



ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA E BANCO DE
SANGUE

TAOANE LAÍS DE FREITAS

COMPARATIVO DE TÉCNICAS PARA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2015

RESUMO

A contagem de reticulócitos no sangue periférico é largamente solicitada aos laboratórios, quando há necessidade de avaliar a integridade da medula óssea. Os reticulócitos são precursores eritróides recém liberados na circulação, ainda possuem RNA ribossômico em suas estruturas, e de acordo com a sua quantificação em sangue periférico é possível diagnosticar, classificar e monitorar tratamentos de anemias. A contagem de reticulócitos também propicia o monitoramento da regeneração da atividade medular pós quimioterapia e pós transplante de medula. Podem ser empregadas duas metodologias para realizar a contagem, manual e automatizada. Desde a década de 1940 a contagem manual é tida como padrão ouro, ocorre que com novas tecnologias a partir da década de 1990 surgiram analisadores que ofereciam maior precisão, sensibilidade além de fornecer parâmetros reticulocitários que não podem ser obtidos na contagem manual, como a fração de reticulócitos imaturos (IRF) que é tida como marcador precoce da recuperação hematopoiética pós transplante, e o conteúdo de hemoglobina (Ret-He) que indica a quantidade de ferro disponível para os eritrócitos produzidos recentemente pela medula, é útil para identificar precocemente deficiência de ferro. Em suma os reticulocitos são corados com azul de metileno novo ou azul de cresil brilhante a 1%, em microscópio óptico é evidenciado a característica de retículo a fragmentos de RNA. Ambas metodologias seguem o protocolo *H44-A do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* e o *International Committee for Standards in Hematology (ICSH)*. Laboratórios de pequeno porte comumente optam pela técnica manual, principalmente pelo alto custo dos reagentes específicos. As contagens feitas por citometria de fluxo demandam menor tempo com maior precisão isso por ser possível contar mais células com menores chances de erro. Existem equipamentos que determinam concentração de hemoglobina, volume, e maturação dos reticulócitos, que evidencia o tipo de produção eritrocitária da medula óssea. O objetivo desse trabalho foi comparar metodologias manual e automatizada para contagem de reticulócitos, e a viabilidade de cada técnica.

Palavras chave: Contagem de reticulócitos, medula óssea, metodologia.

1 INTRODUÇÃO

Reticulócitos são eritrócitos imaturos no estágio final de diferenciação celular, Wilhelm H. Erb em 1865 registrou pela primeira vez a observação desta célula, a qual descreveu como grânulos em glóbulos vermelhos tratados com ácido pícrico ou acético (ERB, 1865).

A nomenclatura deriva das características da célula que após receber tratamentos com corantes supra- vitais tais como azul de metileno novo ou azul de cresil brilhante transformam os fragmentos de ácido ribonucleico (restos de RNA ribossomal) em uma fina rede reticular ou grânulos dispersos (PIERRE,2002;PIVA *et al.*, 2010)

A técnica manual de contagem de reticulócitos é a mais utilizada em laboratórios clínicos, consiste na observação microscópica dos restos de RNA ribossomal evidenciados por coloração supra- vital. Tendo como referencia o protocolo H44-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards- NCCLS* (FERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

Recentemente a metodologia automatizada tem ganhado espaço, visando agilidade e precisão. Com essa técnica além de contar- se um numero muito maior de células há redução na possibilidade de erro, a técnica possui algumas limitações porem seu maior obstáculo é o alto custo (STIENE- MARTIN *et al.*, 1998).

Dentre os ônus em utilizar a técnica manual é considerável o maior gasto de tempo no preparo da amostra para leitura, a suscetibilidade da leitura a erros do observador tais como: baixo numero de células contadas, artefatos da coloração, variação na coloração dos reticulocitos devido ao tempo de incubação, discriminação visual entre os reticulócitos, e alta variabilidade de resultados entre observadores (RILEY *et al.*, 2001).

Esse trabalho propõe avaliar a relevância das técnicas disponíveis segundo estudos, reunindo dados sobre ambas as técnicas por diferentes pesquisadores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RETICULÓCITOS

Reticulócitos são em média 20% maiores que os eritrócitos, não possuem núcleo e mantêm no citoplasma alguns vestígios do retículo endoplasmático, ribossomos e mitocôndrias.. A extrusão do núcleo realizada pelo eritroblasto ortocromático ao fim da diferenciação eritróide origina o reticulócito (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004; NA e MOHANDAS, 2011). O reticulócito mesmo sem núcleo produz hemoglobina, isso devido a presença de RNA mensageiro em seu citoplasma (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004).

Até a maturação o reticulócito demora cerca de 4 dias, os três primeiros ocorrem na medula óssea e depois são liberados na circulação (PIERRE, 2002). Por fim, os reticulócitos perdem todas as organelas e diminuem de tamanho, passam a ter forma bicôncava e coloração característica de eritrócitos maduros (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2004).

Cerca de 2 milhões de reticulócitos são produzidos por segundo, visando manter o hematócrito de 40% a 45%, a produção de reticulócitos pode chegar a 20 vezes o valor normal em caso de anemia severa (NA e MOHANDAS, 2011).

Grânulos de RNS podem ser evidenciados quando a amostra é tratada com corantes supra vitais como por exemplo azul de cresil brilhante, azul de metileno novo e alguns marcadores fluorescentes (BANFI, 2008). Como as colorações supra vitais não requerem fixação prévia diminuem as chances de artefatos (LEE *et al.*, 1999).

Dentre as técnicas para contagem de reticulócitos se resumem a detectar o RNA (reticulina) no citoplasma dos reticulócitos. Desde a década de 40 a contagem é manual e realizada através da análise microscópica de extensões sanguíneas coradas com corantes supra vitais. Na década de 80 surgiram os primeiros corantes fluorescentes específicos para RNA sendo possível utilizar o citometro de fluxo na contagem elevando a precisão e proporcionando informações preciosas que a microscopia impossibilitava. Atualmente citometria de fluxo foi anexada a contadores hematológicos permitindo a realização do reticulocitograma como rotina hematológica (RILEY *et al.*, 2001).

2.2 CONTAGEM

A contagem de reticulócitos é considerada a prova mais sensível para observar a eritropoiese (FERNANDEZ *et al.*, 2007). Os parâmetros para contagem são: homens e crianças- 0,5 a 2,5%, mulheres – 0,5 a 4,0 %, recém- nascidos- 2,0 a 5,0%. Quando elevado indica que a produção de eritrócito é eficaz frente ao estímulo, dado importante na avaliação de resposta terapêutica. Os valores aumentarão em hemorragias agudas, ou destruição eritrocitária aumentada, terapias com ferro ou folatos. Na anemia falciforme os reticulócitos podem estar de 5 a 30% vezes acima do valor de referencia. A reticulopenia por sua vez, ocorre quando a

eritropoiese é ineficiente como em doença hemolítica auto- imune, alcoolismo e mixedema (WALLACH, 1999).

2.2.1 CONTAGEM MANUAL

A metodologia manual consiste em precipitar restos de RNA ribossomal por meio do corante supra vital. Uma gota de sangue é misturada a uma gota do corante, incubada por dez minutos , é realizado esfregaço que após secar a temperatura ambiente é lida em microscópio de luz (RILEY *et al.*, 2002). A contagem é realizada no aumento de 1.000 vezes, devendo observar a reprodutibilidade considerando campos onde há maior quantidade de campos com eritrócitos contando os reticulócitos, porem devem ser contados campos consecutivos. Como alternativa para o método manual existe o método com o disco de Miller calibrado, anexado a ocular sendo dois quadrados um dentro do outro, os reticulocitos são contados no quadrado maior e os eritrócitos no menor, utilizando esse método deve-se multiplicar os eritrócitos por 9 (LEWIS *et al.*, 2006).

Na contagem manual é possível realizar através de fórmulas a contagem corrigida de reticulócitos (contagem absoluta = contagem de reticulocitos em lamina x numero de hemácias) sendo os valores de referencia entre 50 e 150 mil reticulócitos/ microlitros. Existe também o índice de produção de reticulócitos (IPR= Contagem em lamina x (volume globular do paciente/ 45) / tempo de maturação do reticulócito no sangue periférico. Porem a relação do hematócrito com o tempo de maturação do reticulócito é válida somente em pessoas com sistema hematopoiético intacto.

2.2.1 CONTAGEM AUTOMATIZADA

Técnicas totalmente automatizadas aumentam a sensibilidade das contagens pois analisam muito mais células que a técnica manual. Certos equipamentos disponibilizam informações como volume, concentração de hemoglobinae maturidade, tais dados não são possíveis na análise manual (ZANDECKI *et al.*, 2006).

A contagem pode ser realizada de duas formas, pela dispersão da luz por meio de canais de raio laser, que utiliza corante supra vital, e pela emissão de fluorescência em canal espectrofotométrico de fluorocromos (VAN HOVE 2001).

Aparelhos que realizam contagem por marcadores fluorescentes separam os reticulócitos por quantidade de granulações em três grupos relacionando-os com o grau de maturação: alta maturidade, que possuem menor quantidade de granulação, baixa maturidade, que possuem maior quantidade de granulações, e média maturidade com quantidade intermediaria de granulação. Sendo que reticulócitos com baixa e média maturidade compõem a fração dos reticulócitos imaturos (IRF). A automação também fornece o volume reticulocitário médio, que é o tamanho dos reticulócitos circulantes, importante em anemias micro e macrocíticas (NASCIMENTO, 2004). Essas informações podem auxiliar na detecção precoce de

rejeição pós transplante de medula óssea (BRUGNARA *et al.*, 1997) e em quimioterapia (D'ONOFRIO *et al.*, 1995).

A primeira tecnologia de automação para reticulocitograma foi disponibilizada pela Beckman Coulter Inc. com os aparelhos STKS, MAXM e MAXM A/L (RILEY, BEM-EZRA e TIDWELL, 2001) eles eram semi- automatizados e coravam com o azul de metileno novo. Hoje há inúmeros equipamentos totalmente automatizados disponíveis.

Um comparativo de desempenho entre cinco contadores automáticos e a metodologia manual, obteve bons resultados quando comparado a manual. Todos os contadores automáticos apresentaram uma imprecisão menor entre si que a avaliação manual. Comparando os métodos automatizados a metodologia manual, embora tenha havido uma superestimação dos valores com baixas contagens a sensibilidade foi satisfatória BUTTARELLO *et al.*, 2001).

3 CONCLUSÕES

Embora a contagem manual venha sendo utilizada há muito tempo sua exatidão é comprometida devido a susceptibilidade a erros e imprecisão, devido ao baixo numero de células contadas e a habilidade do observador. Em contrapartida, a metodologia automatizada é mais precisa e oferece maior agilidade além de avaliar mais de 30.000 células. Além da facilidade de observar outros parâmetros importantes na investigação de e tratamento de anemias. Existem atualmente estudos que demonstram novos parâmetros reticulocitários disponibilizados pelos contadores automatizados, há ainda porém a necessidade de popularizar a utilização de tais equipamentos tanto no aspecto financeiro como científico.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BANFI, G; MORELLI, P. Relation between values of haemoglobin, erythrocytes and reticulocytes and body mass index in elite athletes of different sports disciplines. *International Journal of Laboratory Hematology*, England, v. 29, n. 6, p. 484-485, 2008.

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

BRUGNARA, C.; ZELMANOVIC, D.; SORETTE, M.; BALLAS, S. K.; PLATT, O. Reticulocyte Hemoglobin: An Integrated Parameter for Evaluation of Erythropoietic Activity. *American Journal Clinical Pathology*, USA, vol. 108, p: 133-142, 1997.

D'ONOFRIO, G.; CHIRILLO, R.; ZINI, G.; CAENARO, G.; TOMMASI, M.; MICCIULLI, G. Simultaneous Measurement of Reticulocyte and Red Blood Cell Indices in Healthy Subjects and Patients With Microcytic and Macrocytic Anemia. *Blood*, USA, v. 85, n. 3, p: 818-823, 1995.

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

FERNANDÉZ, L. H. GALLARDO, A.; GARCIA, G. Evaluación del recuento de reticulocitos por el sistema Coulter GEN-S. *Academia Biomédica Digital*, Facultad de Medicina – Universidade Central da Venezuela, nº 30, Enero-Marzo: 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. Avaliação da Conformidade, Comitês e Educação para Qualidade. Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br/>> Acesso em 15 de setembro de 2008.

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

LEWIS, S. M.; BAIN, B.; BATES, I. *Hematologia Prática*. 9. ed. São Paulo: Artmed, 2006.

NASCIMENTO, M. L. P. Importância do Volume Reticulocitário Médio para a Evidência da Macrocitose. *NewsLab*, São Paulo, v. 66, p. 130-145, 2004.

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.

PASQUINI, R. Transplante de Medula Óssea em Anemia Aplástica. Medicina, Ribeirão Preto, v. 33, p. 209-231, 2000.

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.

VAN HOVE, L.; SCHISANO, T.; BRACE, L. Anemia Diagnosis, Classification, and Monitoring Using Cell-Dyn Technology Reviewed for the New Millennium. Laboratory Hematology, USA, V.6 p. 93-108, 2000.

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

WALACH, J. Interpretação de Exames de Laboratório, 6. ed., Rio de Janeiro: Medsi, p. 358 e 404, 1999.