

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

GABRIELA SUTHOVSKI

**CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM AUTOMATIZADA DE RETICULÓCITOS E
A QUANTIFICAÇÃO DA POLICROMATOFILIA NA EXTENSÃO SANGUÍNEA**

**CURITIBA
2016**

GABRIELA SUTHOVSKI

**CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM AUTOMATIZADA DE RETICULÓCITOS E
A QUANTIFICAÇÃO DA POLICROMATOFILIA NA EXTENSÃO SANGUÍNEA**

Artigo apresentado junto ao Curso de Especialização em Análises Clínicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Railson Henneberg

Co-orientador: Profa. Dra. Juliana Spezia

CURITIBA

2016

RESUMO

Como os eritrócitos policromatófilos correspondem aos reticulócitos, tanto a policromatofilia quanto a contagem de reticulócitos são considerados marcadores importantes de atividade medular. A avaliação da policromatofilia na extensão sanguínea pela microscopia ótica e sua quantificação pelo sistema em cruzes é uma técnica imprecisa e subjetiva, pois dificilmente consegue distinguir todos os estágios de maturação dos reticulócitos. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo comparar a contagem automatizada de reticulócitos (parâmetros reticulocitários) com a quantificação ótica da policromatofilia em extensões sanguíneas. Foram analisadas 71 extensões sanguíneas confeccionadas de maneira automatizada pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 (Toa Medical Eletronics Inc) obtidas da rotina de um laboratório de análises clínicas. O critério de inclusão das amostras foi a liberação da informação “policromatofilia” no laudo do hemograma. Todas as lâminas foram reclassificadas quanto à presença da policromatofilia, por três observadores com no mínimo dois anos de experiência, e a presença da policromatofilia foi quantificada de acordo com a porcentagem de eritrócitos policromatófilos encontrados em 1000 eritrócitos. Do total das amostras, 43 (60,5%) apresentaram CPR% entre 0 e 4%, e a fração de maturidade reticulocitária predominante foi a de baixa fluorescência (LRF), com mediana de 79%. Avaliando as leituras manuais para a quantificação da policromatofilia, o nível de correlação entre os observadores foi razoável com coeficientes de variação extremos. A correlação entre a CPR% e a quantificação da policromatofilia foi boa, porém estratificando as CPR% entre contagens de 0 a 2% e 2 a 5%, a correlação apresentada foi ruim. Contagens acima de 5% demonstraram melhor correlação ($r = 0,8184$). Nossos resultados podem ser em parte explicados pelos critérios de seleção das amostras, os quais foram baseados em critérios morfológicos, que pela sua subjetividade pode influenciar nos resultados obtidos. Em resumo, o presente trabalho atesta a grande dificuldade que os laboratórios clínicos encontram na padronização da leitura de suas extensões sanguíneas, sendo este um grande motivo para que a correlação entre a quantificação da policromatofilia com a contagem de reticulócitos seja realizada de modo criterioso, para evitar erros diagnósticos importantes.

Palavras-chave: Reticulócitos; Frações Reticulocitárias; Policromatofilia.

ABSTRACT

As polychromatophilic erythrocytes corresponding to reticulocytes, both polychromatophilia as the reticulocyte count are considered important markers of bone marrow activity. The evaluation of polychromatophilia in blood extent by optical microscopy and quantification by the “crosses system” is an imprecise and subjective technique, because it can hardly distinguish all stages of maturation of reticulocytes. In this context, this study aims to compare the automated counting of reticulocytes (reticulocyte parameters) with the optical quantification of polychromatophilia blood extension. They analyzed 71 blood smears made in an automated manner by hematology analyzer Sysmex XE-5000 (Toa Medical Electronics Inc) obtained from a routine clinical laboratory. The inclusion criteria of the samples was the release of polychromatophilia information on the CBC report. All slides were reclassified as the presence of polychromatophilia by three observers with at least two years of experience, the presence of polychromatophilia was quantified according to the percentage of polychromatophilic erythrocytes found in 1000 erythrocytes. Of the total samples, 43 (60.5%) had CPR% between 0 and 4%, and the predominant reticulocyte maturity fraction was low fluorescence (LRF), with a median of 79%. Evaluating the manual readings for the quantitation of polychromatophilia, the level of correlation between the observers was reasonable to extreme variation coefficients. The correlation between CPR% and quantification of polychromatophilia was good, but stratifying CPR counts from 0% to 2% and 2 to 5% shows a correlation bad. Scores above 5% showed better correlation ($r = 0.8184$). Our findings may be explained in part by the sample selection criteria, which are based on morphological criteria, which subjectivity may influence the results obtained. In summary, this study attests to the great difficulty that clinical laboratories are in the standardization of reading their blood smears, which is a big reason for the correlation between the quantification of polychromatophilia with the reticulocyte count be performed in a wise manner, to prevent serious diagnostic errors.

Keywords: Reticulocyte; Reticulocyte Fractions; Polychromatophilia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frequência das Contagens Percentuais de Reticulócitos (CPR%) obtidas no Analisador Hematológico Sysmex XE-5000.....	11
Figura 2 - Correlação geral entre a Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) e Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) (10 campos/1000).....	12
Figura 3 - Correlação entre Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) de 2 a 5% e a Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) (10 campos/1000)..	13
Figura 4 - Correlação entre a Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) acima de 5% e a Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) (10 campos/1000).....	13
Figura 5 - Correlação entre o IRF (%) e Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) (10 campos/1000)	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média, Mediana, Valores Mínimos e Máximos, Desvio Padrão e Erro Padrão das Contagens Automatizadas Realizadas pelo Analisador Sysmex XE-5000 da Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) e para as Frações de Imaturidade dos Reticulócitos – LFR (%), MFR (%), HFR (%) e IRF (%)	11
Tabela 2 - Média, Mediana, Valores Mínimos e Máximos, e o Coeficiente de Variação da Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) realizada pelos três observadores do estudo.	12
Tabela 3 - Correlação entre a Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) e a Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP).	13
Tabela 4 - Quantificação em cruces da policromatofilia em relação à porcentagem de eritrócitos policromatófilos encontrados, baseado nos critérios publicados por PALMER <i>et al</i> (2015) e CONSTANTINO (2014).	14

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO GERAL	9
2.1. Objetivos Específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
4. RESULTADOS	11
5. DISCUSSÃO	15
6. CONCLUSÃO	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

1. INTRODUÇÃO

A presença da policromatofilia na extensão sanguínea está associada com anemias hemolíticas, regeneração medular e resposta ao tratamento de anemias carenciais. A sua quantificação, em geral, é baseada no número de eritrócitos policromatófilos encontrados por campo microscópico (SILVA *et al*, 2015). Como os eritrócitos policromatófilos correspondem aos reticulócitos, tanto a policromatofilia quanto a contagem de reticulócitos são considerados marcadores importantes de atividade medular (CONSTANTINO, 2014; PERROTA; FINCH, 1972; PIERRE, 2002).

A determinação da policromatofilia é realizada através da microscopia ótica após coloração hematológica, que segue o princípio de Romanowski (SILVA *et al*, 2015). Esses corantes possuem metanol na sua formulação, que penetra nos reticulócitos e promove a dissolução do RNA ribossomal residual, conferindo à célula coloração suavemente basofílica, arroxeadada, conhecida como policromatofilia (HROBIN, 2011; PALMER *et al*, 2015; RILEY *et al*, 2001; PIVA *et al*, 2015).

Dentre as limitações da determinação da policromatofilia destaca-se o tempo de maturação do reticulócitos. Uma dura realidade pode ser resumida nesta frase “os policromatófilos são reticulócitos, mas nem todos os reticulócitos aparecem como eritrócitos policromatófilos” (PIVA *et al*, 2015). Desta maneira, a avaliação da policromatofilia na extensão sanguínea pela microscopia ótica e sua quantificação pelo sistema em cruzes é uma técnica imprecisa e subjetiva, pois dificilmente consegue distinguir todos os estágios de maturação dos reticulócitos (RILEY *et al*, 2001; NCCLS, 2004; BRIGGS *et al*, 2014; HROBIN, 2011).

A importância da contagem de reticulócitos é óbvia em razão da relevância da informação que ela possui no entendimento dos mecanismos de instalação e curso das anemias. Apesar do advento da contagem automatizada dos reticulócitos, a avaliação da policromatofilia na extensão sanguínea ainda é realizada na maioria dos laboratórios clínicos. Alguns estudos procuram padronizar a quantificação da policromatofilia (PALMER *et al*, 2015; CONSTANTINO, 2014), porém estudos que avaliam a sua correlação, em humanos, com a contagem automatizada de reticulócitos é muito escassa.

O analisador hematológico Sysmex XE-5000 (Toa Medical Electronics Inc.) realiza a diferenciação celular através de citometria de fluxo de alta resolução analisando de forma eficiente e reprodutível tanto a contagem, como os estágios de maturação dos reticulócitos (BORQUE; ESCANERO; URRECHAGA, 2009; PIVA *et al*, 2010). No canal de RET / PLT-O, o surfactante em *RET-SEARCH* (II) perfura levemente as membranas celulares dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, o que permite a penetração do marcador de fluorescência na célula. O marcador de fluorescência, então, se liga aos ácidos nucléicos dos leucócitos, eritroblastos, reticulócitos e plaquetas. Usando o sinal de dispersão da luz frontal e do sinal de fluorescência, os reticulócitos podem ser separados dos eritrócitos, leucócitos e eritroblastos (BAIN, 2009; SYSMEX, 2016; BRIGGS *et al*, 2011; BUTTARELLO *et al*, 2001).

Devido às diferenças metodológicas empregadas na avaliação dos reticulócitos e da policromatofilia, é necessário aprofundar o conhecimento na determinação destes parâmetros a fim de melhorar a qualidade nos resultados liberados pelos serviços de saúde.

2. OBJETIVO GERAL

- Comparar a contagem automatizada de reticulócitos (parâmetros reticulocitários) com a quantificação ótica da policromatofilia em extensões sanguíneas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a quantificação padronizada da policromatofilia proposta por Palmer *et al* (2015) e Constantino (2014) em extensões sanguíneas pela microscopia ótica;
- Correlacionar a contagem automatizada porcentual dos reticulócitos e as frações de imaturidade do reticulócito liberadas pelo analisador de hematologia Sysmex XE-5000 com a quantificação padronizada da policromatofilia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 71 extensões sanguíneas confeccionadas de maneira automatizada pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 (Toa Medical Electronics Inc.). O local do serviço laboratorial no qual as amostras foram obtidas, por questões éticas, será mantido em sigilo (CAAE 50129915.1.0000.0102). O único critério utilizado para inclusão das extensões sanguíneas no estudo foi a liberação da informação *policromatofilia* no laudo do hemograma.

Após a seleção, todos os dados hematológicos provenientes das extensões sanguíneas foram compilados em planilhas automatizadas. Avaliou-se todos os dados do eritrograma, a contagem percentual de reticulócitos e as frações de imaturidade: Fração Reticulócitos de Baixa Fluorescência (LFR), Reticulócitos de Média Fluorescência (MFR) e Reticulócitos de Alta Fluorescência (HFR), além da Fração de Reticulócitos Imaturos (IRF), que corresponde à soma da MFR com a HFR.

Todas as lâminas foram reclassificadas quanto à presença da policromatofilia, por três observadores com no mínimo dois anos de experiência e que não tiveram nenhum contato com os resultados prévios liberados pela Seção de Hematologia do serviço laboratorial. As releituras das lâminas foram realizadas no Laboratório Clínico Escola da UFPR, e a presença da policromatofilia foi quantificada de acordo com a porcentagem de eritrócitos policromatófilos encontrados em 1000 eritrócitos.

Os resultados obtidos através da análise microscópica foram comparados com as contagens automatizadas de reticulócitos obtidas pelo analisador automático Sysmex XE-5000. Posteriormente, os dados foram analisados estatisticamente para obtenção dos valores médios, mediana, valores mínimos e máximos e coeficiente de variação. Foi aplicado também o coeficiente de correlação de Pearson pelo programa estatístico GraphPad Prism 6.0, considerando-se significância estatística para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

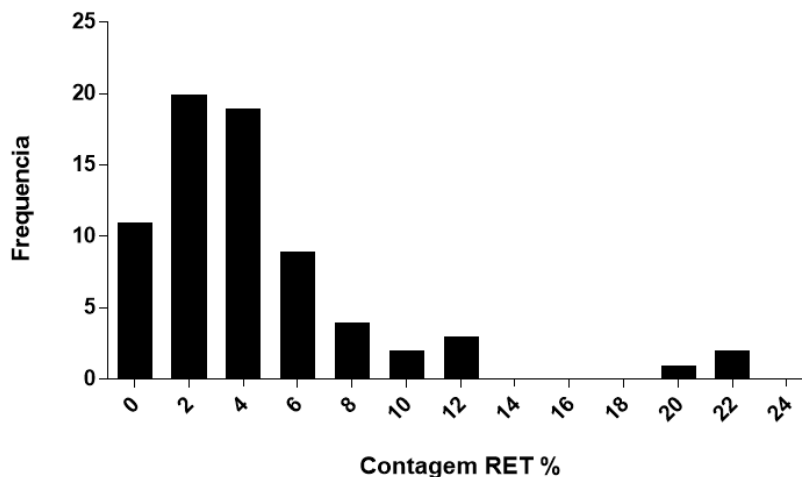
A Tabela 1 demonstra os dados gerais relacionados ao reticulocitograma obtido no analisador Sysmex XE – 5000. A Figura 1 ilustra a distribuição da Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) nas amostras estudadas, com predomínio de contagens entre 0 a 4% (43 amostras).

Tabela 1 - Média, Mediana, Valores Mínimos e Máximos, Desvio Padrão e Erro Padrão das Contagens Automatizadas Realizadas pelo Analisador Sysmex XE-5000 da Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) e para as Frações de Imaturidade dos Reticulócitos – LFR (%), MFR (%), HFR (%) e IRF (%)

	CPR	LFR (%)	MFR (%)	HFR (%)	IRF (%)
Valor Mínimo	0,28	52,4	2,0	0,0	2,300
25% Percentil	1,82	71,1	8,9	1,4	11,20
Mediana	3,34	79,8	14,2	5,0	20,20
75% Percentil	5,4	88,8	18,6	10,1	28,90
Valor Máximo	22,3	97,7	25	25,2	47,60
Média	4,57	79,70	13,86	6,42	20,69
Desvio Padrão	4,547	11,01	5,99	5,83	11,03
Erro Padrão	0,54	1,30	0,71	0,69	1,309

NOTA: LFR (%) = Fração reticulocitária de baixa fluorescência
MFR (%) = Fração reticulocitária de média fluorescência
HFR (%) = Fração reticulocitária de média fluorescência
IRF (%) = Índice de Imaturidade dos Reticulócitos

Figura 1 - Frequência das Contagens Percentuais de Reticulócitos (CPR) obtidas no Analisador Hematológico Sysmex XE-5000.



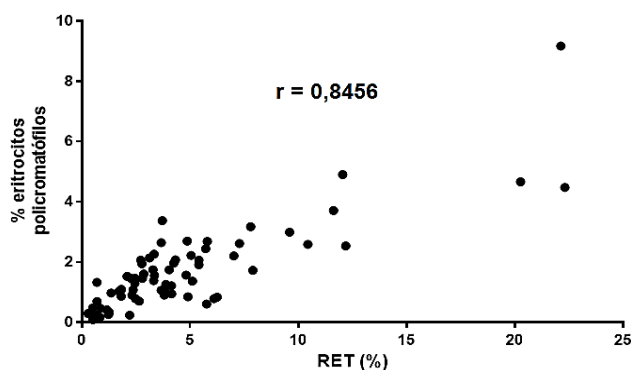
A Contagem Percentual dos Eritrócitos Policromatófilos (CPP) realizada foi estatisticamente diferente entre os observadores ($p < 0,001$) com um coeficiente de variação extremo nas contagens realizadas (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 2 - Média, Mediana, Valores Mínimos e Máximos, e o Coeficiente de Variação da Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) realizada pelos três observadores do estudo.

	OBS 1	OBS 2	OBS 3
Valor Mínimo	0,0	0,0	0,0
25% Percentil	0,65	0,50	0,66
Mediana	1,5	1,04	1,34
75% Percentil	3,02	1,55	1,94
Valor Máximo	18,18	4,35	4,97
Média	2,30	1,14	1,52
Desvio Padrão	2,74	0,84	1,10
C.V.	119,01%	73,95%	72,34%

NOTA: OBS= observador

Figura 2 – Correlação geral entre a Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) e a Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) (10 campos/1000).



Com relação às frações de imaturidade reticulocitária, 36 amostras (50,7%) apresentavam contagens percentuais da fração de baixa fluorescência (LFR) entre 52,4% e 80%, 19 amostras (26,7%) entre 80 a 90%, e 16 amostras (22,6%) acima de 90%. Apenas 19 amostras (26,7%) apresentaram porcentagens da fração de alta fluorescência (HRF) acima de 10%.

Avaliando os dados pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) foi verificado que no âmbito geral a CPR e a CPP apresentaram boa correlação ($r =$

0,85). Porém estratificando os valores da CPR entre 0 a 2%, 2 a 5% e acima de 5% a correlação foi pequena (Tabela 3 e Figuras 2, 3 e 4). A análise da significância foi realizada pelo teste T-pareado com $p > 0,05$.

Tabela 3 – Correlação entre a Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) e a Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP).

	<i>R</i>	n=	<i>p</i> -value
RET Geral	0,85	71	sim (>0,05)
RET 0-2%	0,57	18	sim (>0,05)
RET 2-5%	0,28	32	não (>0,05)
RET acima de 5%	0,82	21	sim (>0,05)

Figura 3 – Correlação entre a Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) de 2 a 5% e Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) (10 campos/1000).

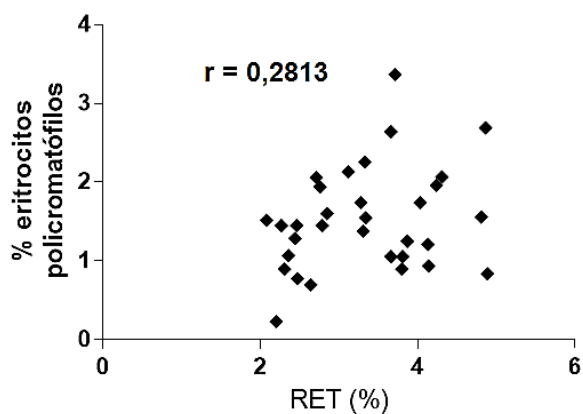
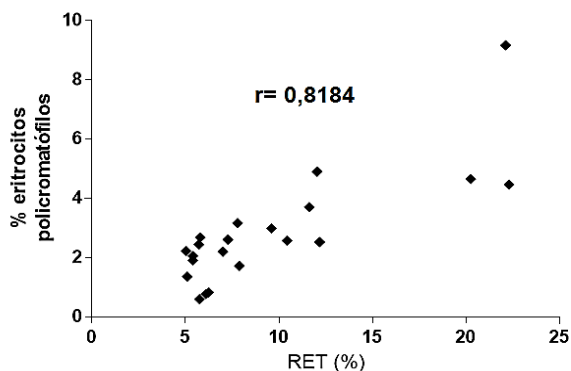


Figura 4 – Correlação entre a Contagem Percentual de Reticulócitos (CPR) acima de 5% e a Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) (10 campos/1000).



Comparando as porcentagens encontradas com os protocolos de classificação da série vermelha baseado nos trabalhos realizados por Palmer e

colaboradores (2015), observou-se que apenas em 6 amostras a informação “policromatofilia” seria colocada. Utilizando os critérios de classificação preconizada por Constantino (2014), 27 amostras teriam no mínimo a quantificação de policromatofilia 1+.

Tabela 4 – Quantificação em cruzes da policromatofilia em relação à porcentagem de eritrócitos policromatófilos encontrados, baseado nos critérios publicados por PALMER *et al* (2015) e CONSTANTINO (2014).

<i>Critério</i>	NA	1+	2+	3+
<i>Palmer et al (2015)</i>				
OBS. 1	65	0	6	0
OBS. 2	71	0	0	0
OBS. 3	71	0	0	0
<i>Constantino (2014)</i>				
OBS. 1	58	9	4	0
OBS. 2	67	4	0	0
OBS. 3	61	10	0	0

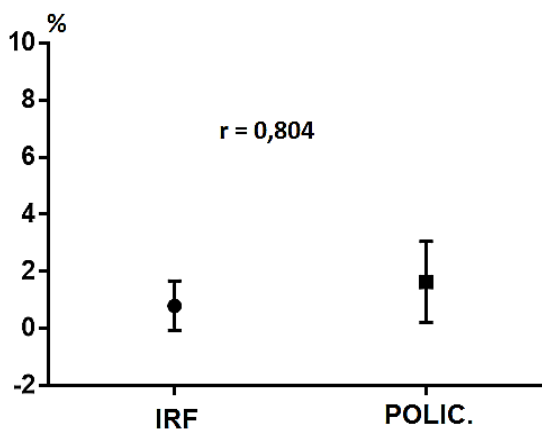
NOTA:

Critérios publicados por Palmer *et al* (2015): Policromatofilia 2+ (entre 5 a 20% de eritrócitos policromáticos); Policromatofilia 3+ (acima de 20% de eritrócitos policromáticos).

Critérios publicados por Constantino (2014): Policromatofilia 1+ (entre 3 a 5% de eritrócitos policromáticos); Policromatofilia 2+ (entre 5 a 20%); Policromatofilia 3+ (acima de 20% de eritrócitos policromáticos).

A Figura 5 ilustra a correlação entre o IRF (%) com a CPP encontrados pela microscopia ótica, onde a correlação encontrada foi satisfatória. O IRF (%) utilizado na Figura 5 corresponde à porcentagem de reticulócitos imaturos em relação a porcentagem total de reticulócitos.

Figura 5 – Correlação entre o IRF (%) e a Contagem Percentual de Eritrócitos Policromatófilos (CPP) (10 campos/1000).



5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a amostragem foi obtida com base em critérios morfológicos, ou seja, hemogramas liberado após avaliação de um profissional pela presença de policromatofilia. A Seção de Hematologia do laboratório avaliado possui um protocolo interno de quantificação de policromatofilia (não divulgado), o qual serviu de base para a seleção das amostras.

O valor de referência da CPR varia principalmente de acordo com o corante utilizado e o tipo de tecnologia do analisador hematológico. Utilizando o analisador Cell-Dyn 3500, Müllera *et al* (2015) publicaram valores de normalidade entre 0,85 a 2,80%, enquanto Buttarello *et al*(1996), utilizando os equipamentos Coulter Maxm e Sysmex R-1000, encontraram valores entre 0.37 a 1.80 % e 0.60 a 1.95%, respectivamente. Neste contexto de valores, a média da CPR no presente estudo (4,57%), com predomínio da Fração Reticulocitária de Baixa Imaturidade (LFR), ilustra valores percentuais acima da normalidade. A maioria das amostras variou suas contagens entre 0 a 4% (43 amostras), sendo que apenas 4 amostras apresentaram contagens acima de 10% e 2 amostras acima de 20%.

Essa característica da amostragem pode ser explicada pelos critérios de liberação da policromatofilia, visto que a seleção das amostras se baseou em critérios morfológicos, que pela sua subjetividade pode influenciar nos resultados obtidos. Mesmo com protocolos internos de classificação, a dependência da acuidade visual quanto à cor das células policromatófilas pode ser um limitador quanto a precisão da sua determinação. Outro fator que deve ser ponderado refere-se à técnica de contagem das células policromatófilas em relação ao número de eritrócitos contados, que por ser trabalhosa nem sempre é realizada pelos profissionais, mesmo com protocolos pré-estabelecidos.

Além disso, o laboratório avaliado atende a um hospital de alta complexidade e especialidades, como neoplasias hematológicas, hemoglobinopatias e pacientes transplantados, o que torna a interpretação dos dados mais complexa. Como exemplo, das amostras estudadas, 18 eram oriundas do setor de hematologia-oncologia, 6 amostras proviam de pacientes que passaram por transplante de medula óssea e 4 amostras pertenciam a pacientes em tratamento

quimioterápico (dados não apresentados). Foram avaliadas ainda, amostras dos setores de infectologia, unidades de terapia intensiva, reumatologia e ambulatório.

Apesar das CPR acima da normalidade, curiosamente, aplicando-se a CPP para a classificação da policromatofilia em cruces, na maioria das amostras, a observação policromatofilia não seria liberada na reclassificação padronizada (Tabela 4). Este quadro pode ser explicado novamente pela característica amostral, onde as frações de baixa imaturidade predominaram. Uma vez que apenas os reticulócitos mais imaturos (HFR) possuem RNA suficiente para aparecerem como células policromatófilas, a observação da policromatofilia é obviamente menor. Esse dado reforça o relato de que a CPP é, em geral, menor que a CPR (BESSMAN, 1990; COLLICUT, 2012; CROUCH; KAPLOW, 1985; PIVA *et al*, 2015).

A CPR e a CPP apresentaram forte correlação (Figura 2). Porém, estratificando a CPR, a correlação apresentou resultados diferentes. No grupo de CPR entre 0 a 2% e nas amostras entre 2 a 5% a correlação foi fraca, o que sinaliza que nestas situações a policromatofilia não deve ser utilizada como parâmetro para estimar a CPR. No grupo de CPR acima de 5%, a correlação foi forte, indicando que a policromatofilia pode ser significativa na extensão sanguínea (Figura 4).

Os reticulócitos classificados como *estressados*, são células jovens liberadas em quadros de anemias severas (RILEY *et al*, 2001; RILEY *et al*, 2002; PIVA *et al*, 2015), que estariam correlacionados com a fração de alta fluorescência (HFR). Em relação às amostras analisadas, apenas 15 amostras apresentaram hemoglobina abaixo de 8 g/dL (dados não apresentados) e somente 21 amostras continham porcentagens das frações de alta fluorescência acima de 10%. Portanto, a característica amostral poderia mais uma vez explicar a baixa correlação encontrada entre a CPR e a CPP. Este quadro ficou mais evidenciado nas contagens de reticulócitos entre 2 a 5% (Tabela 3 e Figura 3).

Os coeficientes de variação encontrados nas CPP (Tabela 2) comprovam a dificuldade já relatada na quantificação da policromatofilia de maneira padronizada (NCCLS, 2004; CONSTANTINO, 2014; PALMER *et al*, 2015). Desta forma, a presença de uma policromatofilia bastante evidente pode indicar tanto um processo hemolítico quanto uma recuperação medular, porém sua correlação com a porcentagem reticulocitária deve ser evitada (HOROBIN, 2011; RILEY *et al*, 2002; PIERRE, 2002).

Crouch e Kaplow (1985) sugerem que as células policromatófilas correspondem aos reticulócitos em estágio de maturação I e II (MFR e HFR), denominadas pelos autores como “*shift reticulocyte*”, que normalmente não estão na corrente sanguínea. Os valores médios de LFR encontrados no presente estudo, indicam que grande parte das amostras apresentou reticulócitos já em fase final de maturação, cuja coloração é semelhante ao eritrócito maduro, diminuindo a identificação da policromatofilia na reclassificação das extensões sanguíneas (PIVA *et al*, 2010; PIERRE, 2002) podendo servir de explicação também para a forte correlação entre o IRF e a CPP% (Figura 5).

Cabe ressaltar que em todas as lâminas, no sistema de reclassificação, foram observadas células policromatófilas; porém na aplicação da CPP, em grande parte das amostras, a quantidade de células policromatófilas não foi suficientemente significativa para se enquadrar nos sistema de classificação baseados nos protocolos de Palmer *et al* (2015) e Constantino (2014) (Tabela 4). Diante disto, algumas hipóteses podem ser avaliadas quanto ao processo de seleção das amostras do presente estudo.

Dentre os fatores a serem avaliados, podemos destacar: (1) a policromatofilia pode ter sido liberada basicamente pela presença de algumas células policromatófilas e não por uma contagem propriamente dita, não seguindo o protocolo do próprio setor; (2) a falta de treinamento e comunicação na quantificação da policromatofilia dentro da equipe do laboratório e (3) a própria subjetividade de identificação, que mesmo com padronização, pode influenciar na quantificação da policromatofilia.

Os resultados obtidos reafirmam as dificuldades que os laboratórios clínicos possuem na padronização da leitura de suas extensões sanguíneas (PALMER, 2015; SILVA *et al*, 2015; NCCLS, 2004). A quantificação da policromatofilia pode ser útil em alguns casos, porém sua correlação com a contagem de reticulócitos deve ser desestimulada. Contagens baixas de reticulócitos, com predomínio das frações de alta fluorescência podem apresentar policromatofilia mais evidente do que em situações com contagens elevadas de reticulócitos, porém com predomínio de frações de baixa fluorescência (BESSMAN, 1990).

O presente estudo não tem a pretensão de encerrar a discussão sobre o assunto e mais trabalhos devem ser realizados com outras metodologias de seleção de amostras, porém levanta questões importantes que devem ser avaliadas pelos

laboratórios na liberação dos seus laudos, bem como pelos clínicos na interpretação destes dados.

6. CONCLUSÃO

A atribuição da policromatofilia, apesar de amplamente utilizada laboratorialmente, pode não refletir o real estado do paciente devido à subjetividade na sua avaliação. No presente estudo, três diferentes observadores reavaliaram as extensões sanguíneas, o que expôs a baixa sensibilidade e imprecisão desse tipo de avaliação visual. Quando comparadas ao analisador hematológico, visualizou-se de maneira mais contundente o quão distante está a atribuição da policromatofilia do seu real significado na prática, que é justamente inferir a quantidade de reticulócitos em uma amostra. Sendo assim, mais estudos são necessários a fim de obter uma melhor utilização dos recursos laboratoriais, como os novos parâmetros liberados pelos analisadores hematológicos, também visando melhorar a qualidade técnica e padronização de leituras laboratoriais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

BESSMAN, J.D. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW. **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. 3. ed. Boston, MA: Butterworths, p.735-738, 1990.

BORQUE, L.; ESCANERO, J. F.; URRECHAGA, E. Potential utility of the new Sysmex XE-5000 red blood cell extended parameters in the study of disorders of iron metabolism. **Clin Chem and Lab Med**, v. 47, n. 11, p. 14-11. 2009.

BRIGGS, C. *et al.* Improved Flagging Rates on the Sysmex XE-5000 Compared With the Sysmex XE-2100 Reduce the Number of Manual Film Reviews and Increased Laboratory Productivity. **Am J Clin Pathol**. v. 136, p. 309-316. 2011.

BRIGGS, C. *et al.* ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. **Int J Lab Hematol**. v. 36, p. 598-612. 2014.

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

BUTTARELLO, M. *et al.* Reticulocyte quantification by Coulter MAXM VCS (volume, conductivity, light scatter) technology. **Clin Chem**. v.42, n.12, p.1930-1937. 1996.

CONSTANTINO, B. T. Reporting and grading of abnormal red blood cell morphology. **Int Jnl Lab Hem**. v. 37, p. 1-7. 2014.

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.

HOROBIN, R. W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotech Histochem**. v. 86, n. 1, p. 36-51. 2011.

MÜLLERA, K.M. *et al.* Avaliação de Valores de Normalidade da Contagem de Reticulócitos Utilizando o Contador Hematológico Cell-Dyn 3500. **UNICIÊNCIAS**. v. 17, n. 1, p. 33-36. 2013.

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, Suite1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

PALMER, L. *et al.* ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. **Int J Lab Hematol.** v. 37, p. 287-303. 2015.

PERROTA, A. L., FINCH, C.A. The polychromatic erythrocyte. **Am J Clin Pathol.** v. 57, n. 4, p. 471-477. 1972.

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.

PIVA, E.; *et al.* Clinical Utility of Reticulocyte Parameters. **Clin Lab Med.** v. 35, p. 133-163. 2015.

RILEY, R. S. *et al.* Reticulocyte Enumeration: Past & Present. **Laboratory Medicine.** v. 32, n. 10, p. 599-608. 2001.

RILEY, R. S. *et al.* Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. **Hematol Oncol Clin N Am.** v. 16, p. 373-420. 2002.

SILVA *et al.* **Hematologia Laboratorial – Teoria e Procedimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2015.

SYSMEX CORPORATION. **Academy Technology.** Disponível em <http://www.sysmex-europe.com/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/ret-channel.html>. Acesso em 26/02/2016.