
CONTEÚDO DE HEMOGLOBINA DO RETICULÓCITO NO DIAGNÓSTICO DA DEFICIÊNCIA DE FERRO

RETICULOCYTE HEMOGLOBIN CONTENT IN THE DIAGNOSIS OF IRON DEFICIENCY

MONTEIRO¹, F. S. ; CARVALHO², L. F. S.; COMERON², J. D.; SPEZIA³, J. ; HENNEBERG⁴, R.

1 - Pós-graduanda em Hematologia Clínica – Especialização do Instituto Brasileiro da Saúde -IBRAS

2 - Docente do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná - UFPR

3 - Farmacêutica Bioquímica, Mestre em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná

4 - Farmacêutico Bioquímico, Doutor em Ciências Farmacêuticas, orientador - Universidade Federal do Paraná

Autor para correspondência: francinubia@hotmail.com

RESUMO:

A contagem de reticulócitos no sangue periférico fornece informações sobre a atividade eritropoiética, a qual só pode ser mantida pela disponibilidade suficiente de ferro à medula óssea para produção de hemoglobina. A quantidade de hemoglobina contida nos reticulócitos pode servir de indicador da eritropoiese, sendo utilizada para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com anemias por deficiência de ferro. O presente trabalho tem como objetivo pesquisar a aplicabilidade do conteúdo de hemoglobina do reticulócitos, liberado pelos analisadores hematológicos, como parâmetro no diagnóstico da deficiência de ferro. O estudo consiste em um levantamento bibliográfico de livros e artigos científicos das bases de dados MEDLINE Pubmed, SciELO e BIREME relacionado ao conteúdo de hemoglobina no reticulócito e sua aplicação no diagnóstico da deficiência de ferro. Em geral, não existe um teste laboratorial utilizado na rotina, com sensibilidade e especificidade suficiente para ser de forma isolada, o marcador definitivo da deficiência de ferro. Entre os índices reticulocitários utilizados na prática clínica, o conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos tem sido amplamente investigado para o diagnóstico da depleção de ferro, sendo útil na identificação de estados iniciais de anemia por deficiência deste metal, antecipando tratamentos com ferro e impedindo a implantação da anemia em estágios mais avançados. Além disto, o conteúdo de hemoglobina do reticulócitos também pode ser útil para identificar pacientes que não respondem ao tratamento com ferro via oral, no qual o conteúdo de hemoglobina nos reticulócitos permanece baixo, mesmo após o início da terapia. Apesar de existirem limitações relacionadas a padronização dos valores de normalidade do conteúdo de hemoglobina do reticulócitos, a análise deste índice reticulocitário parece ter um futuro promissor como um parâmetro de grande aplicabilidade para avaliação dos estados de deficiência de ferro.

Palavras chaves: reticulócitos, conteúdo de hemoglobina no reticulócitos, deficiência de ferro.

ABSTRACT:

The reticulocyte count in peripheral blood provides information about erythropoietic activity, which only can be maintained for sufficient distribution of iron to the bone marrow for production of hemoglobin. The amount of hemoglobin contained in reticulocytes

can serve as erythropoiesis indicator and is used for diagnosis and monitoring of patients with anemia due to iron deficiency. This study aims to investigate the applicability of the reticulocyte hemoglobin content as a parameter in the diagnosis of iron deficiency. The study consists of a literature review of books and scientific articles from Pubmed and SciELO related to hemoglobin content in reticulocyte and its application in the diagnosis of iron deficiency. In general, there is no laboratory test used in routine, with sensitivity and specificity enough to be alone, the definitive marker of iron deficiency. Among the reticulocyte indices used in clinical practice, the hemoglobin of the reticulocytes have been widely investigated for the diagnosis of iron depletion, are useful in identifying early stages of this metal deficiency anemia, anticipating treatment with iron and preventing establishment of anemia in more advanced stages. Moreover, the hemoglobin of the reticulocytes can also be useful to identify patients who do not respond to oral iron therapy, wherein the hemoglobin in the reticulocytes remains low even after the beginning of therapy. Despite some limitations related to standardization of normal values, the analysis of reticulocytes rate seems to have a promising future as a parameter of wide applicability for the assessment of iron deficiency states.

Key words : reticulocytes , hemoglobin content in reticulocytes, iron deficiency.

1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial da anemia por deficiência de ferro exige, em primeiro lugar, a confirmação da depleção do ferro, para que seja possível investigar a possível causa (diagnóstico etiológico). O aparecimento de anemia é a última e a fase mais grave da deficiência do ferro, onde a produção de hemoglobina está comprometida e conseqüentemente a sobrevivência eritrocitária, devido a carência do ferro. Na maioria dos casos, esta fase é diagnosticada pela presença de anemia microcítica, hipocrômica e evidência bioquímica de depleção dos estoques de ferro mensurada por marcadores bioquímicos clássicos como a transferrina (transporte), receptor de transferrina (utilização) e da ferritina (estoque). (CORRONS, 1994; THOMAS; THOMAS, 2002; BRUGNARA, 2003; COOK, 2005; MATEOS GONZALEZ *et al.*, 2009; JAIN *et al.*, 2010).

Os novos analisadores hematológicos, além de fornecer a contagem de reticulócitos automatizada, que apresenta inúmeras vantagens em relação ao método manual, oferecem parâmetros adicionais que estão correlacionados aos reticulocitários, como o conteúdo de hemoglobina e as frações de imaturidade dos reticulócitos (RILEY *et al.*, 2001).

2. METODOLOGIA

O levantamento bibliográfico foi realizado mediante consulta às bases de dados Medline PubMed (US. National Library of Medicine National Institutes of Health, USA) e SciELO Brazil (Scientific Eletronic Library Online) através de uma pesquisa de publicações sobre a contagem de reticulócitos e sua aplicação no diagnóstico da deficiência de ferro sem preferências de ano de publicação, porém, com prioridade para

autores e trabalhos de grande impacto científico. Além disto, foi realizada consulta a livros de Hematologia e Saúde Pública.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Contagem de reticulócitos

O reticulócito é a célula de transição entre o eritroblasto ortocromático e o eritrócito maduro, sendo considerado um eritrócito imaturo que apresenta pequena quantidade de RNA remanescente até o estágio final de diferenciação celular dos eritrócitos, quando atingem a maturação completa, pela perda de todas as organelas citoplasmáticas (CULLEN *et al.*, 1999; PIVA *et al.*, 2015). Foram observados pela primeira vez por Wilhelm H. Erb em 1865, o qual notou a presença de grânulos nos eritrócitos quando tratados com ácido pícrico ou acético, de onde vem o nome “retículo” (LEE, 1998). Mais tarde, Heilmeyer descreveu os estágios de maturação dos reticulócitos de acordo com a quantidade grânulos presentes nestas células. Em 1944, Pierre Dustin, mostrou que a substância granular "reticulada" era o RNA (WATANABE *et al.*, 1994; PIVA *et al.*, 2015).

A definição de reticulócitos já foi revisada inúmeras vezes desde sua primeira descrição. 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 obter uma padronização na definição morfológica dos reticulócitos, o NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) agora chamado de *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) descreveu o reticulócito no documento H44-A2, como sendo uma célula que apresenta no mínimo dois grânulos visíveis ao microscópio ótico quando corados com azul de metileno novo (NCCLS, 2004). Os reticulócitos também são reconhecidos na extensão sanguínea corada com corantes do tipo “Romanovski” como macroeritrócitos basofílicos ou mais conhecidos como células policromatófilas (DAVIDSON, 1959; FINCH, 1994).

A contagem de reticulócitos no sangue periférico é utilizada como uma estimativa da integridade funcional da medula óssea pois corresponde ao produto final da maturação eritropoiética. A estimulação medular tem início quando a anemia ou a hipóxia renal aumenta a produção de eritropoietina que atua sobre a medula eritróide, promovendo em poucas horas, a liberação prematura de reticulócitos (FINCH, 1994). Porém, a resposta ao estímulo da eritropoietina depende da integridade funcional da medula e um adequado fornecimento de ferro, no qual sua presença é imprescindível para a síntese de hemoglobina (FISHBANE *et al.*, 1997).

Em pacientes com quadros de anemia que apresentam reticulocitose, a

eritropoiese 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 seja, uma reticulocitopenia, a eritropoiese é considerada ineficaz. 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 (WATANABE *et al.*, 1994; DESSYPRIS, 1998; GROTTTO *et al.*, 1999).

O método automatizado para a contagem de reticulócitos, apresenta inúmeras vantagens em relação ao método manual, além de se contar um maior número de células, a automação elimina-se muitas fontes de erro, tais como a subjetividade do observador, a qualidade do corante utilizado, o elevado coeficiente de variação, etc., proporcionando uma análise mais precisa e confiável dos reticulócitos (PEEBLES; HOCHBERG; CLARKE, 1981; RILEY *et al.*, 2002; BEUTLER, 2006). Os parâmetros reticulocitários (reticulocitograma) obtidos em modernos analisadores hematológicos, incluem além da contagem (percentual e absoluta) dos reticulócitos, uma série de novos parâmetros tais como frações de imaturidade reticulócitos e a hemoglobina reticulocitária, considerados bons marcadores para o diagnóstico da deficiência de ferro (BRIGGS, 2009).

3.2 Deficiência de ferro

A deficiência de ferro (DF) é uma das deficiências nutricionais mais comuns em todo o mundo e é a principal causa de anemia, especialmente em crianças e mulheres adultas (JORDÃO; BERNARDI; BARROS FILHO, 2009). A DF é definida como uma condição na qual há uma redução do ferro corpóreo total, com exaustão dos estoques e algum grau de deficiência tissular (COOKE, 1928). A carência deste metal é progressiva, culminando na redução do estoque de ferro e conseqüentemente na diminuição da quantidade de hemoglobina presente no sangue. Os estágios mais graves de deficiência de ferro caracterizam o quadro de anemia (WHO, 2001). A anemia por deficiência de ferro (ADF) pode resultar de uma dieta inadequada, redução da absorção de ferro, aumento da necessidade ou aumento da perda de ferro (COOKE, 1928).

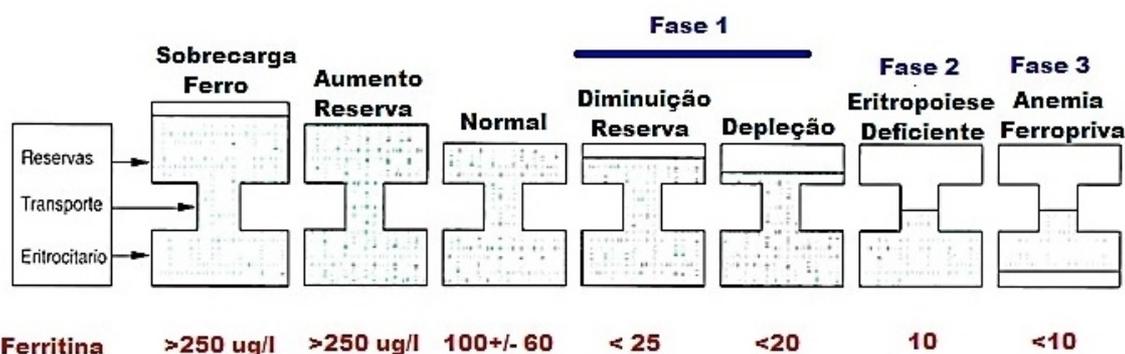


FIGURA 1: Fonte: Da Silva (2016)

A hemoglobinação de eritrócitos é utilizada para detectar a deficiência de ferro funcional, porque o conteúdo de hemoglobina nos reticulócitos e eritrócitos fornece uma avaliação da atividade da medula óssea, o que reflete o equilíbrio entre o ferro e eritropoiese (BRUGNARA *et al.*, 1997). A DF pode ser absoluta, ou seja, há uma redução real no ferro total do organismo, ou pode ser funcional. Nessa condição, há ferro em estoque, porém ele não é devidamente aproveitado para a eritropoiese. Como a distribuição do ferro tem uma dinâmica própria, esse mineral pode ocupar diferentes compartimentos, que são interligados, mas que podem didaticamente ser avaliados separadamente (GROTTO, 2013). Diversos testes laboratoriais são propostos para avaliar esses diferentes compartimentos de ferro na investigação dos distúrbios do seu metabolismo. São eles: o compartimento de estoque, o compartimento de transporte e o compartimento funcional, sendo afetados sequencialmente a medida que o déficit de ferro corpóreo progride (BEUTLER, 2006; DA SILVA *et al.*, 2016).

Atualmente, existem inúmeras provas laboratoriais para confirmação da depleção de ferro, sendo estes testes classificados de acordo com sua especificidade em dois grandes grupos: testes diretos e indiretos. Apesar da maior especificidade, as provas diretas não são utilizadas rotineiramente, por serem consideradas invasivas e desconfortáveis para o paciente (CORRONS, 1994). Por outro lado, as provas indiretas são mais acessíveis ao paciente e largamente utilizadas na rotina laboratorial, porém possui menor especificidade, especialmente quando associado à ferropenia, coexiste outra entidade clínica, como infecções e processos inflamatórios (PUNNONEN; IRJALA; RAJAMAKI, 1997).

Em geral, não existe um teste laboratorial utilizado na rotina, com sensibilidade e especificidade suficiente, para ser, de forma isolada, o marcador definitivo da deficiência de ferro. O uso combinado de vários testes, geralmente não melhora a eficiência diagnóstica, mas dificulta a correta interpretação dos seus resultados (THOMAS; THOMAS, 2002).

Os marcadores bioquímicos avaliam o fornecimento de ferro para a medula óssea e são indicadores indiretos do equilíbrio entre ferro e eritropoiese. Entre os testes indiretos que podem ser utilizados na investigação dos distúrbios do ferro, destacam-se a dosagem do ferro plasmático, a ferritina e a transferrina sérica (Tf), a dosagem da hemoglobina (Hg), os índices hematimétricos HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) e RDW (*Red Cell Distribution Width* – índice de anisocitose), os receptores solúveis de transferrina (sTfR), além de parâmetros reticulocitários (PUNNONEN *et al.*, 1997; CULLEN *et al.*, 1999). O diagnóstico de ADF é baseado na presença de anemia e morfologia dos eritrócitos (hipocromia, microcitose) em conjunto com dosagem de ferritina sérica baixa, diminuição da Tf, ou aumento de sTfR (THOMAS; THOMAS, 2002). Porém, em algumas condições clínicas estes marcadores podem não fornecer uma evidência precoce ou não se alterar rápido o suficiente para refletir estados transitórios

de deficiência de ferro (BRUGNARA, 2003). A determinação de ferritina e transferrina são exemplos de exames indiretos que podem ter eficiência questionada. Os níveis de ferritina e transferrina podem aumentar nos quadros de inflamação, infecção, doenças hepáticas e no uso de álcool, o que, em determinadas situações, pode falsear a deficiência de ferro (THOMAS; THOMAS, 2002; GROTTTO, 2013; DA SILVA *et al.*, 2016).

Dentro deste contexto, os parâmetros reticulocitários se apresentam como uma boa alternativa para o diagnóstico da DF. Como os reticulócitos tem uma sobrevida de 1 a 2 dias no sangue periférico, eles fornecem informações que correspondem ao conteúdo de hemoglobina em eritrócitos recém-formadas, sendo, portanto, um indicador precoce da bioviabilidade do ferro (TORINO *et al.*, 2015).

3.3 Novos parâmetros reticulocitários

Os avanços nos analisadores hematológicos pela utilização de métodos óticos, permitiu a determinação de novos parâmetros reticulocitários (BRUGNARA, 1998; BRIGGS *et al.*, 2000). A Technicon foi pioneira na utilização da citometria de fluxo em sua série de equipamentos H*, seguido mais tarde pelo analisador hematológico ADVIA (Bayer Diagnostics, atualmente Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, EUA). Posteriormente, outros fabricantes também disponibilizaram os novos parâmetros reticulocitários. No modelo H3 (Bayer Diagnostics), os parâmetros reticulocitários são determinados após a coloração da célula pelo corante fluorescente Oxazina 750, o qual incide um feixe de luz através de uma abertura na câmara de fluxo e a fluorescência emitida pode identificar com precisão as células reticulocitárias. Com a análise da dispersão de luz em dois ângulos diferentes são determinados o VCMr (Volume reticulocitário Medio dos reticulócitos) e a CHCMr (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média dos reticulócitos). O CHr (Conteúdo de Hemoglobina no reticulócito) é o produto do cálculo do VCMr vezes a CHCMr (D'ONOFRIO *et al.*, 1995; SCHAEFER; SCHAEFER, 1999).

A série XE e XT da Sysmex (Sysmex, Kobe, Japão) também utiliza esse princípio, em que o corante fluorescente de polimetina se liga no RNA e DNA das células e estas são classificadas de acordo com suas características físicas e químicas. A intensidade da fluorescência é proporcional ao conteúdo de ácidos nucleicos que corresponde aos diferentes estágios de maturação dos reticulócitos, e permite a diferenciação de subpopulações de eritrócitos. Desta forma, quanto maior a quantidade de grânulos nos reticulócitos, maior será a fluorescência emitida e detectada pelo equipamento e maior será a imaturidade do reticulócito (BRIGGS, 2009; SYSMEX, 2011).

Embora existem diferenças na metodologia utilizada entre os fabricantes, os parâmetros medidos são muito semelhantes entre si e os fabricantes utilizam uma nomenclatura ligeiramente diferente (CANALS *et al.*, 2005; ERMENS *et al.*, 2012). Porém, a comparação direta dos valores numéricos dos parâmetros derivados a partir de diferentes instrumentos precisa ser cuidadosamente avaliada, mas já foi demonstrado

um alto nível de concordância entre eles. O Quadro 1 apresenta os principais modelos comercializados, seus métodos, corantes e parâmetros disponibilizados.

QUADRO 1 – EQUIPAMENTOS, TECNOLOGIA E PARÂMETROS FORNECIDOS PARA A ANÁLISE DE RETICULÓCITOS.

EQUIPAMENTO	MÉTODO	CORANTE	PARÂMETROS
Advia 120 Advia 2120	Absorbância e dispersão de luz	Oxazina 750	IRF, L-RET%, M-RET%, H-RET%, VCMr, CHr, CHCMr, RDWr, HDWr, CHDWr
XE 2100 XT 2000i	Fluorescência e dispersão de luz	Polimetina	RET%, RET#, IRF RET He
XE 5000 XT 4000i	Fluorescência e dispersão de luz	Polimetina	RET%, RET#, IRF, RET-He
Pentra DX 120	Impedância e fluorescência	Tiazol laranja	IRF, MVR, RETH%, RETM%, RETL%

IRF: Fração de Reticulócitos Imaturos. L-RET%, RETL% E LFR: Reticulócito de baixa fluorescência; M-RET%, RETM% e MFR: Reticulócito de média fluorescência; H-RET%, RETH% e HFR: Reticulócito de alta fluorescência; VCMr e MVR: Volume Corpuscular Médio do Reticulócito; CHr: Concentração de Hemoglobina dos reticulócitos; CHCMr: Concentração de hemoglobina Corpuscular Média dos reticulócitos; RDWr: *Red Cell Distribution Width* – índice de anisocitose; HDWr e CHDWr: Distribuição de hemoglobina dos Reticulócitos; RET%: Contagem de reticulócitos relativa; RET#: Contagem de reticulócitos absoluta; RET He: Concentração de Hemoglobina dos reticulócitos; IPR: Fração dos Reticulócito de média e alta fluorescência. Fonte: da Silva (2015).

Entre os novos parâmetros reticulocitários que podem ser utilizados no diagnóstico da deficiência de ferro destacam-se o conteúdo de hemoglobina do reticulócito, os reticulócitos imaturos e as frações de imaturidade dos reticulócitos.

3.3.1 Conteúdo de hemoglobina do reticulócito

O conteúdo de hemoglobina do reticulócito está entre os índices reticulocitários, mais amplamente investigado no diagnóstico da depleção de ferro (GROTTO, 2013). Esse parâmetro pode ser utilizado para monitorização eritropoiética na identificação de estados iniciais da DF, antecipando tratamentos com ferro e impedindo a implantação da anemia em estágios mais avançados, na avaliação do estado do ferro em pacientes de hemodiálise, e no diagnóstico e tratamento de várias doenças hematológicas (BRUGNARA, 1998; CULLEN *et al.*, 1999; GROTTO *et al.*, 1999; THOMAS; THOMAS, 2002; COOK, 2005; DA SILVA *et al.*, 2016).

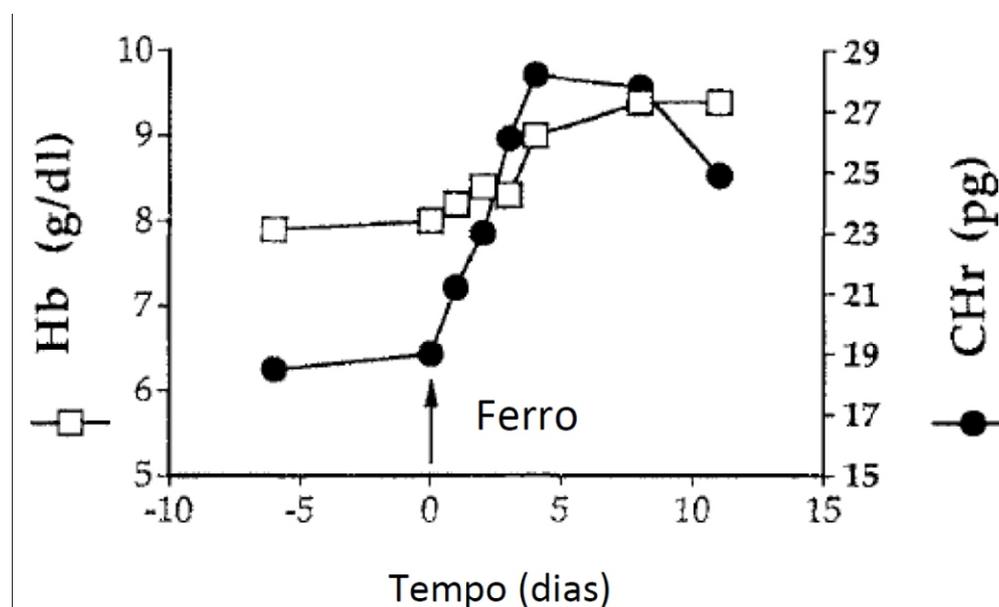
O conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos são parâmetros liberados pelos

equipamentos, conhecidos por CHr ou RET-He, em que a nomenclatura depende do equipamento e da metodologia utilizada, porém, eles possuem o mesmo valor diagnóstico (MIWA *et al.*, 2010).

Brugnara *et al.* (1994) foi um dos primeiros pesquisadores a utilizar o CHr no monitoramento da terapia com ferro. Estudando 10 pacientes mulheres com anemia por deficiência de ferro instalada, os autores acompanharam estas pacientes durante o tratamento com suplementação de ferro (650 mg de sulfato ferroso/dia). A contagem de reticulócitos, na média do grupo, passou de 65.150 *per* μ L para 130.450 *per* μ L, enquanto que a CHr aumentou de 18 pg para 23,4 pg durante as duas primeiras semanas do tratamento. No mesmo estudo, comparando-se o aumento de 1 g/dL de hemoglobina (ocorrido apenas 28 dias após o início do tratamento), a resposta reticulocitária se mostrou mais precoce na resposta a tratamentos com ferro.

Fishbane *et al* (1997) avaliaram o CHr no *status* do metabolismo do ferro em 164 pacientes em terapia de hemodiálise. Com sensibilidade de 100% e especificidade de 80%, estes autores concluíram que a CHr é o principal parâmetro de avaliação da bioviabilidade do ferro na medula óssea.

O CHr também pode ser útil para identificar pacientes que não respondem ao tratamento com ferro via oral, quando o CHr permanece baixo mesmo após o início da terapia, nestes casos, a terapia intravenosa é indicada (BRUGNARA, 1998). A Figura 1 ilustra o tratamento com ferro intravenoso (Ferro IV) em pacientes com deficiência de ferro e o comportamento da hemoglobina plasmática (Hb g/dL) e do CHr (pg).



Nota: Hb (g/dL) hemoglobina plasmática em gramas por decilitro; CHr (pg): Conteúdo de Hemoglobina no reticulócito em pictogramas. Fonte: adaptado de Brugnara (1998)

FIGURA 1 – COMPORTAMENTO DA HEMOGLOBINA PLASMÁTICA E DO CONTEÚDO DE HEMOGLOBINA NO RETICULÓCITO (CHr) EM PACIENTES EM TRATAMENTO COM FERRO INTRAVENOSO.

O CHr mostrou ser superior no diagnóstico funcional da deficiência de ferro em relação a porcentagem de eritrócitos hipocrômicos, pois o ferro incorporado nos eritrócitos reflete a recente mudança na eritropoiese pela síntese de hemoglobina pelos eritrócitos recém-formados, enquanto que a observação da hipocromia reflete a história da eritropoiese durante os últimos meses de acordo com a sobrevivência de 120 dias destas células no sangue periférico (CULLEN *et al.*, 1999).

A utilidade do CHr é sugerida também 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, o que pode desenvolver uma eritropoiese prejudicada pela diminuição da incorporação de ferro à hemoglobina, chamada deficiência funcional de ferro, necessitando de uma alteração na dose da eritropoetina ou administração de suplementos de ferro intravenoso (BRUGNARA, 2003).

Uma limitação no uso desses parâmetros é a falta de padronização dos valores de referência na literatura e entre os fabricantes dos sistemas automatizados (BUTTARELLO, 2004; ERMENS *et al.*, 2012). O Quadro 2 ilustra alguns valores de referência para a concentração de hemoglobina do reticulócito dependendo do analisador utilizado.

QUADRO 2 – VALORES DE REFERENCIADO CHR/RET HE.

Autores	Instrumentos	Valores de referência (pg)
Garzia et al (2007)	Siemens ADVIA 120	29,2 – 33,6
Bovy et al (2005)	Siemens ADVIA 120	32,2 – 32,8
Piva et al (2007)	Sysmex XE 2100	30,7 – 37,0
Canals et al (2005)	Sysmex XE 2100	30,2 – 36,7
d'Onofrio et al (1995)	H*3	25,9 – 30,6

Fonte: Grotto, 2013

3.3.2 Reticulócitos imaturos e as frações de imaturidade dos reticulócitos.

A presença de reticulócitos imaturos, expresso por alguns equipamentos como as Frações de Reticulócitos Imaturos (IRF – do inglês *Immature Reticulocyte Fraction*), indica uma iminente recuperação da eritropoiese (GONCALO *et al.*, 2011). São liberados no sangue periférico durante períodos em que há intensa estimulação da eritropoietina, tais como hemorragia e determinadas anemias. Existem outros parâmetros reticulocitário que podem ser liberados pelos novos métodos automatizados,

os quais classificam a imaturidade dos reticulócitos de acordo com a sua quantidade de RNA em três populações distintas (LHR, MHR e HFR), que correspondem as Frações de Reticulócitos de Baixa Fluorescência (LFR – do inglês *Low Fluorescence Reticulocytes*), Reticulócitos de Média Fluorescência (MFR – do inglês *Media Fluorescence Reticulocytes*) e Reticulócitos de Alta Fluorescência (HFR – do inglês *Hight Fluorescence Reticulocytes*) (WATANABE *et al.*, 1994).

O intervalo normal para reticulócitos imaturos relatados por Heilmeyer, utilizando a microscopia ótica convencional, é de 7,5 a 11% da contagem total de reticulócitos. Outro estudo utilizando o equipamento Sysmex R-1000 encontrou valores semelhantes (2-16%), o qual identifica os reticulócitos pela fluorescência baseada na ligação de auramina 0 ao RNA, porém esta comparação torna-se impraticável pela utilização de resultados determinados por dois métodos completamente diferentes (WATANABE *et al.*, 1994).

O termo IRF foi introduzido para indicar os eritrócitos imaturos que contêm grande quantidade de RNA. O IRF equivale aos reticulócitos que possuem média e alta fluorescência, sendo determinados pelos equipamentos que utilizam as metodologias de dispersão a laser, correspondendo a soma de MRF e de HRF. A determinação das frações de imaturidade reticulócitos (LFR, MFR e HFR) e a fração de reticulócitos imaturos (IRF), têm sido estudadas como parâmetros úteis para avaliação precoce de recuperação medular após transplantes de medula óssea (GROTTO *et al.*, 1999; BRUGNARA; SCHILLER; MORAN, 2006; TORINO *et al.*, 2015). O aumento da porcentagem de reticulócitos imaturos pode predizer a recuperação de tratamento de anemias aplásticas ou a recuperação de tratamento quimioterápicos, antes mesmo da elevação da contagem absoluta de reticulócitos, de neutrófilos e de plaquetas (WATANABE *et al.*, 1994; GROTTO *et al.*, 1999; GONCALO *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2016).

Além disso, o IRF é utilizado como uma evidência hematológica inicial de resposta ao tratamento da deficiência de ferro. A contagem de reticulócitos atinge um valor máximo do quinto ao décimo dia após a instituição da terapia e, depois disso, retornam gradualmente ao normal (LEE, 1998).

O uso dos parâmetros de imaturidade dos reticulócitos devem ser avaliados com critérios bem definidos, principalmente com relação ao valor de normalidade a ser utilizado. Cada laboratório que realiza a contagem de reticulócitos deve estabelecer seu próprio valor de normalidade, tendo em vista as variações metodológicas que os analisadores apresentam (BRIGGS, 2009; DA SILVA *et al.*, 2016).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de algumas limitações relacionadas a padronização dos valores de

normalidade, a análise do conteúdo de hemoglobina nos reticulócitos, denominados como CHr e Ret-He parece ser um parâmetro de grande auxílio para o diagnóstico da deficiência de ferro em seus vários estágios de instalação. É importante conhecer a metodologia utilizada nos autoanalisadores para que cada laboratório, de forma individual, utilize da forma mais racional possível este importante parâmetro de diagnóstico da deficiência de ferro.

5. REFERÊNCIAS

BEUTLER, E. Disorders of iron metabolism. In: LICHTMAN, M. A., et al. William Hematology. ed. 7. New York: McGraw-Hill, 2006. p.511-55.

BRIGGS, C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol*, v. 31, n. 3, p. 277-97, Jun 2009.

BRIGGS, C. et al. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter--the XE 2100. *Clinical And Laboratory Haematology*, v. 22, n. 6, p. 345-350, 2000.

BRUGNARA, C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *Int J Clin Lab Res*, v. 28, n. 1, p. 1-11, 1998.

BRUGNARA, C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem*, v. 49, n. 10, p. 1573-8, 2003.

BRUGNARA, C. et al. Automated Reticulocyte Counting and Measurement of Reticulocyte Cellular Indices: Evaluation of the Miles H*3 Blood Analyzer. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 102, n. 5, p. 623-632, 1994.

BRUGNARA, C.; SCHILLER, B.; MORAN, J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states. *Clin Lab Haematol*, v. 28, n. 5, p. 303-8, 2006.

BRUGNARA, C. et al. Reticulocyte hemoglobin: an integrated parameter for evaluation of erythropoietic activity. *Am J Clin Pathol*, v. 108, n. 2, p. 133-42, Aug 1997.

BUTTARELLO, M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. *Clin Chim Acta*, v. 346, n. 1, p. 45-54, 2004.

CANALS, C. et al. Clinical utility of the new Sysmex XE 2100 parameter - reticulocyte hemoglobin equivalent - in the diagnosis of anemia. *Haematologica*, v. 90, n. 8, p. 1133-1134, 2005.

COOK, J. D. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, v. 18, n. 2, p. 319-32, Jun 2005.

COOKE, W. E. Some observations on the erythrocyte. *Br Med J*, v. 2, n. 3539, p. 790-1, 1928.

CORRONS, J. L. V. Introducción al estudio de la patología retroatario. Bases bioquímicas y fisiológicas. . In: J., S. Sabrafen/Hematología Clínica. ed. 3. Madrid, España: Mosby – Doyma S.A, 1994. p.119.

CULLEN, P. et al. Hypochromic red cells and reticulocyte haemoglobin content as markers of iron-deficient erythropoiesis in patients undergoing chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, v. 14, n. 3, p. 659-65, Mar 1999.

D'ONOFRIO, G. et al. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. *Blood*, v. 85, n. 3, p. 818-23, Feb 1 1995.

DA SILVA, P. H. et al. Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

DAVIDSON, E. The significance of blue polychromasia. *J Clin Pathol*, v. 12, p. 322-4, Jul 1959.

DESSYPRIS, E. N. Eritropoese. In: LEE, G. R., et al. Wintrobe - Hematologia Clínica. ed. 1ª. São Paulo: Ed. Manole, v.1, 1998. p.140-165.

ERMENS, A. A. et al. New erythrocyte and reticulocyte parameters on CELL-DYN Sapphire: analytical and preanalytical aspects. *Int J Lab Hematol*, v. 34, n. 3, p. 274-82, Jun 2012.

FINCH, C. Regulators of iron balance in humans. *Blood*, v. 84, n. 6, p. 1697-702, Sep 15 1994.

FISHBANE, S. et al. Reticulocyte hemoglobin content in the evaluation of iron status of hemodialysis patients. *Kidney Int*, v. 52, n. 1, p. 217-22, Jul 1997.

GONCALO, A. P. et al. Predictive value of immature reticulocyte and platelet fractions in hematopoietic recovery of allograft patients. *Transplant Proc*, v. 43, n. 1, p. 241-3, 2011.

GROTTO, H. Z. et al. Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method. *Clin Lab Haematol*, v. 21, n. 4, p. 285-7, Aug 1999.

GROTTO, H. Z. W. *Diagnóstico da Anemia*. São Paulo: Springer Health do Brasil Ltda, 2013.

JAIN, S. et al. Evaluation of serum transferrin receptor and sTfR ferritin indices in diagnosing and differentiating iron deficiency anemia from anemia of chronic disease. *Indian J Pediatr*, v. 77, n. 2, p. 179-83, Feb 2010.

JORDÃO, R. E.; BERNARDI, J. L. D.; BARROS FILHO, A. D. A. Prevalência de anemia ferropriva no Brasil: uma revisão sistemática. *Rev Paul Pediatr*, v. 27, n. 1, p. 90-8, 2009.

LEE, G. R. Deficiência de ferro e anemia ferropriva. In: LEE, G. R., et al. *Wintrobe - Hematologia Clínica*. ed. 1ª. São Paulo: Ed. Manole, v.1, 1998. p.884-919.

MATEOS GONZALEZ, M. E. et al. [Reticulocyte haemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency]. *An Pediatr (Barc)*, Contenido de hemoglobina reticulocitaria para el diagnostico de la ferropenia., v. 71, n. 2, p. 103-9, Aug 2009.

MIWA, N. et al. Usefulness of measuring reticulocyte hemoglobin equivalent in the management of haemodialysis patients with iron deficiency. *Int J Lab Hematol*, v. 32, n. 2, p. 248-55, Apr 2010.

NCCLS. *Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry and Supravital Dyes)*. Approved Guideline - Second Edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) document H44-A2. Pennsylvania: NCCLS, 2004.

PEEBLES, D. A.; HOCHBERG, A.; CLARKE, T. D. Analysis of manual reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol*, v. 76, n. 5, p. 713-7, Nov 1981.

PIERRE, R. V. Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med*, v. 22, n. 1, p. 279-97, 2002.

PIVA, E. et al. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med*, v. 35, n. 1, p. 133-63, Mar 2015.

PUNNONEN, K.; IRJALA, K.; RAJAMAKI, A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood*, v. 89, n. 3, p. 1052-7, Feb 1 1997.

RILEY, R. S. et al. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *J Clin Lab Anal*, v. 15, n. 5, p. 267-94, 2001.

RILEY, R. S. et al. Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. *Hematol Oncol Clin North Am*, v. 16, n. 2, p. 373-420, vii, Apr 2002.

SCHAEFER, R. M.; SCHAEFER, L. Hypochromic red blood cells and reticulocytes. *Kidney Int Suppl*, v. 69, p. S44-8, Mar 1999.

SYSMEX. Fluorescence flow cytometry in haematology. *Sysmex Xtra Online*, Sysmex Publication, v. August, p. 1-11, 2011.

THOMAS, C.; THOMAS, L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*, v. 48, n. 7, p. 1066-76, Jul 2002.

TORINO, A. B. et al. Evaluation of erythrocyte and reticulocyte parameters as indicative of iron deficiency in patients with anemia of chronic disease. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 37, n. 2, p. 77-81, Mar-Apr 2015.

WATANABE, K. et al. Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. *J Clin Pathol*, v. 47, n. 8, p. 736-9, Aug 1994.

WHO. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control: a guide for programme managers - WHO/NHD/01.3. World Health Organization, Geneva p. 1-132, 2001.