fração mínima de reticulócitos imaturos (PIVA *et al.*, 2010).

Alguns equipamentos fornecem medidas dos índices celulares reticulocitários, entre os principais estão o volume reticulocitário médio (MCVr), variação de tamanho (RDWr) e conteúdo de hemoglobina (CHr ou Ret-He). Dependendo do equipamento utilizado, o conteúdo de hemoglobina do reticulócito recebe denominações diferentes. O CHr (conteúdo médio de hemoglobina do reticulócito) é fornecido pelos analisadores hematológicos ADVIA 120 e 2120 (*Siemens*), e foi aprovado em 1997 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso clínico nos Estados Unidos. A partir de 2005, um parâmetro equivalente ao CHr passou a estar disponível, o Ret-He (equivalente de hemoglobina dos reticulócitos) que é fornecido pelos equipamentos XE-2100 e XE-5000 (*Sysmex Corporation, Japão*) (BRUGNARA, SCHILLER e MORAN, 2006).

Um estudo realizado por Brugnara, Schiller e Moran (2006) comparou os resultados das determinações de conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos fornecidos pelos equipamentos ADVIA 2120 e Sysmex XE 2100, em adultos e crianças, obtendo um bom nível de concordância entre estes parâmetros fornecidos pelos diferentes analisadores ($r^2=0,88$).

3.2. Aplicações clínicas dos parâmetros e índices fornecidos

A contagem de reticulócitos já é amplamente estabelecida e utilizada para monitorar a eritropoiese. Constitui um fator importante no diagnóstico, classificação e monitorização do tratamento das anemias, na confirmação da regeneração da medula óssea após quimioterapia ou transplante, e na monitorização da terapêutica com eritropoetina humana recombinante. Atualmente os analisadores hematológicos fornecem inúmeros parâmetros que podem auxiliar no diagnóstico e monitoramento de várias patologias e condições clínicas. Apesar disso, os parâmetros fornecidos pelos equipamentos automatizados ainda são pouco utilizados na prática clínica. Segundo dados provenientes de uma pesquisa realizada no Hospital Universitário de Cleveland (Estados Unidos), a maioria dos médicos entrevistados relataram que utilizam somente a contagem absoluta e relativa de reticulócitos. Uma divulgação prévia por parte dos laboratórios sobre o significado de cada um dos novos parâmetros lançados ou a adequação na maneira de reportar os resultados poderia minimizar as falhas ou ausência de interpretação de vários dados fornecidos pelo hemograma (SANDHAUS e MEYER, 2002).

3.2.1. Monitoramento de resposta eritropoiética precoce

A contagem de reticulócitos e a determinação de sua fração de imaturidade têm se mostrado ser satisfatórias na avaliação da eritropoiese após o transplante de medula óssea (TMO). A recuperação do tecido hematopoiético após ablação da medula óssea é iniciada pelo compartimento eritróide. Estudos recentes demonstram que uma elevação na população de reticulócitos imaturos é o primeiro sinal da recuperação hematopoiética pós TMO, e pode ser útil como um preditor adicional do enxerto medular (NORONHA, 2002).

Em um estudo de Torres *et al.* (2001) envolvendo 60 pacientes submetidos ao TMO autólogo ou alogênico, uma elevação na população de reticulócitos imaturos foi detectada mais precocemente do que os neutrófilos, demonstrando ser uma ferramenta útil na prática clínica. Resultados semelhantes foram obtidos por

Gonçalo *et al.* (2011) quando compararam o IRF e a fração de plaquetas imaturas (IPR) com as contagens de neutrófilos e plaquetas.

3.2.2. Diagnóstico precoce de deficiência de ferro

A anemia por deficiência de ferro é uma das doenças mais comuns do mundo e na maioria dos casos é diagnosticada pela presença de anemia microcítica hipocrômica e evidência bioquímica de depleção dos estoques de ferro mensurada por marcadores bioquímicos clássicos como ferro sérico, saturação de transferrina e ferritina. Porém, em algumas condições clínicas estes marcadores clássicos podem não fornecer uma evidência precoce ou não se alteram rápido o suficiente para refletir estados transitórios de deficiência de ferro (BRUGNARA, 2003).

Estudos recentes sugerem que a determinação do conteúdo de hemoglobina do reticulócito pode fornecer um indicativo precoce de deficiência de ferro, por proporcionar uma medida da disponibilidade deste metal para as células vermelhas recentemente produzidas pela medula óssea (MAST *et al.*, 2002).

No processo de maturação do reticulócito, a concentração de hemoglobina aumenta gradualmente, enquanto o volume celular diminui. Assim, o CHr, produto da concentração de hemoglobina e volume celular, é um parâmetro mais estável do que a concentração reticulocitária de hemoglobina para avaliar a disponibilidade de ferro (MAST *et al.*, 2002).

Mast *et al.* (2002) analisaram os resultados séricos de CHr, ferritina, saturação de transferrina e VCM de 78 pacientes submetidos a avaliação de medula óssea. Dentre estes testes, excluindo-se pacientes com VCM acima de 100 fL e portadores de distúrbios de série vermelha, o CHr apresentou a maior sensibilidade e especificidade global para prever a ausência de reservas de ferro medular.

A utilidade do CHr também é sugerida como um parâmetro de controle da terapia com eritropoetina humana recombinante (r-HuEPO), utilizada principalmente em pacientes com doença renal avançada (FISHBANE *et al.*, 1997; BRUGNARA, 2003). O aumento na eritropoiese, induzido pela administração de r-HuEPO, não

consegue ser sustentado pela disponibilidade normal de ferro e uma eritropoiese prejudicada pela diminuição da incorporação de ferro à hemoglobina, chamada deficiência funcional de ferro, pode se desenvolver, necessitando de alteração na dose da eritropoetina ou administração de suplementos de ferro intravenoso (BRUGNARA, 2003). O desenvolvimento desta deficiência de ferro é acompanhada por alterações precoces e significativas no CHr, bem como na resposta a terapia com ferro intravenoso (FISHBANE *et al.*, 1997; BRUGNARA, 2003).

4. CONCLUSÕES

A contagem de reticulócitos foi realizada durante várias décadas por microscopia de luz, com o uso de um corante supravital (azul de metileno novo), que se liga ao RNA dos reticulócitos. No entanto, a exatidão e a precisão deste ensaio são bastante comprometidas devido ao seu caráter subjetivo e pelo número limitado de células (200-1.000) que são contadas normalmente pelos laboratoristas em um período de tempo razoável. Em contrapartida, técnicas automatizadas de enumeração de reticulócitos são mais precisas, exatas e de baixo custo, uma vez que 30.000 ou mais células podem ser avaliadas com precisão em um período curto de tempo. A automação na contagem de reticulócitos trouxe avanços inegáveis para a avaliação da eritropoiese, na medida em que aumenta a reprodutibilidade e precisão e diminui consideravelmente o tempo de análise para o exame solicitado. A tendência recente de incorporar a análise de reticulócitos nos analisadores hematológicos de rotina fará com que a contagem automatizada de reticulócitos seja cada vez mais comum. No entanto, uma vez que os resultados de análise de reticulócitos automatizados são influenciados pela metodologia analítica, sensibilidade do corante em corar RNA e a capacidade de discriminação entre reticulócitos e eritrócitos do *software* empregado, intervalos de referência método específicos são necessários. Uma padronização entre as metodologias disponíveis facilitaria a interpretação dos resultados e melhoraria a confiabilidade do exame, principalmente em condições clínicas específicas, como na aplasia medular e

monitoramento de resposta eritropoiética precoce, onde uma pequena variação nos resultados pode ser determinante para a conduta clínica. Vários estudos demonstram a aplicação clínica dos novos parâmetros reticulocitários fornecidos pelos analisadores hematológicos, porém uma maior divulgação de sua utilidade clínica se faz necessária bem como uma adequação na forma como os resultados são reportados, de modo a evitar erros de interpretação ou mesmo a não utilização destes dados. Talvez em alguns anos a contagem manual de reticulócitos irá se tornar uma coisa do passado.

REFERÊNCIAS

AN, X.; MOHANDAS, N. Erythroblastic islands terminal erythroid differentiation and reticulocyte maturation. **Int J Hematol**, v. 93, p. 139-143, 2011.

BAIN, J. B. **Células sanguíneas: um guia prático**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BRUGNARA, C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 1573-1578, 2003.

BRUGNARA, C.; SCHILLER, B.; MORAN, J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states. **Clin. Lab. Haem**, v. 28, p. 303-308, 2006.

BUTTARELLO, M. *et al.* Flow cytometric reticulocyte counting - parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. **Am J Clin Phatol**, v. 115, p. 100-111, 2001.

CHASIS, J. A.; MOHANDAS, N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 470-478, 2008.

CROUCH, J. Y.; KAPLOW, L. S. Relationship of reticulocyte age to polychromasia, shift cells, and shift reticulocytes. **Arch Pathol Lab Med**, v. 109, n. 4, p. 325-329, 1985. Resumo.

ERB, W. Entwicklungsgeschichte der rothen blutkörperchen. **Virchows Arch**, v. 34, p. 138, 1865

FISHBANE, S. *et al.* Reticulocyte hemoglobin content in the evaluation of iron status of hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 52, p. 217-222, 1997.

GONÇALO, A. P. *et al.* Predictive value of immature reticulocyte and platelet fractions in hematopoietic recovery of allograft patients. **Transplantation proceedings**, v. 43, p. 241-243, 2011.

LEE, G. R. *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10. ed. Baltimore: Lippincott William's & Wilkins, 1999.

LIPPI, G. *et al.* Stability of blood cell counts, hematologic parameters and reticulocytes indexes on the Advia A120 hematologic analyzer. **J Lab Clin Med**, v. 146, p. 333-340, 2005.

MAST, A. E. *et al.* Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. **Blood**, v. 99, n. 4, p. 1489-1491, 2002.

NCCLS. Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline—Second Edition. NCCLS document H44-A2 (ISBN 1-56238-527-5). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

NORONHA, J. F. A. Reticulócitos imaturos como preditores precoces do sucesso do enxertamento no transplante de medula óssea alogênico e autólogo. **Rev. bras. hematol. Hemoter**, v. 24, n. 1, p. 61-62, 2002. Resumo de tese.

PIERRE, R. V. Reticulocytes: their usefulness and measurement in peripheral blood. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 22, n. 1, p. 63-79, 2002.

PIVA, E. *et al.* Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. **Clin Chem Lab Med**, v. 48, n. 10, p. 1369-1380, 2010.

RILEY, R. S.; BEN-EZRA, J. M.; GOEL, R.; TIDWELL, A. Reticulocytes and reticulocytes enumeration. **J Clin Lab Anal**, v. 15, p. 267-294, 2001.

RILEY, R. S.; BEN-EZRA, J. M.; TIDWELL, A. Reticulocyte enumeration: past & present. **Laboratorymedicine**, v. 32, n. 10, p. 599-608, 2001.

SANDHAUS, L. M.; MEYER, P. How useful are CBC and reticulocyte reports to clinicians? **Am J Clin Pathol**, v. 118, p. 787-793, 2002.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; ALVES, H. B. **Hematologia Laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.

TORRES, A. *et al.* Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Haematologica**, v. 86, n. 1, p. 24-29, 2001.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.